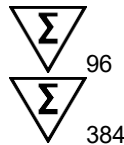


December 2018

Navodila za uporabo testa *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA Test



IVD

Test hibridizacije nukleinske kisline in vitro s pomnoževanjem signala z uporabo kemiluminiscence mikroplošč za kvalitativno odkrivanje 13 vrst DNK humanega papiloma virusa (HPV) z visokim tveganjem v vzorcih materničnega vratu in vaginalnih vzorcih

Za uporabo z:

- pripomočkom *digene* HC2 DNA Collection Device
- transportnim medijem *digene* Specimen Transport Medium
- raztopino Hologic PreservCyt[®] Solution
- tekočino za konzerviranje BD SurePath[®] Preservative Fluid



REF

5197-1330 (komplet 1 plošče)
618111 (komplet 4 plošč)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
ZDA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
NEMČIJA

1058538 Rev. 13

Vsebina

Predvidena uporaba	7
Povzetek in obrazložitev	8
Informacije o patogenu	8
Princip postopka.....	9
Priprava vzorcev s sistemom QIAAsymphony SP	11
Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	11
Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit	11
Testiranje s sistemom Rapid Capture System	12
Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo.....	14
Komplet 1 plošče	14
Komplet 4 plošč	14
Vsebina kompleta	15
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo.....	16
Oprema in materiali za diagnostično uporabo in vitro	16
Oprema in materiali za splošno laboratorijsko uporabo	17
Dodatna oprema in materiali za pripravo vzorcev PreservCyt	18
Dodatna oprema in materiali za pripravo vzorcev SurePath	18
Opozorila in previdnostni ukrepi	19
Opozorila.....	19
Vzorci	19
Natrijev azid	20
Pufer Buffer N2	20
Avtomatizirano testiranje z RCS.....	20
Izjave o varnosti in tveganju za sestavne dele	21
Previdnostni ukrepi	21
Shranjevanje in ravnanje z reagenti	23
Komponente kompleta	23
Pripravljeni reagenti	23
Odvzem in priprava vzorcev	23
Vzorci materničnega vratu in vaginalni vzorci v STM.....	24

Biopsije materničnega vratu	24
Vzorci materničnega vratu v raztopini PreservCyt Solution	24
Vzorci materničnega vratu v tekočini SurePath Preservative Fluid	25
Avtomatizirana priprava vzorcev SurePath	26
Avtomatizirana priprava vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath.....	26
Ročna priprava vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath.....	26
Postopek	27
Priprava reagenta	27
Denaturacijski reagent.....	29
Denaturacijski reagent 2.....	30
Mešanica sode	30
Pufer za spiranje	32
Ustvarite zasnovo plošče	33
Priprava vzorca	34
Priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	34
Priprava vzorcev SurePath in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	35
Priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	35
Ročna priprava vzorcev PreservCyt.....	35
Ročna priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath	35
Denaturacija in hibridizacija vzorcev, pripravljenih z uporabo QIASymphony SP	37
Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in eluatov DNK za ročno testiranje	37
Izbirna točka zaustavitve eluatov DNK	38
Hibridizacija eluatov DNK.....	38
Denaturacija in hibridizacija vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath	39
Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev STM.....	39
Izbirna točka zaustavitve pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath.....	41
Hibridizacija pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath.....	41
Hibridizacija z uporabo mikroplošče in grelnika Microplate Heater I	42
Hibridizacija z uporabo mikroeprevet in vodne kopeli.....	43
Zajem hibridov	44
Zaznavanje hibridov	45

Pranje	45
Metoda avtomatiziranega pralnika plošč	45
Ročna metoda spiranja	46
Pomnoževanje signala	47
Merjenje mikroplošče za zajem in ustvarjanje rezultatov	47
Interpretacija rezultatov	48
Rezultati testiranja vzorcev STM.....	48
Rezultati testiranja vzorcev SurePath	48
Rezultati testiranja vzorcev PreservCyt	48
Vrednost RLU/CO blizu 1,0.....	48
Druge vrste HPV	49
Preverjanje kalibracije analize.....	49
Negativni kalibrator	49
Pozitivni kalibrator.....	49
Povprečje pozitivnega kalibratorja/povprečje negativnega karibratorja.....	50
Izračun mejne vrednosti	50
Kontrole kakovosti.....	50
Omejčitve	51
Značilnosti učinkovitosti	52
Klinična uspešnost pri presejanju bolnic z normalnimi rezultati brisa Pap kot pomoč pri oceni tveganja za zdravljenje bolnic	52
Klinična učinkovitost pri presejalnem pregledu pacientk z rezultati brisa Pap ASC-US za določitev potrebe po napotitvi na kolposkopijo	56
Klinična občutljivost in specifičnost za določanje tveganja za visoko stopnjo bolezni pri ženskah z brisi LSIL ali HSIL Pap	59
Učinkovitost vaginalnega ali samoodvzetega vzorca	62
Analitična občutljivost.....	63
Enakovrednost med vrstami vzorcev	64
Enakovrednost med vzorci STM in PreservCyt.....	64
Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev PreservCyt in pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	64
Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev PreservCyt in pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	65
Enakovrednost med STM in ročno pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath	65

Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath in pripravo vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	66
Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath in pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	67
Ujemanje med testnimi metodami	68
Obnovljivost	72
Splošna obnovljivost ročnega testiranja	72
Obnovljivost s kliničnimi vzorci STM.....	72
Obnovljivost kliničnih vzorcev PreservCyt	75
Obnovljivost kliničnih vzorcev SurePath	86
Navzkrižna reaktivnost	91
Navzkrižna hibridizacija	93
Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce STM	93
Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce PreservCyt	93
Ročna priprava vzorca	93
Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	94
Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit	94
Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce SurePath	95
Priprava vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	95
Priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	96
Prenos	96
Stabilnost reagenta na plošči	97
Reference	100
Simboli	104
Navodila za odpravljanje težav	105
Preverjanje kontaminacije DR2	111
Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira.....	111
Preverjanje kontaminacije avtomatiziranega pralnika plošč	112
Kontaktne podatke.....	113
Večje spremembe	114

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo in vitro (IVD).

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z uporabo tehnologije Hybrid Capture® 2 (HC2) je test hibridizacije nukleinske kisline s pomnoževanjem signala z uporabo kemiluminiscence mikroplošč za kvalitativno odkrivanje 13 tipov DNK HPV z visokim tveganjem v vzorcih materničnega vratu in vaginalnih vzorcih.

Vzorci materničnega vratu in vaginalni vzorci, ki jih je mogoče testirati s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, vključujejo:

- vzorce materničnega vratu, ki jih odvzame zdravnik s pripomočkom *digene* HC2 DNA Collection Device
- samoodvzete vaginalne vzorce, zbrane s pripomočkom *digene* HC2 DNA Collection Device
- biopsijske vzorce, zbrane v transportnem mediju *digene* Specimen Transport Medium (STM)
- vzorce, zbrane s pripomočkom za odvzem v obliki metlice ali kombiniranim pripomočkom za odvzem s čopičem/lopatico, in shranjene v raztopini PreservCyt Solution ali tekočini za konzerviranje SurePath Preservative Fluid

Uporaba tega testa je indicirana:

- za zaznavanje visokorizičnih tipov HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68, ki so dokazano glavni vzročni dejavnik pri razvoju raka materničnega vratu;
- kot začetni presejalni test splošne populacije, za uporabo z ali brez testa Pap, za identifikacijo žensk s povečanim tveganjem za razvoj raka materničnega vratu ali prisotnost hude bolezni materničnega vratu. Diagnoza HPV s starostjo vedno bolj kaže na bolezen materničnega vratu;
- kot nadaljnji test za bolnice po nenormalnih rezultatih brisa Pap ali bolezni materničnega vratu, da se ugotovi potreba po napotitvi na kolposkopijo ali druge postopke spremljanja;
- kot nadaljnji test za bolnike s skvamozno intraepitelno lezijo nizke stopnje (LSIL) ali skvamozno intraepitelno lezijo visoke stopnje (HSIL) so rezultati brisa Pap pred kolposkopijo. Pri teh pacientkah bo rezultat testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pomagal zdravniku pri zdravljenju pacientke, saj bo pomagal pri oceni tveganja žensk, da se ugotovi odsotnost bolezni visoke stopnje.

Povzetek in obrazložitev

Prisotnost določenih tipov HPV v ženskem genitalnem traktu je povezana s številnimi boleznimi, vključno s kondilomi, Bowenoidno papulozo, cervikalno, vaginalno in vulvarno intraepitelno neoplazijo in karcinomom (1–3). Splošno sprejeto je, da so ti virusi pretežno spolno prenosljivi in da so tipi HPV z visokim tveganjem glavni priznani dejavnik tveganja za razvoj raka materničnega vratu (4–8).

Doslej HPV ni mogoče gojiti in vitro, imunološki testi pa so neustrezni za ugotavljanje prisotnosti okužbe materničnega vratu s HPV. Posredni dokaz o anogenitalni okužbi s HPV je mogoče pridobiti s fizičnim pregledom in prisotnostjo značilnih celičnih sprememb, povezanih z razmnoževanjem virusa, v brisu Pap ali vzorcih biopsije. Druga možnost je, da se biopsije analizirajo s hibridizacijo nukleinske kisline, da se neposredno odkrije prisotnost DNK HPV.

Zgodovinsko gledano sta tipa HPV 16 in 18 veljala za visoko tvegana tipa, povezana z rakom (8–10). Dokazano je, da imajo tipi HPV 31, 33 in 35 vmesno povezavo z rakom (2, 11–14). Ta vmesna povezava je posledica dejstva, da so ti tipi pogostejše odkriti pri skvamoznih intraepitelnih lezijah visoke stopnje kot pri raku. Zato je sklepanje na raka zaradi prisotnosti teh tipov manj verjetna, kot če so prisotni tipi DNK HPV z visokim tveganjem (15). Teh 5 tipov HPV skupaj predstavlja približno 73 % okužb s HPV (16, 17). Dodatni tipi HPV, vključno s 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68, so bili prepoznani kot glavni tipi HPV, ki jih je mogoče zaznati v preostalih lezijah (17–27). Te tipe HPV je mogoče razvrstiti tudi v skupine srednjega in visokega tveganja glede na njihovo relativno porazdelitev v različnih kategorijah histopatološke diagnoze (16, 17, 24–28).

Dokazano je, da je DNK HPV prisoten pri približno 10 % žensk z normalnim epitelijem materničnega vratu, vendar na dejansko razširjenost v določenih skupinah žensk močno vplivajo starost in druge demografske spremenljivke (2, 10, 16, 29). Prospektivne študije so pokazale, da so se pri 15–28 % žensk s pozitivnim testom na DNK HPV razvile skvamozne intraepitelijske lezije (SIL) v 2 letih v primerjavi s samo 1–3 % žensk, ki so bile negativne na DNK HPV (30, 31). Zlasti je bilo tveganje za napredovanje tipov HPV 16 in 18 večje (približno 40 %) kot pri drugih tipih HPV (30).

Informacije o patogenu

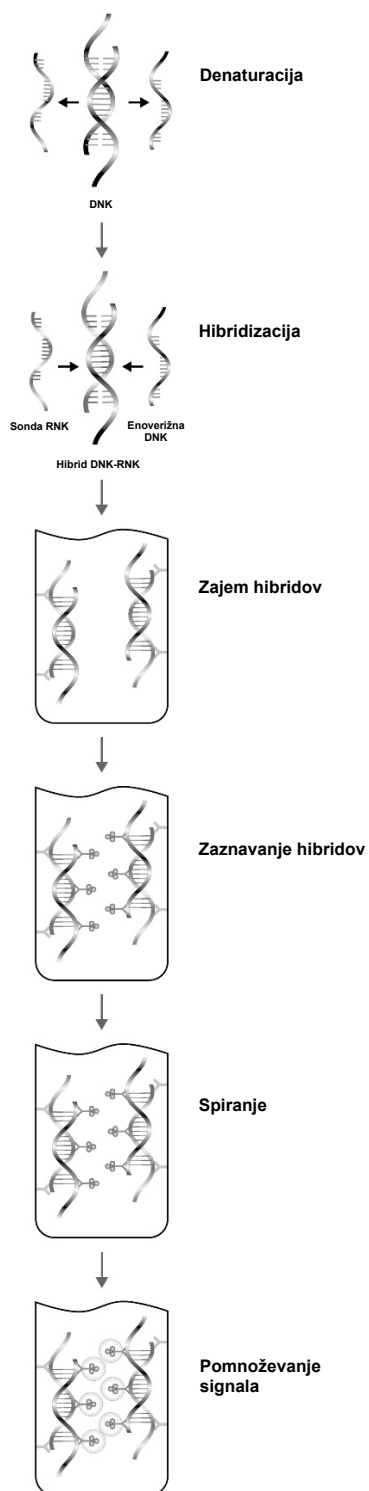
Humani papiloma virusi so sestavljeni iz ikozaedričnega virusnega delca (viriona), ki vsebuje dvoverižno krožno molekulo DNK z 8000 baznimi pari, obdano s proteinsko kapsido. Po okužbi epiteljskih celic se virusna DNK vzpostavi po vsej debelini epitelija, nepoškodovane virione pa najdemo le v zgornjih plasteh tkiva. Tako lahko virusno DNK najdemo v virionih ali kot episomalne ali integrirane sekvence HPV, odvisno od vrste in stopnje lezije.

Princip postopka

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, ki uporablja tehnologijo HC2, je test hibridizacije nukleinske kisline s pomnoževanjem signala, ki uporablja kemiluminiscenčno zaznavanje na mikroploščah. Vzorci, ki vsebujejo ciljno DNK, hibridizirajo s specifično sondo HPV RNK. Nastali hibridi RNK-DNK se ujamejo na površino mikroplošče, dobro prevlečene s protitelesi, specifičnimi za hibride RNK-DNK. Imobilizirani hibridi nato reagirajo s protitelesi, konjugiranimi z alkalno fosfatazo, specifičnimi za hibride RNK-DNK, in jih zaznamo s kemiluminiscenčnim substratom. Na vsako protitelo je konjugiranih več molekul alkalne fosfataze. Na vsakega zajetega hibrida se veže več konjugiranih protiteles, kar povzroči znatno pomnoževanje signala. Ko substrat cepi vezana alkalna fosfataza, se oddaja svetloba, ki se meri v relativnih svetlobnih enotah (RLU) z instrumentom *digene* Microplate Luminometer (DML). Intenzivnost oddane svetlobe označuje prisotnost ali odsotnost ciljne DNK v vzorcu.

Meritev RLU, ki je enaka ali višja od mejne vrednosti testa (CO), kaže na prisotnost zaporedij DNK HPV z visokim tveganjem v vzorcu. Meritev RLU, ki je nižja od testne mejne vrednosti, kaže na odsotnost specifičnih testiranih zaporedij DNK HPV z visokim tveganjem ali ravni DNK HPV pod mejo detekcije testa.

Potek dela zajema hibridov



Priprava vzorcev s sistemom QIASymphony SP

Avtomatizirano pripravo vzorcev PreservCyt je mogoče izvesti s sistemom QIASymphony SP in kompletom QIASymphony DSP HPV Media Kit ali QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

Priprava vzorcev s kompletom QIASymphony DSP HPV Media Kit

Komplet QIASymphony DSP HPV Media Kit zagotavlja ekstrakte vzorcev na hibridizacijski mikroplošči, ki so pripravljeni za avtomatizirano testiranje s sistemom Rapid Capture® System (RCS) s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIASymphony SP v enem samem postopku izvede vse korake postopka priprave vzorca za do 88 vzorcev v serijah do 24 vzorcev.

Ko je instrument naložen z vzorci, sistem QIASymphony SP obdela 88 vzorcev PreservCyt v 2 urah in 15 minutah brez posredovanja uporabnika.

Ko je instrument naložen z vzorci, sistem QIASymphony SP obdela 88 vzorcev SurePath v 1 uri in 45 minutah brez posredovanja uporabnika. Pripravi vzorca s sistemom QIASymphony SP takoj sledi 90-minutna inkubacija ekstraktov vzorca na hibridizacijski mikroplošči na grelniku mikroplošče. Med inkubacijo ekstraktov vzorcev se kalibratorji in kontrole kakovosti ločeno denaturirajo v vodni kopeli in se nato ročno pipetirajo v prvo kolono hibridizacijske mikroplošče, ko je inkubacija ekstraktov vzorcev končana. Priprava vzorcev SurePath s sistemom QIASymphony SP in kompletom QIASymphony DSP HPV Media Kit se lahko izvede pred začetkom citološke obdelave ali po končani citološki obdelavi.

Pomembno: Ekstrakte vzorcev, ki nastanejo kot rezultat priprave vzorcev PreservCyt in SurePath s kompletom QIASymphony DSP HPV Media Kit, je mogoče testirati samo z RCS. Ročna izvedba testa z ekstrakti vzorcev ni potrjena.

Pri izvedbi avtomatizirane priprave vzorcev z uporabo sistema QIASymphony morate poleg teh navodil za uporabo za potrebne postopkovne in opisne informacije gledati tudi ustrezne uporabniške priročnike za sistem QIASymphony in *navodila za uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (priročnik)*.

Priprava vzorcev s kompletom QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Komplet QIASymphony DSP AXpH DNA Kit zagotavlja eluate DNK na hibridizacijski mikroplošči, ki so pripravljeni za ročno ali avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIASymphony SP v enem samem postopku izvede vse korake postopka priprave vzorca za do 88 vzorcev v serijah do 24 vzorcev. Ko je instrument naložen z vzorci, sistem QIASymphony SP obdela 88 vzorcev v 4 urah in 30 minutah brez posredovanja uporabnika.

Pri izvedbi avtomatizirane priprave vzorcev z uporabo sistema QIASymphony morate poleg teh navodil za uporabo za potrebne postopkovne in opisne informacije gledati tudi ustrezne uporabniške priročnike za sistem QIASymphony in *navodila za uporabo kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit*.

Testiranje s sistemom Rapid Capture System

Testiranje prepustnosti vzorcev velike količine s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je mogoče izvesti s sistemom RCS. Komplet s 4 ploščami (kat. št. 618111) se lahko uporablja samo z RCS in ga ni mogoče uporabiti za ročno testiranje.

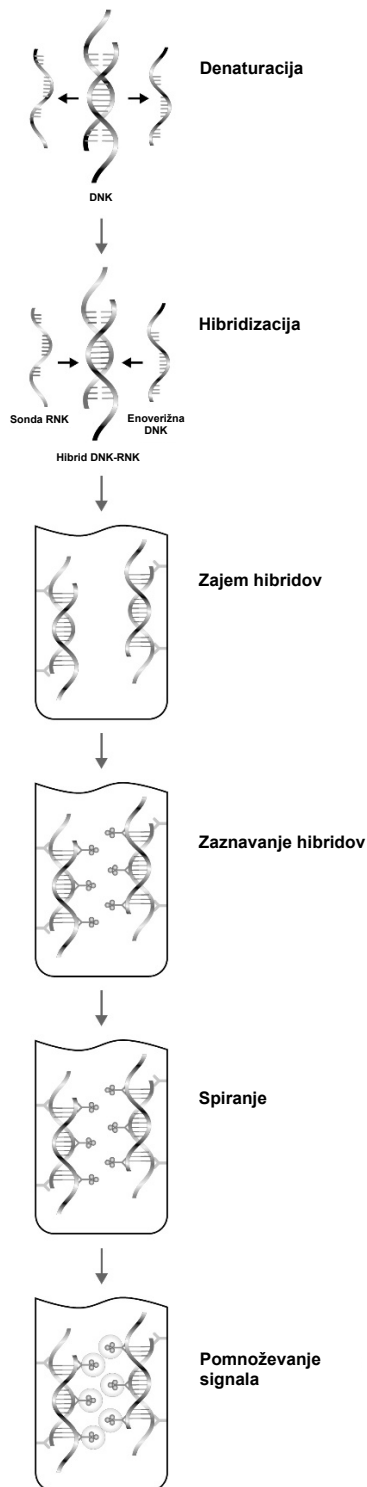
RCS je avtomatiziran sistem za pipetiranje in redčenje za splošno uporabo, ki se lahko uporablja s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za testiranje prepustnosti vzorcev velike količine. Ta sistem obdela do 352 vzorcev v 8 urah, vključno s 3,5-urnim obdobjem, v katerem posredovanje uporabnika ni potrebno; do 704 rezultatov vzorcev je mogoče ustvariti v 13 urah.

Priprava vzorca se izvede neodvisno od RCS pred namestitvijo na ploščo RCS. Poleg tega se zaznavanje kemiluminiscenčnega signala in poročanje o rezultatih izvedeta z uporabo instrumenta DML brez povezave, ki je skupen ročnemu in avtomatiziranemu testiranju z RCS.

Vsak od korakov testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test se izvede v natančnem zaporedju kot ročno testiranje. RCS omogoča razporejeno obdelavo do 4 mikroplošč, pri čemer vsaka mikroplošča vsebuje vzorce ter zahtevane testne kalibratorje in kontrole kakovosti.

Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja z RCS si poleg teh navodil za uporabo za potrebne postopkovne in opisne informacije oglejte *Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System in Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System — Izvajanje testov digene HC2 DNA Test z uporabo obdelanih vzorcev QIASymphony SP*.

Potek dela zajema hibridov



Ročna priprava vzorca

Avtomatizirano v sistemu Rapid Capture System

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

Komplet 1 plošče

V testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z eno ploščo je 96 testov (kat. št. 5197-1330).

Pri izvajanju ročnega testiranja z uporabo kompleta z 1 ploščo je najmanjše število priporočenih testov na vsako uporabo 24. Če je zaželenih manj kot 24 testov na uporabo, se lahko skupno število testov na komplet zmanjša zaradi omejenih količin reagenta. Število rezultatov pacientk se bo razlikovalo glede na število uporab na komplet, kot je navedeno spodaj:

Število pripravkov	Število rezultatov pacientk
1	88
2	80
3	72
4	64

Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja z RCS s kompletom z 1 ploščo je za uporabo celotnega kompleta potrebno testiranje celotne mikroplošče (88 vzorcev) v enem postopku z RCS. Testiranje delne mikroplošče je sprejemljivo; vendar se zaradi proste količine, potrebne za delovanje instrumenta, uporabi celoten komplet.

Komplet 4 plošč

V testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s 4 ploščami je 384 testov (kat. št. 618111).

Komplet s 4 ploščami se lahko uporablja samo za avtomatizirano testiranje z RCS. Da bi dosegli 384 testov, je treba komplet s 4 ploščami uporabiti v 1 ali 2 postopkih z RCS. Če sta zaželena več kot 2 postopka, se lahko skupno število testov na komplet zmanjša zaradi omejenih količin reagenta.

Vsebina kompleta

Test <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Kataloška številka	5197-1330	618111
Število testov	96	384
Indikator Dye (indikatorsko barvilo)	0,35 ml	2,0 ml
Vsebuje 0,05-% (m/v) natrijev azid		
Denaturacijski reagent* Raztopina razredčenega natrijevega hidroksida (NaOH)	50 ml	2 × 100 ml
Probe Diluent* (Redčilo sonde)	5 ml	20 ml
Pufrana raztopina z 0,05-% (m/v) natrijevim azidom		
High-Risk HPV Probe (Sonda za HPV z visokim tveganjem)	200 µl	3 x 200 µl
Sonda RNK HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68 v pufrani raztopini (rdeča kapica)		
Low-Risk HPV Quality Control (Kontrola kakovosti HPV z nizkim tveganjem)	1 ml	1 ml
5 pg/ml (500.000 kopij/ml), klonirane DNK HPV 6 in nosilne DNK v STM z 0,05-% (m/v) natrijevim azidom		
High-Risk HPV Quality Control (Kontrola kakovosti za HPV z visokim tveganjem)	1 ml	1 ml
5 pg/ml (500.000 kopij/ml) klonirane DNK HPV 16 in nosilne DNK v STM z 0,05-% m/v natrijevim azidom		
Negative Calibrator (Negativen kalibrator)	2 ml	2 ml
Nosilna DNK v STM z 0,05-% (m/v) natrijevim azidom		
High-Risk HPV Calibrator (Kalibrator za HPV z visokim tveganjem)	1 ml	2 ml
1 pg/ml klonirane DNK HPV 16 in nosilne DNK v STM z 0,05-% (m/v) natrijevim azidom		
Capture Microplate (Mikroplošča za zajem)	1	4
Obložena s kozjimi poliklonskimi hibridnimi protitelesi proti RNK-DNK		
Detection Reagent 1 (Reagent za zaznavanje 1)	12 ml	40 ml
Z alkalno fosfatazo konjugirana protitelesa proti hibridom RNK-DNK v pufrani raztopini z 0,05-% (m/v) natrijevim azidom		
Detection Reagent 2 (Reagent za zaznavanje 2)	12 ml	40 ml
CDP-Star® z Emerald II (kemiluminiscenčni substrat)		
Wash Buffer Concentrate* (Koncentrat pufra za spiranje)	100 ml	2 × 100 ml
Vsebuje 1,5-% (m/v) natrijev azid		

* Za informacije o zdravju in varnosti glejte »Opozorila in previdnostni ukrepi« na strani 19.

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

Pomembno: Zagotovite, da so instrumenti, uporabljeni v tem postopku, preverjeni in umerjeni v skladu s priporočili proizvajalca.

Oprema in materiali za diagnostično uporabo in vitro

Družba QIAGEN zagotavlja samo opremo in materiale, potrjene za uporabo s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

- Sistem *digene* Hybrid Capture 2 System (»sistem *digene* HC2«), ki ga sestavljajo luminometer (»instrument DML«), ki ga je odobrila družba QIAGEN, osebni računalnik in periferne naprave (monitor, tipkovnica, miška, tiskalnik in tiskalniški kabel), ki jih je odobrila družba QIAGEN, programska oprema sistema *digene* HC2 (»programska oprema za analizo testov *digene*«), testni protokoli sistema *digene* HC2 za HPV, programska oprema LumiCheck Plate in *Uporabniški priročnik za sistem digene HC2*
- Rotacijski stresalnik Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Grelec za mikroplošče Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Pralnik plošč Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Vibracijski mešalnik Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (izbirno)*
- Konverzijsko stojalo in pokrov (izbirno)*
- Stojalo za vzorce in pokrov *digene* Specimen Rack and Lid (izbirno)*
- Pipeta in stojalo EXPAND-4 (izbirno)†
- Tube Sealer Dispenser and cutting device (izbirno, uporablja se z vibracijskim mešalnikom MST Vortexer 2)
- Sistem Rapid Capture System (potreben za uporabo s kompletom s 4 ploščami; izbirno za komplet z 1 ploščo)
- Naprava za pranje
- Hibridizacijske mikroplošče
- Pokrovi za mikroplošče
- Trakovi z vdolbinicami za mikroploščo RCS*
- Korita za reagent RCS*
- Pokrovi za korita za reagent RCS*
- Konice RCS za enkratno uporabo*
- Pokrovčki RCS*

* Potreben za izvajanje avtomatiziranega testiranja z RCS

† Izdelek po meri, ki se uporablja za prenos vzorcev STM na hibridizacijsko mikroploščo. Uporabite lahko tudi druge razširljive, večkanalne pipete po meri, če je razmik med konicami pri razširivih 3,2 cm.

- Pufer Buffer N2*
- Pufer Buffer D2*
- Skledica Blue RCS Washer Boat†
- Izjemno dolge konice pipete
- Epruvete za odvzem vzorcev
- Stojalo za epruvete za odvzem vzorcev
- Navojni zamaški za epruvete za odvzem vzorcev
- Rezervoarji za reagente za enkratno uporabo
- Film za tesnjenje epruvet DuraSeal™
- Hibridizacijske mikroeprovete‡
- Stojalo za mikroeprovete‡
- Tesnila za plošče‡

Oprema in materiali za splošno laboratorijsko uporabo

- Vodna kopel 65 ± 2 °C, ki je dovolj velika za držalo stojala za vzorce [21 cm široko x 32 cm globoko x 18 cm visoko (8,25 x 12,25 x 4,9 palcev)]
- Mikrocentrifuga
- Vrtinčni mešalnik z nastavkom za skodelice
- Enokanalna pipeta; spremenljive nastavitve za količine 20–200 µl in 200–1000 µl
- Pipeta s ponavljajočim pozitivnim izpodrivom, kot je pipeta Eppendorf® Repeater®
- 8-kanalna pipeta: spremenljive nastavitve za količine 25–200 µl
- Časovnik
- Raztopina natrijevega hipoklorita, 0,5 % v/v
- Parafilm® ali enakovreden izdelek
- Konice za pipete z aerosolno pregrado za enkratno uporabo za enokanalno pipeto (20–200 µl in 200–1000 µl)
- Konice za enkratno uporabo za pipeto s ponavljajočim pozitivnim izpodrivom (12,5, 5, 2,5 in 1,25 ml)
- Konice za enkratno uporabo za 8-kanalno pipeto (25–200 µl)
- Brisače Kimtowels® ali enakovredne papirnate brisače z malo vlaken
- Prevleka za mizo za enkratno uporabo
- Rokavice za enkratno uporabo brez pudra
- 5 ml in/ali 15 ml polipropilenske epruvete z zaskočnim pokrovčkom in okroglim dnom
- Stojalo za epruvete za 10 ml ali 15 ml epruvete
- 50 ml polipropilenske konične epruvete

* Potreben za izvajanje testiranja z vzorci, pripravljenimi s kompletom QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit.

† Potrebna za avtomatizirano testiranje vzorcev, obdelanih z QIAasymphony DSP HPV Media Kit, z RCS.

‡ Potrebne za izvedbo hibridizacije z uporabo mikroeprevet in vodne kopeli.

Dodatna oprema in materiali za pripravo vzorcev PreservCyt

 Za avtomatizirano pripravo vzorcev s kompletom QIAasymphony DSP HPV Media Kit glejte *Navodila za uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (priročnik)*.

 Za avtomatizirano pripravo vzorcev s kompletom QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit glejte *Priročnik za komplet QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit*.

 Za ročno pripravo vzorcev glejte navodila za uporabo kompleta *digene HC2 Sample Conversion Kit*.

Dodatna oprema in materiali za pripravo vzorcev SurePath

 Za avtomatizirano pripravo vzorcev s kompletom QIAasymphony DSP HPV Media Kit glejte *Navodila za uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (priročnik)*.

Za ročno pripravo vzorcev SurePath so potrebni naslednji dodatni materiali in oprema:

- Centrifuga z vrtljivim vedrom, ki lahko doseže $800 \pm 15 \times g$ in drži 15-ml konične polipropilenske centrifugalne epruvete
- Epruvete za pretvorbo vzorcev *digene* HC2 Sample Conversion Tubes oziroma 15 ml polipropilenske epruvete VWR® ali Corning®
Pomembno: Epruvete za pretvorbo vzorcev *digene* HC2 Sample Conversion Tubes, ki so na voljo pri družbi QIAGEN, je treba uporabiti z vibracijskim mešalnikom MST Vortexer 2 ali RCS.
- 7 ml pipete za prenos s standardno konico ali enakovredne pipete
- Transportni medij *digene* Specimen Transport Medium

Opozorila in previdnostni ukrepi

Za diagnostično uporabo in vitro.

Pred uporabo kompleta natančno preberite vsa navodila.

Opozorila

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih (Safety Data Sheets, SDS). Ti so v priročni in kompaktni obliki PDF na voljo na spletu na naslovu www.qiagen.com/safety, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste za vse kompletne QIAGEN in njihove komponente.

Vzorci

POZOR

Nevarnost povzročiteljev okužb



Vzorci lahko vsebujejo povzročitelje okužb, zato je treba z njimi ustrezno ravnati. Z vsemi vzorci ravnajte kot s potencialno kužnimi.

Nobena znana testna metoda ne more nuditi popolnega zagotovila, da vzorci ne bodo prenašali okužb. Priporočljivo je, da s človeškimi vzorci ravnate v skladu z ustreznimi nacionalnimi in lokalnimi praksami za biološko varnost. Te prakse za biološko varnost uporabljajte pri materialih, ki vsebujejo ali bi lahko vsebovali povzročitelje okužb.

Ti previdnostni ukrepi vključujejo, vendar niso omejeni na naslednje:

- Ne pipetirajte z usti.
- Ne kadite, jejte ali pijte v prostorih, kjer se ravna z reagenti ali vzorci.
- Pri ravnanju z reagenti ali vzorci nosite rokavice brez pudra za enkratno uporabo. Po izvedbi testa si temeljito umijte roke.
- Očistite in razkužite vsa razlitja vzorcev z uporabo tuberkulocidnega razkužila, kot je 0,5-% v/v natrijev hipoklorit, ali drugega primerne razkužila (32, 33).
- Dekontaminirajte in zavrzite vse vzorce, reagente in druge potencialno kontaminirane materiale v skladu z nacionalnimi in lokalnimi predpisi.

Po denaturaciji in inkubaciji se vzorci ne štejejo več za kužne (34); vendar pa mora laboratorijsko osebje še vedno upoštevati nacionalne/lokalne previdnostne ukrepe.

Natrijev azid

Nekateri reagenti vsebujejo natrijev azid. Poročano je bilo, da natrijev azid tvori svinčev ali bakrov azid v laboratorijskih vodovodnih napeljavah. Ti azidi lahko eksplodirajo ob udarcih, kot je udarjanje s kladivom. Da preprečite nastajanje svinčevega ali bakrovega azida, po odstranitvi raztopin, ki vsebujejo natrijev azid, odtoke temeljito sperite z vodo. Za odstranitev kontaminacije iz starih odtokov, za katere obstaja sum, da se v njih kopičijo azidi, Uprava ZDA za varnost in zdravje pri delu priporoča naslednje:

1. Izsesajte tekočino iz lovilca z gumijasto ali plastično cevjo.
2. Napolnite z 10 % v/v raztopino natrijevega hidroksida.
3. Pustite stati 16 ur.
4. Dobro sperite z vodo.

Pufer Buffer N2

POZOR

Nevarnost visoko reaktivnih spojin



Ne dodajajte belila ali kislih raztopin neposredno v katero koli raztopino ali odpadke, ki vsebujejo pufer Buffer N2.

Pufer Buffer N2 vsebuje gvanidinijev klorid, ki lahko v kombinaciji z belilom tvori zelo reaktivne spojine.

Če se tekočina, ki vsebuje ta pufer, razlije, jo očistite z ustreznim laboratorijskim detergentom in vodo. Če razlita tekočina vsebuje snovi, ki lahko povzročijo okužbe, polito območje očistite najprej z laboratorijskih detergentom in vodo ter nato še z 1-% (v/v) raztopino natrijevega hipoklorita.

Avtomatizirano testiranje z RCS

Za dodatna opozorila in previdnostne ukrepe, specifične za uporabo tega sistema za testiranje prepustnosti vzorcev velike količine, glejte *uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System*.

Izjave o varnosti in tveganju za sestavne dele

Za komponente kompleta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test veljajo naslednji opozorilni in obvestilni stavki.

Denaturacijski reagent



Vsebuje: natrijev hidroksid. Nevarnost! Morda je korozivno za kovine. Povzroča hude opekline in okvare oči. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz. PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika.

High-Risk HPV Calibrator (Kalibrator za HPV z visokim tveganjem)

Opozorilo! Povzroča blago draženje kože. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz.

High-Risk HPV Quality Control (Kontrola kakovosti za HPV z visokim tveganjem)

Opozorilo! Povzroča blago draženje kože. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Low-Risk HPV Quality Control (Kontrola kakovosti HPV z nizkim tveganjem)

Opozorilo! Povzroča blago draženje kože. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Negativen kalibrator

Opozorilo! Povzroča blago draženje kože. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Redčilo sonde



Vsebuje: očetno kislino, poliakrilno kislino. Nevarnost! Povzroča hude opekline in okvare oči. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz. PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika.

Koncentrat pufru za spiranje



Vsebuje: natrijev azid. Opozorilo! Škodljivo v primeru zaužitja. Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki. Nosite zaščitne rokavice/zaščitna oblačila/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Previdnostni ukrepi

Uporabnik mora pri uporabi testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test vedno upoštevati naslednje previdnostne ukrepe:

- Reagentov ne uporabljajte po izteku roka uporabnosti, ki je naveden poleg simbola  na nalepki na zunanji škatli, ali roka uporabnosti pripravljenih reagentov.
- Izvajanje testa zunaj navedenih časovnih in temperaturnih razponov lahko povzroči neveljavne rezultate. Testi, ki ne spadajo v določene časovne in temperaturne razpone, so neveljavni in jih je treba ponoviti.

- Za pridobitev zanesljivih rezultatov testa je treba natančno upoštevati postopek testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, umerjanje testa, kontrolo kakovosti in rezultate vzorcev.
- Pomembno je, da s pipeto nanese točno navedeno količino reagenta in dobro premešate po vsakem dodajanju reagenta. Če tega ne storite, lahko pride do napačnih rezultatov testa. Če se prepričate, da pride do navedenih barvnih sprememb, boste potrdili, da so bili ti pogoji izpolnjeni.
- Z izjemo koncentrata pufra za spiranje so bile komponente kompleta testirane kot enota. Ne zamenjajte komponent iz drugih virov ali iz različnih serij. Vendar pa lahko kombinirate komponente iz kompletov z isto številko serije, da bi pridobili zahtevane količine reagenta za testiranje več mikroplošč v eni sami seriji z RCS.
- Nukleinske kisline so zelo občutljive na razgradnjo nukleaze v okolju. Nukleaze so prisotne na človeški koži in na površinah ali materialih, s katerimi ravnaajo ljudje. Očistite in pokrijte delovne površine s prevleko za mizo za enkratno uporabo in pri izvajanju vseh korakov testa nosite rokavice brez pudra.
- Prepričajte se, da med izvajanjem testa preprečite kontaminacijo mikroplošče za zajem in reagenta za zaznavanje 2 (DR2) z eksogeno alkalno fosfatazo. Snovi, ki lahko vsebujejo alkalno fosfatazo, vključujejo reagent za zaznavanje 1 (DR1), bakterije, slino, lase in olja iz kože. Pokrivanje mikroplošče za zajem po koraku pranja in med inkubacijo z DR2 je še posebej pomembno, saj lahko eksogena alkalna fosfataza reagira z DR2, kar povzroči lažno pozitivne rezultate.
- Zaščitite DR2 pred dolgotrajno izpostavljenostjo neposredni svetlobi. Uporabite DR2 takoj po alikvotiranju in se izogibajte neposredni sončni svetlobi.
- Ponavljajočo se pipeto pripravite pred dovajanjem reagenta in redno preverjajte, ali obstajajo veliki zračni mehurčki. Prevelike količine velikih zračnih mehurčkov v konici ponavljajoče se pipete lahko povzročijo netočno dovajanje; temu se lahko izognete tako, da napolnite pipeto, odmerite vso tekočino in ponovno napolnite. Za posebna navodila za uporabo glejte uporabniški priročnik za pipeto.
- Za odmerjanje DR1 in DR2 izvedite večkanalno pipetiranje s tehniko obratnega pipetiranja (glejte »Zaznavanje hibridov«, stran 45). Vsako konico pipete na večkanalni pipeti preverite glede pravilnega prileganja in polnjenja.
- Prepričajte se, da je vsaka vdolbinica mikroplošče za zajem temeljito oprana (glejte »Pranje«, stran 45). Neustrezno pranje bo povzročilo povečano ozadje in lahko povzroči lažno pozitivne rezultate. Preostali pufer za spiranje v vdolbinicah mikroplošče za zajem lahko povzroči zmanjšan signal ali slabo ponovljivost.

Shranjevanje in ravnanje z reagenti

Komponente kompleta

Po prejemu hranite komplet pri temperaturi 2–8 °C. Koncentrat pufru za spiranje, denaturacijski reagent in indikatorsko barvilo lahko po želji shranite pri temperaturi 2–30 °C. Vsi reagenti so pripravljeni za uporabo, razen denaturacijskega reagenta (DNR), mešanice sonde in pufru za spiranje.

Pripravljeni reagenti

Ko je DNR pripravljen, je stabilen 3 mesece pri temperaturi 2–8 °C.

Ko je pufer za spiranje pripravljen, je stabilen 3 mesece pri temperaturi 2–30 °C.

Če testirate vzorce PreservCyt, obdelane s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit ali QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit, so odprti, nendenaturirani kalibratorji in kontrole kakovosti stabilni 3 mesece pri temperaturi 2–8 °C.

Če testirate vzorce, obdelane s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit, je pripravljen denaturacijski reagent 2 (DNR2) stabilen 8 ur pri temperaturi 15–30 °C.

Odvzem in priprava vzorcev

Vzorci materničnega vratu in vaginalne vzorce za testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test odvezmite in prenesite z uporabo enega od naslednjih pripomočkov za vzorčenje:

- pripomočkom *digene* HC2 DNA Collection Device (ki je sestavljen iz cervikalne ščetke in STM)
- biopsijo, zbrano v *digene* STM
- pripomočkom za odvzem v obliki metle ali kombiniranim pripomočkom za odvzem s čopičem/lopatko, shranjenim v raztopini PreservCyt Solution ali tekočini za konzerviranje SurePath Preservative Fluid

Vzorci, zbrani z drugimi pripomočki za vzorčenje ali preneseni v drugih transportnih medijih, niso bili potrebni za uporabo s tem testom. Značilnosti učinkovitosti tega testa so bile ugotovljene le z navedenimi kompleti za odvzem.

Pripomočka *digene* HC2 DNA Collection Device ne smete uporabljati pri nosečnicah. Vzorce materničnega vratu morate odvzeti pred aplikacijo očetne kisline ali joda, če se izvaja kolposkopija. Za dodatne postopke odvzema in ravnanja z vzorci si oglejte navodila za uporabo naprave *digene* HC2 DNA Collection Device.

Pri vzorcih materničnega vratu in vaginalnih vzorcih, zbranih v STM, ni potrebna konverzija vzorca pred testiranjem s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Pri vzorcih PreservCyt in SurePath je pred testiranjem s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test potrebna konverzija vzorca.

Vzorci materničnega vratu in vaginalni vzorci v STM

Pomembno: Ne odvezemite vzorca materničnega vratu ali vaginalnega vzorca STM, če so prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam, kontracepcijskega želeja ali tuša.

Vzorci STM se lahko hranijo do 2 tedna pri sobni temperaturi in se brez hlajenja pošljejo v preskusni laboratorij. Vzorce pošljite v izolirani embalaži s pomočjo dobavitelja za dostavo čez noč ali v roku 2 dni.

V laboratoriju za testiranje hranite vzorce pri temperaturi 2–8 °C, če boste test izvedli v enem tednu. Če boste test izvedli pozneje kot v enem tednu, prevlecite pokrovčke epruvet z vzorci s filmom Parafilm in shranite vzorce pri temperaturi –20 °C do 3 mesece. Ko jemljete vzorce iz zamrzovalnika za testiranje, pokrovčke takoj zamenjajte z navojnimi pokrovčki za epruvete za odvzem vzorcev.

STM je bil dodan konzervans, ki zavira rast bakterij in ohranja celovitost DNK. Ni namenjen ohranjanju sposobnosti preživetja organizmov ali celic.

Biopsije materničnega vratu

S testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test lahko testirate sveže odvzete biopsije materničnega vratu do 5 mm v prečnem prerezu. Ne uporabljajte biopsij s premerom manj kot 2 mm. Biopsijski vzorec takoj shranite v 1,0 ml STM, pokrovček epruvete z vzorcem pokrijte s filmom Parafilm, da se pokrovček ne odlepi, in shranite vzorec zamrznjen pri –20 °C. Vzorce biopsije lahko pošljete pri temperaturi 2–30 °C, da jih čez noč dostavite v laboratorij za testiranje.

V laboratoriju za testiranje ga do obdelave hranite pri temperaturi –20 °C. Ko jemljete vzorce iz zamrzovalnika za testiranje, pokrovčke takoj zamenjajte z navojnimi pokrovčki epruvet za odvzem vzorcev.

Vzorci materničnega vratu v raztopini PreservCyt Solution

Pomembno: Ne odvezemite vzorca materničnega vratu PreservCyt za pripravo vzorca s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, če so prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam, vaginalnega lubrikanta ali krvi.

Pomembno: Ne odvezemite vzorca materničnega vratu PreservCyt za pripravo vzorca s kompletom QIAAsymphony DSP AXP DNA Kit, če je prisoten kontracepcijski žele.

Vzorce odvezemite na rutinski način in pripravite preparate ThinPrep® Test Pap v skladu z navodili za uporabo proizvajalca.

Po odvzemu lahko vzorce PreservCyt pred pripravo vzorca za test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test hranite do 3 mesece pri temperaturi 2–30 °C. Vzorcev PreservCyt ni mogoče zamrzniti.

Za pripravo vzorcev so na voljo naslednje metode:

- avtomatizirana priprava vzorcev z uporabo QIAasymphony SP in QIAasymphony DSP HPV Media Kit
Rezultat je ekstrakt vzorca (ki vsebuje magnetne delce, STM in DNR), ki je pripravljen za nadaljnji korak denaturacije testa.
- avtomatizirana priprava vzorca z uporabo QIAasymphony SP in QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit
Rezultat je eluat DNK, pripravljen za nadaljnji korak denaturacije testa.
- Ročna priprava vzorca s kompletom *digene* HC2 Sample Conversion Kit
Rezultat ročne priprave vzorca je denaturiran vzorec, pripravljen za nadaljevanje koraka hibridizacije testa.

Zahteve glede količine vzorca temeljijo na metodi priprave vzorca, in sicer:

- za avtomatizirano pripravo vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit so potrebni 3 ml vzorca
- za avtomatizirano pripravo vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit so potrebni 4 ml vzorca
- za ročno pripravo vzorca z uporabo kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit so potrebni najmanj 4 ml vzorca

Vzorci z manjšo količino vzorca od zahtevane količine po pripravi testa Pap ne vsebujejo dovolj materiala za testiranje in lahko ob uporabi testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test povzročijo lažno negativen rezultat.

Vzorci materničnega vratu v tekočini SurePath Preservative Fluid

Pomembno: Ne odzemi vzorca materničnega vratu SurePath za pripravo vzorca s kompletom QIAasymphony DSP HPV Media Kit, če je prisoten kontracepcijski žele, krema proti glivicam ali krema proti vnetju.

Zberite vzorce v tekočini SurePath Preservative Fluid v skladu z veljavnimi navodili za uporabo.

Priprava vzorcev SurePath se lahko izvede pred začetkom citološke obdelave ali po končani citološki obdelavi.

Če vzorce pripravite pred začetkom citološke obdelave, uporabite vzorec izvirnega vzorca SurePath, ki ni bil obdelan z nobeno drugo diagnostično metodo, vključno s sistemoma BD PrepMate® System in BD PrepStain® Slide Processor. V teh navodilih za uporabo so ti vzorci v izogib zmedi imenovani »vzorci SurePath«.

Če vzorce pripravite po končani citološki obdelavi, uporabite vzorec iz preostalega celičnega peleta po gradientu, potem ko je bil vzorec SurePath pripravljen v skladu z ustreznimi navodili za sistem BD PrepMate System in BD PrepStain Slide Processor. V teh navodilih za uporabo so ti vzorci v izogib zmedi imenovani »vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath«.

Za pripravo vzorcev so na voljo naslednje metode:

- avtomatizirana priprava vzorcev SurePath z uporabo QIAasymphony SP in QIAasymphony DSP HPV Media Kit
Rezultat je denaturiran ekstrakt vzorca (ki vsebuje magnetne delce, STM in DNR), ki je pripravljen za nadaljnji hibridizacijski korak testa.

- avtomatizirana priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo QIASymphony SP in QIASymphony DSP HPV Media Kit

Rezultat je denaturiran ekstrakt vzorca (ki vsebuje magnetne delce, STM in DNR), ki je pripravljen za nadaljnji hibridizacijski korak testa.

- ročna priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

Rezultat ročne priprave vzorca je denaturiran vzorec, pripravljen za nadaljevanje koraka hibridizacije testa.

Zahteve glede količine vzorca temeljijo na metodi priprave vzorca, in sicer:

- pri avtomatizirani pripravi vzorca z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit je potrebnih 950 µl
- pri ročni pripravi vzorca je potrebnih 2,8 ml vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath

Uporaba manjše količine od zahtevane lahko pri uporabi testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test povzroči lažno negativen rezultat.

Avtomatizirana priprava vzorcev SurePath

Po odvzemu lahko vzorce SurePath pred pripravo vzorca z uporabo QIASymphony SP in QIASymphony DSP HPV Media Kit hranite do 4 tedne pri temperaturi 5–25 °C. Uporabljeni vzorec SurePath ne sme biti obdelan z nobeno drugo diagnostično metodo, vključno z BD PrepMate in BD PrepStain Slide Processor. Za avtomatizirano pripravo vzorca je potrebnih 950 µl vzorca SurePath.

Avtomatizirana priprava vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath

Pomembno: Takoj po pripravi preparata SurePath Pap pipetirajte 2,0 ml tekočine SurePath Preservative Fluid v epruveto za centrifugo, ki vsebuje celični pelet po gradientu. To ohranja celovitost celičnega peleta po gradientu za izvedbo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Celični pelet po gradientu s tekočino SurePath Preservative Fluid lahko pred pripravo vzorca za test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test hranite do 4 tedne pri temperaturi 5–25 °C. Za avtomatizirano pripravo vzorca je potrebnih 950 µl celičnega peleta po gradientu SurePath.

Ročna priprava vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath

Pomembno: Takoj po pripravi preparata SurePath Pap pipetirajte 2,0 ml tekočine SurePath Preservative Fluid v epruveto za centrifugo, ki vsebuje preostali celični pelet. To ohranja celovitost celičnega peleta po gradientu za izvedbo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Celični pelet po gradientu s tekočino SurePath Preservative Fluid lahko pred pripravo vzorca za test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test hranite do 4 tedne pri temperaturi 2–30 °C.

Vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath se pripravijo v skladu s temi navodili za uporabo. Rezultat ročne priprave vzorca je denaturiran vzorec, pripravljen za nadaljevanje koraka hibridizacije testa.

Postopek

Navodila pred začetkom

- Pri ročnem testiranju počakajte vsaj 60 minut, da se grelnik mikroplošč Microplate Heater I po hladnem zagonu uravnoteži na $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Če ne zagotovite tega časa za segrevanje, se lahko hibridizacijska mikroplošča stali. Za dodatna navodila glejte *uporabniški priročnik za Microplate Heater I*.
- Če med korakoma denaturacije in hibridizacije uporabljate vodno kopel, se prepričajte, da ima vodna kopel $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in da raven vode zadošča za potopitev celotne količine vzorca v epruveti.

Priprava reagenta

- Pred začetkom testa odstranite vzorce in vse zahtevane reagente iz hladilnika. Počakajte 15–30 minut, da dosežejo $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pripravite vzorce PreservCyt in SurePath, preden uravnotežite vse predhodno denaturirane vzorce in reagente na sobno temperaturo.
- Če za postopek RCS z več ploščami kombinirate reagente, pripravljene za uporabo, temeljito premešajte posamezne stekleničke in nato zmešajte ustrezno količino reagenta v čisto konično polipropilensko epruveto za enkratno uporabo.
- Za ročno testiranje se reagenti Wash Buffer in Probe Mix pripravijo med posameznimi koraki testiranja. Za avtomatizirano testiranje RCS se vsi reagenti pripravijo pred začetkom postopka RCS in se postavijo na ploščo RCS.
- Pred pripravo drugih reagentov ustrezno pripravite DNR in DNR2.
- Ob zaključku testa zavrzite vse pripravljene reagente (razen če je določeno drugače) in alikvote reagenta.
- Uporabite spodnje preglednice 1–5, da določite potrebno količino za vsak reagent na podlagi števila testov/mikroplošč in metode testiranja. Količine za avtomatizirano testiranje RCS vključujejo prazno količino reagenta, potrebno za instrument.

Preglednica 1. Zahtevane količine pripravljenih in za uporabo pripravljenih reagentov za ročno testiranje vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

Število testov/trakov	Mešanica sode	Pufer za spiranje	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

Preglednica 2. Zahtevane količine pripravljenih in za uporabo pripravljenih reagentov za avtomatizirano testiranje vzorcev STM, ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath ter vzorcev SurePath in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath, pripravljenih s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, s sistemom RCS

Število mikroplošč	Mešanica sonde	Pufer za spiranje	DR1	DR2
≤ 1	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤ 1,5	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤ 2	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤ 2,5	9,36 ml	6 litrov	22 ml	22 ml
≤ 3	10,40 ml	6 litrov	26 ml	26 ml
≤ 3,5	12,48 ml	6 litrov	30 ml	30 ml
≤ 4	13,52 ml	6 litrov	34 ml	34 ml

Preglednica 3. Zahtevane količine pripravljenih in za uporabo pripravljenih reagentov za avtomatizirano testiranje vzorcev PreservCyt, pripravljenih z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, s sistemom RCS

Število mikroplošč	DNR	Mešanica sonde	Pufer za spiranje	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	9,36 ml	6 litrov	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	10,40 ml	6 litrov	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	12,48 ml	6 litrov	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	13,52 ml	6 litrov	34 ml	34 ml

Preglednica 4. Zahtevane količine pripravljenih in za uporabo pripravljenih reagentov za ročno testiranje vzorcev PreservCyt, pripravljenih s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit

Število testov/trakov	DNR	DNR2	Mešanica sonde	Pufer za spiranje	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

Preglednica 5. Zahtevane količine pripravljenih in za uporabo pripravljenih reagentov za avtomatizirano testiranje vzorcev PreservCyt, pripravljenih s kompletom QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit, s sistemom RCS

Število mikroplošč	DNR	DNR2	Mešanica sode	Pufer za spiranje	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,0 ml	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	5,5 ml	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	6,5 ml	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	7,7 ml	9,36 ml	6 litrov	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	8,8 ml	10,40 ml	6 litrov	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	10,0 ml	12,48 ml	6 litrov	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	11,0 ml	13,52 ml	6 litrov	34 ml	34 ml

Denaturacijski reagent

V komplet z 1 ploščo je vključenih 50 ml denaturacijskega reagenta, v komplet s 4 ploščami pa 2 x 100 ml denaturacijskega reagenta. Zagotovite, da DNR pripravite glede na količino, ki je priložena ustreznemu kompletu.

Opombe:

- Ko je DNR pripravljen, je stabilen 3 mesece pri temperaturi 2–8 °C.
- Če barva zbledi, dodajte 3 dodatne kapljice indikatorskega barvila in pred uporabo temeljito premešajte.

50 ml steklenička

1. V 50 ml stekleničko denaturacijskega reagenta dodajte 5 kapljic indikatorskega barvila.
2. Temeljito premešajte.

DNR mora imeti enakomerno temno vijolično barvo.

3. Označite DNR z novim datumom uporabnosti.

100 ml steklenička

1. V 100 ml stekleničko denaturacijskega reagenta dodajte 10 kapljic indikatorskega barvila.
2. Temeljito premešajte.

DNR mora imeti enakomerno temno vijolično barvo.

3. Označite DNR z novim datumom uporabnosti.

Denaturacijski reagent 2

Opomba: DNR2 je potreben le za testiranje vzorcev PreservCyt, pripravljenih s kompletom QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit.

1. Čisto konično polipropilensko epruveto za enkratno uporabo označite kot »DNR2«.
2. V označeno posodo dodajte potrebno količino pufru Buffer N2 (glejte Preglednica 6 spodaj).

Preglednica 6. Priprava DNR2

Potrebna količina DNR2	Količina pufru Buffer N2	Količina pufru Buffer D2	Indikator Dye (indikatorsko barvilo)
1,0 ml	0,4 ml	0,6 ml	1–2 kapljici
2,0 ml	0,8 ml	1,2 ml	1–2 kapljici
2,5 ml	1,0 ml	1,5 ml	1–2 kapljici
5,0 ml	2,0 ml	3,0 ml	1–2 kapljici
5,5 ml	2,2 ml	3,3 ml	1–2 kapljici
6,5 ml	2,6 ml	3,9 ml	1–2 kapljici
7,7 ml	3,1 ml	4,6 ml	1–2 kapljici
8,8 ml	3,5 ml	5,3 ml	1–2 kapljici
10,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	1–2 kapljici
11,0 ml	4,4 ml	6,6 ml	1–2 kapljici

3. V označeno posodo dodajte potrebno količino pufru Buffer D2 (glejte Preglednica 6 zgoraj).
4. V označeno posodo dodajte potrebno količino indikatorskega barvila (glejte Preglednica 6 zgoraj).
Opomba: Uporabite indikatorsko barvilo, ki je priloženo kompletu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.
5. Vrtinčite najmanj 10 sekund.
Opomba: Ko je DNR2 pripravljen, je stabilen 8 ur pri temperaturi 15–30 °C.

Mešanica sonde

- Za ročno testiranje pripravite mešanico sonde med inkubacijo za denaturacijo vzorca (če je primerno, glejte »Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev STM«, stran 39, ali »Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in eluatov DNK za ročno testiranje«, stran 37).
- Bodite zelo previdni, da preprečite kontaminacijo RNaze. Za pipetiranje sonde uporabite konice pipet z aerosolno pregrado.
- Redčilo sonde je viskozno. Prepričajte se, da med pripravo mešanice sonde dosežete vidni vrtinec; nepopolno mešanje lahko povzroči zmanjšan signal.
- Če za avtomatizirano testiranje RCS kombinirate več vial sonde, združite sondo v eno vialo in premešajte s pipetiranjem.

1. Da se sonda ne ujame v pokrov viala, vsako vialo sonde na kratko centrifugirajte, da pride tekočina na dno viala.
2. Nežno tapkajte vialo, da premešate.
3. Določite potrebno količino mešanice sonde.

Priporočilo: Pripravite dodatno mešanico sonde, da tako upoštevate količino, ki se lahko izgubi v konicah pipet ali na straneh viala. Količine, določene v preglednicah od 1 do 5 zgoraj, vključujejo priporočeno dodatno količino.

Ročno testiranje: Določite količine, potrebne za razredčitev sonde v razmerju 1:25 v redčilu sonde za pripravo mešanice sonde (25 µl/test). Količine so navedene v Preglednica 1 na strani 27 in v Preglednica 4 na strani 28, kot je primerno.

Avtomatizirano testiranje z RCS: Uporabite količine, navedene v Preglednica 2 strani 28, Preglednica 3 strani 28 ali Preglednica 5 strani 29, kot je primerno.

4. Novo posodo za enkratno uporabo označite kot »Mešanica sond za HPV z visokim tveganjem«.

Odvisno od števila testov se priporoča bodisi 5 ml ali 15 ml polipropilenska epruveta z zaskočnim pokrovčkom in okroglim dnom.

5. V označeno epruveto dodajte potrebno količino redčila sonde (glejte Preglednica 7 spodaj).
6. Odpipetirajte potrebno količino sonde za HPV z visokim tveganjem v redčilo sonde (glejte Preglednica 7 spodaj), tako da konico pipete položite na notranjo steno epruvete tik nad meniskusom in iztisnete vsebino.

Pomembno: Konice ne potaplajte v redčilo sonde.

Preglednica 7. Priprava mešanice sonde

Zahtevana količina mešanice sonde	Količina redčila sonde	Količina sonde za HPV z visokim tveganjem
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. Vsaj 5 sekund mešajte pri najvišji hitrosti, da se dobro premeša.

Nastati mora viden vrtinec.

Pufer za spiranje

- Za ročno testiranje pripravite pufer za spiranje med korakom zajema hibridov (glejte »Zajem hibridov«, stran 44).
- Za zmanjšanje izpostavljenosti koncentratu pufra za spiranje med pripravo dodajte vodo.
- Za ročno metodo pranja mikroplošč pripravite 3 litre pufra za spiranje v napravi za pranje.

Priporočilo: Vsake 3 mesece očistite napravo za pranje in cevke z 0,5 % raztopino natrijevega hipoklorita in temeljito sperite z destilirano ali deionizirano vodo, da preprečite morebitno kontaminacijo z alkalno fosfatazo, ki je prisotna v bakterijah in plesni.

- Za avtomatiziran pralnik plošč pripravite pufer za spiranje in ga shranite v pokriti posodi ali pripravite 1 liter in ga prelijte v rezervoar za pranje avtomatiziranega pralnika plošč.
 - Za avtomatizirano testiranje z RCS pripravite navedeno količino (glejte Preglednica 2 na strani 28, Preglednica 3 na strani 28 ali Preglednica 5 na strani 29, kot je primerno) v steklenici za pranje RCS.
1. Koncentrat pufra za spiranje dobro premešajte in v navedeno posodo dodajte potrebno količino koncentrata pufra za spiranje (glejte Preglednica 8 spodaj).
 2. V navedeno posodo dodajte potrebno količino destilirane ali deionizirane vode (glejte Preglednica 8 spodaj).

Preglednica 8. Priprava pufra za spiranje

Potrebna količina pufra za spiranje	Količina koncentrata pufra za spiranje	Količina destilirane ali deionizirane vode
1 liter	33,3 ml	966,7 ml
2 litra	66,6 ml	1933,4 ml
3 litri	100,0 ml	2900,0 ml
6 litrov	200,0 ml	5800,0 ml

3. Čez vse odprtine posode položite čisto papirnato brisačo z malo vlaken in dobro premešajte.
4. Zaprite posodo, da preprečite kontaminacijo ali izhlapevanje, ali pa jo postavite na ustrezni instrument.
5. Pufer za spiranje označite z novim datumom uporabnosti.

Opomba: Ko je pufer za spiranje pripravljen, je stabilen 3 mesece pri temperaturi 2–30 °C.

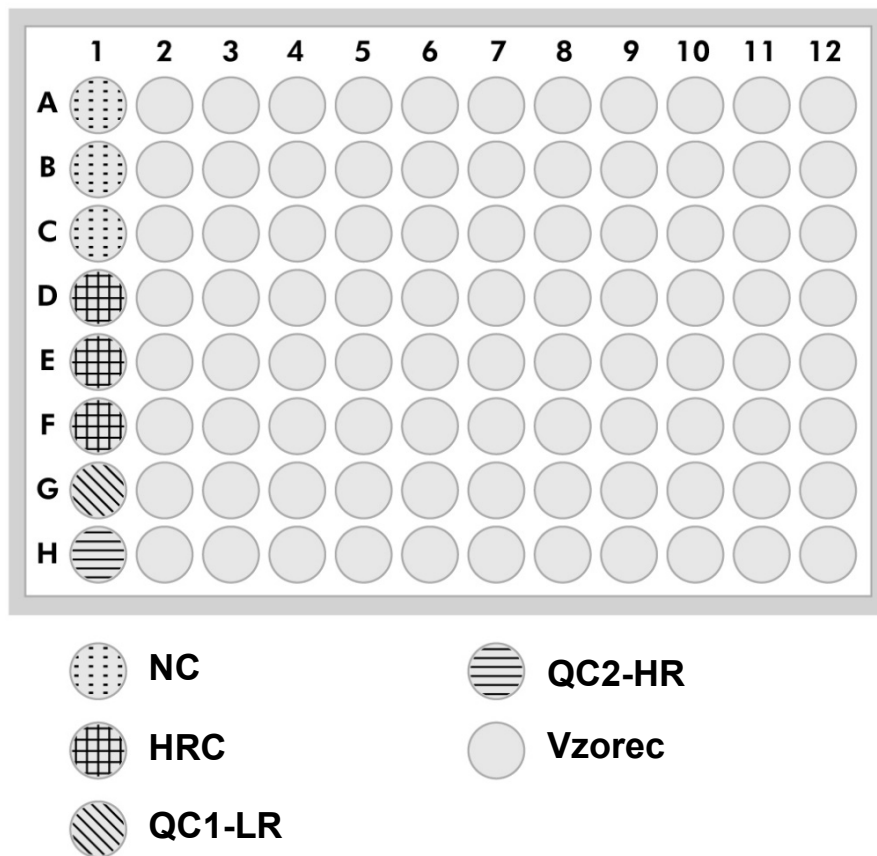
Ustvarite zasnovo plošče

1. S programsko opremo *digene* za analizo testov s testnimi protokoli *digene* za HPV ustvarite zasnovo plošče.

Za navodila o ustvarjanju zasnove plošče s pravilnimi položaji kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev glejte uporabniški priročnik za ustrezno programsko opremo.

Opombe:

- Kalibratorji, kontrole kakovosti in vzorci se izvajajo v konfiguraciji kolone z 8 vdolbinicami.
- Kalibratorje in kontrole kakovosti testirajte na naslednjih mestih na mikroplošči (glejte Slika 1 spodaj):
 - negativni kalibrator (NC) se ponovi v vdolbinicah mikroplošče A1, B1, C1
 - kalibrator za HPV z visokim tveganjem (HRC) se ponovi v vdolbinicah mikroplošče D1, E1, F1
 - kontrola kakovosti za HPV z nizkim tveganjem (QC1-LR) v vdolbinici mikroplošče G1
 - kontrola kakovosti za HPV z visokim tveganjem (QC2-HR) v vdolbinici mikroplošče H1



Slika 1. Položaj kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev na mikroplošči.

Pomembno: Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja z RCS uporabite testne protokole, specifične za RCS, da ustvarite zasnovo plošče in rezultate. Opredeljeni parametri testnih protokolov, specifičnih za RCS, se razlikujejo od tistih za testne protokole pri ročnem testiranju (glejte »Izračun mejne vrednosti«, stran 50).

2. Kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce, ki jih želite testirati, postavite v stojalo za epruvete za vzorce ali stojalo za vzorce v enakem vrstnem redu, kot jih boste testirali.

Pomembno: Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja z RCS je bistveno, da zasnova plošče ustreza pravilnim testiranim vzorcem, da preprečite poročanje o netočnih rezultatih vzorcev. Za vsako uporabljeno stojalo za vzorce in pokrov se prepričajte, da se serijske številke ujemajo, in po potrebi označite vsako stojalo za vzorce in pokrov v skladu z vrstnim redom, kot ga boste izvedli pri testiranju z RCS. Uporabite označevalnik in nalepko, ki se v vodni kopeli pri 65 °C ne bosta sprala.

Priprava vzorca

Pri vzorcih PreservCyt in SurePath je pred testiranjem s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test potrebna priprava vzorca. Odvisno od vrste priprave vzorca so pripravljene vzorci pripravljene za različne korake testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Razpoložljive metode priprave vzorcev so:

- avtomatizirana priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit
- avtomatizirana priprava vzorcev SurePath in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit
- avtomatizirana priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit
- ročna priprava vzorcev PreservCyt
- ročna priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

Priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit

 Za navodila za pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit glejte *Navodila za uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (priročnik)*.

Pomembno: Ekstrakte vzorcev, ki nastanejo kot rezultat priprave vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit, je mogoče testirati samo z uporabo RCS. Ročna izvedba testa z ekstrakti vzorcev ni potrjena.

Rezultat priprave vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit so ekstrakti vzorcev v hibridizacijski mikroplošči s prazno prvo kolono. Ekstrakti vzorcev vsebujejo magnetne delce, STM in DNR ter so pripravljene za avtomatizirano testiranje z RCS v koraku denaturacije. Kalibratorji, kontrole kakovosti in ekstrakti vzorca so med avtomatiziranim testiranjem z RCS istočasno denaturirani v hibridizacijski mikroplošči (glejte »Denaturacija in hibridizacija vzorcev, pripravljenih z uporabo QIAasymphony SP«, stran 37).

 Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja vzorcev, pripravljenih z QIAasymphony SP, s sistemom RCS si za navodila za dokončanje testiranja oglejte *Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System — Izvajanje testov digene HC2 DNA Test z uporabo obdelanih vzorcev QIAasymphony SP*.

Priprava vzorcev SurePath in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit

 Za navodila za pripravo vzorcev SurePath in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit glejte *Navodila za uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (priročnik)*.

Pomembno: Ekstrakte vzorcev, ki nastanejo kot rezultat priprave vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit, je mogoče testirati samo z uporabo RCS. Ročna izvedba testa z ekstrakti vzorcev ni potrjena.

Rezultat priprave vzorcev SurePath in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit so kalibratorji, kontrole kakovosti in ekstrakti vzorcev v hibridizacijski mikroplošči, pripravljeni za avtomatizirano testiranje z RCS v koraku hibridizacije.

 Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja vzorcev, pripravljenih z QIAasymphony SP, s sistemom RCS si za navodila za dokončanje testiranja oglejte *Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System — Izvajanje testov digene HC2 DNA Test z uporabo obdelanih vzorcev QIAasymphony SP*.

Priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit

 Za navodila o pripravi vzorcev PreservCyt glejte *Priročnik za komplet QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit*.

Rezultat priprave vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit so eluati DNK v hibridizacijski mikroplošči s prazno prvo kolono. Eluati DNK so pripravljeni za korak denaturacije. Kalibratorji, kontrole kakovosti in eluati DNK so istočasno denaturirani v hibridizacijski mikroplošči (glejte »Denaturacija in hibridizacija vzorcev, pripravljenih z uporabo QIAasymphony SP«, stran 37).

Ročna priprava vzorcev PreservCyt

 Za ročno pripravo vzorcev PreservCyt glejte navodila za uporabo kompleta *digene HC2 Sample Conversion Kit*.

Rezultat ročne priprave vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta *digene HC2 Sample Conversion Kit* so vzorci, pripravljeni za korak hibridizacije. Kalibratorje in kontrole kakovosti pripravite ločeno (glejte »Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev STM«, stran 39).

Ročna priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

Rezultat ročne priprave vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath so vzorci, pripravljeni za korak hibridizacije. Kalibratorje in kontrole kakovosti pripravite ločeno (glejte »Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev STM«, stran 39).

Pomembno: Če se zdi, da vzorec celičnega peleta po gradientu SurePath vsebuje manj kot 1 ml, celični pelet po gradientu ni primeren za testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, ker tekočina SurePath Preservative Fluid ni bil dodana po citologiji.

1. Celične pelete po gradientu SurePath uravnajte na sobno temperaturo in se prepričajte, da je opazovana količina tekočine enaka približno 2,8 ml.
2. Celične pelete po gradientu SurePath centrifugirajte v vrtljivem rotorju pri $800 \pm 15 \times g$ 10 ± 1 minuto.
3. Odstranite epruvete iz centrifuge.
4. Takoj po centrifugiranju previdno odlijte supernatant in vsako epruveto približno trikrat nežno popivnjajte z brisačami Kimtowels ali enakovrednimi papirnatimi brisačami z malo vlaken, da odstranite odvečno tekočino. Opazujte pelet v vsaki epruveti.

Pomembno: Ne dovolite, da bi celični paleti zdrsnili po epruveti med pivnanjem.

5. Epruvete postavite v stojalo.
6. Vsakemu peletu dodajte 200 μ l STM s ponavljajočo se ali enokanalno pipeto.
7. Vsak pelet ponovno suspendirajte tako, da vsako epruveto posebej 15 sekund vrtinčite pri visoki hitrosti.

Če je pelet težko ponovno suspendirati, vrtinčite dodatnih 5 do 30 sekund ali dokler pelet ne odplava z dna epruvete in se zdi, da se raztopi.

Opomba: Epruvete se lahko mešajo brez zamašitve.

8. V vsak vzorec SurePath pipetirajte 100 μ l DNR s ponavljajočo se ali enokanalno pipeto.

Pomembno: Pazite, da se ne dotikate stranic epruvete, sicer lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev.

9. Vsako epruveto posebej temeljito premešajte z vrtinčenjem pri visoki hitrosti 5 sekund.

Opomba: Epruvete lahko mešate brez zamašitve.

10. Epruvete *digene* HC2 Sample Conversion Tubes ali 15 ml konične epruvete označite z ustrezno identifikacijo in vrsto vzorca (primer »SP« za vzorec SurePath) in postavite epruvete v stojalo za epruvete.

Pomembno: Za avtomatizirano testiranje z RCS morate uporabiti epruvete *digene* HC2 Sample Conversion Tubes.

11. S 7 ml pipeto za enkratno uporabo s standardno konico ali enakovredno prenesite celotno količino v ustrezno 15 ml konično epruveto.
12. Zamašite konične epruvete in jih postavite v stojalo za epruvete.
13. Epruvete inkubirajte v vodni kopeli pri 65 ± 2 °C 90 ± 5 minut.

Opomba: Ta čas inkubacije je daljši od zahtevanega za druge odobrene vrste vzorcev.

Če boste testiranje zaključili isti dan, denaturirajte kalibratorje in kontrole kakovosti (glejte »Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev STM«, stran 39).

14. Po inkubaciji odstranite stojalo za epruvete iz vodne kopeli.

Če uporabljate stojalo za vzorce, ne pustite, da se ohladi, preden odstranite pokrov stojala. Takoj nadaljujte s testiranjem ali odstranite pokrov stojala in tesnilni film za epruvete DuraSeal.

Opomba: Če se stojalo za vzorce ohladi, se lahko epruvete prilepijo na pokrov stojala in se nato razlijejo.

Pripravljene vzorce SurePath lahko:

- testirate takoj (nadaljujte s korakom »Hibridizacija pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath«, stran 41)
- shranite (glejte »Izbirna točka zaustavitve pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath«, stran 41)

Denaturacija in hibridizacija vzorcev, pripravljenih z uporabo QIASymphony SP

Rezultat priprave vzorcev na QIASymphony SP je hibridizacijska mikroplošča, ki vsebuje vsaj pripravljene vzorce.

Če so bili vzorci PreservCyt pripravljeni z uporabo QIASymphony SP, je prva kolona hibridizacijske mikroplošče prazna. Vsebina mikroplošče je pripravljena za korak denaturacije. Kalibratorje in kontrole kakovosti dodate na hibridizacijsko mikroploščo ročno ali med avtomatiziranim testiranjem z RCS, nato pa izvedete korak denaturacije.

Če so bili vzorci SurePath ali vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath pripravljeni z uporabo QIASymphony SP, plošča vsebuje pripravljene vzorce z denaturiranimi kalibratorji in kontrolami kakovosti, pipetiranimi v prvo kolono hibridizacijske mikroplošče. Vsebina mikroplošče je pripravljena za korak hibridizacije z avtomatiziranim testiranjem z RCS.

Pomembno: Ekstrakte vzorcev, ki nastanejo kot rezultat priprave vzorca z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit, je mogoče testirati samo z uporabo RCS. Ročna izvedba testa z ekstrakti vzorcev ni potrjena.

 Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja vzorcev, pripravljenih z QIASymphony SP, s sistemom RCS si za navodila za dokončanje testiranja oglejte *Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System — Izvajanje testov digene HC2 DNA Test z uporabo obdelanih vzorcev QIASymphony SP*.

Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in eluatov DNK za ročno testiranje

- Ta postopek je namenjen ročnemu testiranju vzorcev PreservCyt, pripravljenih s kompletom QIASymphony DSP AXpH DNA Kit. Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja s sistemom RCS si za navodila za dokončanje testiranja oglejte *Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System — Izvajanje testov digene HC2 DNA Test z uporabo obdelanih vzorcev QIASymphony SP*.
- Denaturacija kalibratorjev in kontrol kakovosti se izvaja z uporabo DNR, medtem ko se denaturacija eluatov DNK izvaja z uporabo DNR2.

1. Vsak kalibrator in kontrolo kakovosti vrtinčite 10 sekund pri najvišji nastavitvi.
2. Obrnite vsako epruveto, da vzamete material iz pokrova epruvete.
3. Odstranite pokrovčke z epruvet kalibratorja in kontrole kakovosti ter jih zavrzite.
4. Z enokanalno pipeto dodajte 50 µl ustreznega kalibratorja ali kontrole kakovosti na dno prazne hibridizacijske mikroplošče v skladu z ustvarjeno zasnovo plošče.

Če boste kalibrator in kontrole kakovosti uporabili za dodatno testiranje, zaprite epruvete z novimi zamaški z navojem za epruvete za odvzem vzorcev, jih označite z novim rokom uporabnosti in shranite pri 2–8 °C.

Opomba: Odprti, nedenaturirani kalibratorji in kontrole kakovosti so stabilni 3 mesece pri temperaturi 2–8 °C.

5. Pripravljena DNR in DNR2 temeljito premešajte in alikvotirajte vsakega v ustrezno označeno posodo reagenta za enkratno uporabo.

Pomembno: Prepričajte se, da ste dodali pravi reagent v pravilno kolono mikroplošče z eluatom.

6. Z 8-kanalno pipeto dodajte 25 µl DNR v prvo kolono hibridizacijske mikroplošče, ki vsebuje kalibratorje in kontrole kakovosti.
7. Z 8-kanalno pipeto dodajte 25 µl DNR2 v vsako vdolbinico hibridizacijske mikroplošče, ki vsebuje eluat DNK.

8. Hibridizacijsko mikroploščo pokrijte s pokrovom plošče in 30 sekund stresajte na stresalniku Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt/min.
9. Postavite mikroploščo v grelnik Microplate Heater I, ki je uravnotežen na 65 ± 2 °C, pri čemer pazite, da ne pride do brizganja. Inkubirajte hibridizacijsko mikroploščo 45 ± 5 minut.

Med to inkubacijo pripravite mešanico sonde (glejte »Mešanica sonde«, stran 30).

10. Odstranite hibridizacijsko mikroploščo iz grelnika Microplate Heater I.

Denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in eluate DNK lahko:

- shranite (glejte »Izbirna točka zaustavitve eluatov DNK«, stran 38)
- testirate takoj (nadaljujte s korakom »Hibridizacija eluatov DNK«, stran 38)

Izbirna točka zaustavitve eluatov DNK

Denaturirane eluate DNK, vključno s kalibratorji in kontrolami kakovosti, pokrite s pokrovom mikroplošče, lahko hranite 2 tedna pri temperaturi 2–8 °C.

Hibridizacija eluatov DNK

1. Če ste hibridizacijsko mikroploščo, ki vsebuje denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in eluate DNK, shranili, odstranite pokrov mikroplošče in pustite, da se hibridizacijska mikroplošča uravnoteži na 20–25 °C.
2. Temeljito zmešajte mešanico sonde in alikvot v posodo za reagent za enkratno uporabo.
3. Previdno pipetirajte 25 µl mešanice sonde v vsako vdolbinico hibridizacijske mikroplošče z uporabo 8-kanalne pipete in novih konic za vsak dodatek mešanice sonde.

Izogibajte se brizganju in dotikanju stranic vdolbinic hibridizacijske mikroplošče.

4. Hibridizacijsko mikroploščo pokrijte s pokrovom mikroplošče in stresajte 3 ± 2 minuti na stresalniku Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt./min.

Kalibratorji, kontrole kakovosti in eluati DNK bi morali po stresanju porumeneti.

Vzorci, ki ostanejo vijolični, morda niso prejeli ustrezne količine mešanice sonde. Vzorcem, ki ostanejo vijolični, dodajte dodatnih 25 µl mešanice sonde in ponovno pretresite. Če vzorec po tem postopku ostane vijoličen, ga znova testirajte.

5. Postavite mikroploščo v grelnik Microplate Heater I, ki je uravnotežen na 65 ± 2 °C, pri čemer pazite, da ne pride do brizganja. Inkubirajte hibridizacijsko mikroploščo 60 ± 5 minut.
6. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte na korak »Zajem hibridov«, stran 44.

Denaturacija in hibridizacija vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

- Pri testiranju ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath korak denaturacije ni potreben. Vendar pa morate kalibratorje in kontrole kakovosti, ki so potrebni s testom, denaturirati v skladu s spodnjimi navodili.
- Nekateri vzorci STM lahko vsebujejo kri ali drug biološki material, ki lahko po dodajanju DNR prikrije spremembe barve. Vzorci, ki so temno obarvani pred dodatkom DNR, v tem koraku morda ne bodo ustrezno spremenili barve. V teh primerih nezmožnost prikazovanja ustrezne spremembe barve ne bo vplivala na rezultate testa. Pravilno mešanje je mogoče preveriti z opazovanjem spremembe barve kalibratorjev in kontrol kakovosti.

Denaturacija kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev STM

- Naprave za odvzem vzorcev nikoli ne odstranjujte iz epruvete za vzorce.
- Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, je ključnega pomena, da ves material vzorca pride v stik z DNR. Mešanje po dodajanju DNR je ključni korak.
- Pri vzorcih STM, denaturiranih z metodo z MST Vortexer 2, morate uporabiti metodo »Hibridizacija z uporabo mikroplošče in grelnika Microplate Heater I« na strani 42. Metoda »Hibridizacija z uporabo mikroepruвет in vodne kopeli« (stran 43) ni bila potrjena z vzorci STM, denaturiranimi z MST Vortexer 2.

1. Odstranite pokrovčke z epruвет in jih zavrzite.

Pomembno: Pokrovčke, odstranjene iz epruвет z vzorci STM, obravnavajte kot potencialno kužne (za dodatne informacije glejte »Opozorila in previdnostni ukrepi«, stran 19).

2. S ponavljajočo ali nastavljivo pipeto pipetirajte določeno količino (glejte Preglednica 9 spodaj) DNR v epruветe.

Pazite, da se ne dotikate stranic epruвет, sicer lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev.

Pomembno: Kompleti z 1 in 4 ploščami imajo različne količine za kalibrator za HPV z visokim tveganjem. Prepričajte se, da ste dodali pravilno količino DNR.

Opomba: Količina dodanega DNR je enaka polovici količine tekočine v epruветi.

Preglednica 9. Dodajanje DNR

Kalibrator, kontrola kakovosti ali vzorec STM	Potrebna količina DNR
Negativni kalibrator, 2 ml	1000 µl
Kalibrator za HPV z visokim tveganjem, 1 ml	500 µl
Kalibrator za HPV z visokim tveganjem, 2 ml	1000 µl
Kontrola kakovosti za HPV z nizkim ali visokim tveganjem, 1 ml	500 µl
Vzorec STM, 1 ml	500 µl

3. Epruvete zmešajte bodisi z metodo z MST Vortexer 2 ali ročno metodo vrtnčenja posameznih epruvet.

Metoda MST Vortexer 2

- a. Pokrijte epruvete s tesnilnim filmom za epruvete DuraSeal, tako da povlečete film čez epruvete v stojalu za vzorce.
- b. Pokrov stojala postavite na epruvete, prekrite s filmom, in ga pritrdite z 2 stranskima sponkama. Folijo odrežite z napravo za rezanje.
- c. Premaknite ročico z rdečim ročajem navzgor, tako da je v vodoravnem položaju.
- d. Namestite stojalo za vzorce z vodili na MST Vortexer 2 tako, da bo največji zarezan vogal stojala v desnem sprednjem kotu. Zavarujte stojalo za vzorce tako, da premaknete ročico z rdečim ročajem navzdol, tako da je v navpičnem položaju.
- e. Prepričajte se, da je nastavitev hitrosti 100 (največja hitrost) in vklopite MST Vortexer 2.
- f. Epruvete vrtnčite 10 sekund.
- g. Izklopite MST Vortexer 2.
- h. Odstranite stojalo za vzorce iz MST Vortexer 2 tako, da premaknete ročico z rdečim ročajem navzgor.

Metoda ročnega vrtnčenja posamezne epruvete

- a. Ponovno zaprite epruvete z novimi zamaški z navojem za epruvete za odvzem vzorcev.
- b. Vsako epruveto posebej temeljito premešajte z vrtnčenjem pri visoki hitrosti 5 sekund.
Pomembno: Med mešanjem morate opaziti vidno vrtnčenje tekočine, ki spere celotno notranjo površino epruvete.
- c. Vsako epruveto z vzorcem enkrat obrnite, da operete notranjost epruvete, pokrovček in rob.
- d. Epruveto vrnite v stojalo.

Tekočina v epruveti mora postati vijolična.

4. Epruvete inkubirajte v stojalu v vodni kopeli pri 65 ± 2 °C 45 ± 5 minut.

Za ročno testiranje med to inkubacijo pripravite mešanico sonde (glejte »Mešanica sonde«, stran 30).

5. Po inkubaciji odstranite epruvete iz vodne kopeli.

Če uporabljate stojalo za vzorce, ne pustite, da se ohladi, preden odstranite pokrov stojala. Takoj nadaljujte s testiranjem ali odstranite pokrov stojala in tesnilni film za epruvete DuraSeal.

Opomba: Če se stojalo za vzorce ohladi, se lahko epruvete prilepijo na pokrov stojala in se nato razlijejo.

Denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce STM lahko:

- shranite (glejte »Izbirna točka zaustavitve pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath«, stran 41)
- testirate takoj (nadaljujte s korakom »Hibridizacija pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath«, stran 41)

Izbirna točka zaustavitve pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

Pomembno: Denaturiranih vzorcev ne shranjujte ali pošiljajte na suhem ledu.

Vse pripravljene vzorce, vključno s kalibratorji in kontrolami kakovosti, lahko shranite pri temperaturi 2–8 °C čez noč ali pri temperaturi –20 °C do 3 mesece. Izvedete lahko največ 3 cikle zamrzovanja/odmrzovanja z največ 2 urama pri sobni temperaturi med vsakim ciklom odmrzovanja.

Za shranjevanje čez noč pri temperaturi 2–8 °C v stojalu za vzorce pokrijte vzorce s tesnilnim filmom za epruvete DuraSeal in zamenjajte pokrov stojala.

Za shranjevanje pri temperaturi –20 °C v stojalu za vzorce odstranite pokrov stojala in tesnilni film za epruvete DuraSeal ter na epruvete namestite ustrezen pokrov.

Hibridizacija pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

 Pri izvajanju avtomatiziranega testiranja vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath s sistemom RCS si za navodila za dokončanje testiranja oglejte *Uporabniški priročnik za sistem Rapid Capture System*.

Če so bili denaturirani kalibratorji, kontrole kakovosti ali vzorci shranjeni, jih pustite, da se uravnotežijo na 20–25 °C ter in če so shranjeni v stojalu za vzorce, odstranite pokrovčke z epruvet in jih zavrzite.

- Za vzorce STM ter ročno pripravljene vzorce PreservCyt in vzorce celičnega peleta po gradientu SurePath sta na voljo dve metodi hibridizacije: »Hibridizacija z uporabo mikroplošče in grelnika Microplate Heater I« in »Hibridizacija z uporabo mikroepruvet in vodne kopeli«.
- Pri vzorcih STM, denaturiranih z metodo z MST Vortexer 2, morate uporabiti metodo »Hibridizacija z uporabo mikroplošče in grelnika Microplate Heater I« na strani 42. Metoda »Hibridizacija z uporabo mikroepruvet in vodne kopeli« (stran 43) ni bila potrjena z vzorci STM, denaturiranimi z MST Vortexer 2.
- Mešanica sonde je viskozna. Prepričajte se, da je mešanica sonde temeljito premešana in da je zahtevana količina popolnoma odmerjena na vsako hibridizacijsko mikroploščo ali v hibridizacijsko mikroepruveto.
- Pri prenašanju vzorca na hibridizacijsko mikroploščo ali v hibridizacijsko mikroepruveto se ne dotikajte stranic vdolbinic hibridizacijske mikroplošče ali hibridizacijske mikroepruvete, saj lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov, če vzorcev ne prenesete previdno. Omejite nastajanje zračnih mehurčkov. Za vsak prenos uporabite čisto, izjemno dolgo konico pipete, da preprečite navzkrižno kontaminacijo.

Hibridizacija z uporabo mikroplošče in grelnika Microplate Heater I

1. Pridobite in označite hibridizacijsko mikroploščo.
2. Vrtinčite na enega od naslednjih načinov:

Kalibratorji, kontrole kakovosti ali vzorci STM z MST Vortexer 2

- a. Po potrebi pokrijte epruvete s tesnilnim filmom za epruvete DuraSeal in pritrdite pokrov za stojalo na stojalo za vzorce.
- b. Stojalo za vzorce vrtinčite najmanj 5 sekund pri najvišji nastavitvi hitrosti.
- c. Stojalo za vzorce takoj postavite na vrh mize in sprostite zapahe. Dvignite pokrov stojala za približno 1 cm in ga nežno premikajte levo in desno, da sprostite vse epruvete, ki so se morda prilepile na tesnilni film za epruvete DuraSeal. Odstranite pokrov stojala tako, da ga dvignete naravnost navzgor, dokler ne izstopi iz stojala za vzorce.
- d. Previdno odlepите tesnilni film za epruvete DuraSeal s pokrova stojala in ga zavrzite.

Vzorci PreservCyt ali vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath z MST Vortexer 2

- a. Po potrebi pokrijte epruvete s tesnilnim filmom za epruvete DuraSeal in pritrdite pokrov za stojalo na stojalo za vzorce.
- b. Vrtinčite konverzijsko stojalo najmanj 10 sekund pri najvišji nastavitvi hitrosti.
- c. Stojalo za vzorce takoj postavite na vrh mize in sprostite zapahe. Dvignite pokrov stojala za približno 1 cm in ga nežno premikajte levo in desno, da sprostite vse epruvete, ki so se morda prilepile na tesnilni film za epruvete DuraSeal. Odstranite pokrov stojala tako, da ga dvignete naravnost navzgor, dokler ne izstopi iz stojala za vzorce.
- d. Previdno odlepите tesnilni film za epruvete DuraSeal s pokrova stojala in ga zavrzite.

Katera koli vrsta vzorca z vibracijskim mešalnikom

- a. Vsako epruveto posebej vrtinčite vsaj 5 sekund.
3. S pipeto EXPAND-4 ali enokanalno pipeto z izjemno dolgo konico prenesite 75 µl ustreznega kalibratorja, kontrole kakovosti ali vzorca na dno prazne hibridizacijske mikroplošče v skladu z ustvarjeno zasnovo plošče.
Če boste vzorce shranili, zaprite denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce STM z novimi pokrovčki z navojem za epruvete za odvzem vzorcev in namestite originalni pokrovček za vsak vzorec na vzorce PreservCyt in vzorce celičnega peleta po gradientu SurePath.
Opomba: Vzorce shranite v skladu z mejnimi vrednostmi, navedenimi v »Izbirna točka zaustavitve pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath«, stran 41.
 4. Po prenosu zadnjega vzorca pokrijte hibridizacijsko mikroploščo s pokrovom za mikroploščo in inkubirajte 10 minut pri temperaturi 20–25 °C.
 5. Temeljito zmešajte mešanico sonde in alikvot v posodo za reagent za enkratno uporabo.
 6. Previdno pipetirajte 25 µl mešanice sonde v vsako vdolbinico hibridizacijske mikroplošče z uporabo 8-kanalne pipete in novih konic za vsak dodatek mešanice sonde.

Izogibajte se brizganju in dotikanju stranic vdolbinic hibridizacijske mikroplošče.

7. Hibridizacijsko mikroploščo pokrijte s pokrovom mikroplošče in stresajte 3 ± 2 minuti na stresalniku Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt./min.

Po stresanju se morajo kalibratorji, kontrole kakovosti, vzorci STM in vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath obarvati rumeno, vzorci PreservCyt pa rožnato.

Vzorci, ki ostanejo vijolični, morda niso prejeli ustrezne količine mešanice sonde. Vzorcem, ki ostanejo vijolični, dodajte dodatnih 25 μ l mešanice sonde in ponovno pretresite. Če vzorec po tem postopku ostane vijoličen, ga znova testirajte.

8. Postavite mikroploščo v grelnik Microplate Heater I, ki je uravnotežen na 65 ± 2 °C, pri čemer pazite, da ne pride do brizganja. Inkubirajte hibridizacijsko mikroploščo 60 ± 5 minut.
9. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte na korak »Zajem hibridov«, stran 44.

Hibridizacija z uporabo mikroeprevet in vodne kopeli

1. Označite in postavite potrebno število čistih hibridizacijskih mikroeprevet v stojalo za mikroeprevete.
2. Vsak kalibrator, kontrolo kakovosti in epruveto z vzorcem posebej stresajte vsaj 5 sekund, preden odstranite vzorec.
3. Z enokanalno pipeto z izjemno dolgo konico pipete prenesite 75 μ l ustreznega kalibratorja, kontrole kakovosti ali vzorca na dno ustrezne hibridizacijske mikroeprevete v skladu z ustvarjeno zasnovno ploščo.

Če boste vzorce shranili, zaprite denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce STM z novimi pokrovčki z navojem za epruvete za odvzem vzorcev in namestite originalni pokrovček za vsak vzorec na vzorce PreservCyt in vzorce celičnega peleta po gradientu SurePath.

Opomba: Vzorce shranite v skladu z mejnimi vrednostmi, navedenimi v »Izbirna točka zaustavitve pripravljenih vzorcev STM ter ročno pripravljenih vzorcev PreservCyt in vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath«, stran 41.

4. Po prenosu zadnjega vzorca inkubirajte hibridizacijske mikroeprevete 10 minut pri temperaturi 20–25 °C.
5. Temeljito zmešajte mešanico sonde in alikvot v posodo za reagent za enkratno uporabo.
6. Z 8-kanalno pipeto in novimi konicami za vsako vrsto previdno pipetirajte 25 μ l mešanice sonde v vsako hibridizacijsko mikroepreveto.

Izogibajte se brizganju in dotikanju stranic hibridizacijskih mikroeprevet.

Preglejte stojalo od spodaj in se prepričajte, da so vse hibridizacijske mikroeprevete prejele ustrezno količino mešanice sonde.

7. Hibridizacijske mikroeprevete pokrijte s tesnilom za plošče. Namestite pokrov stojala na vrh stojala. Stresajte stojalo za mikroeprevete na Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt./min, 3 ± 2 minuti.

Po stresanju se morajo kalibratorji, kontrole kakovosti, vzorci STM in vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath obarvati rumeno, vzorci PreservCyt pa rožnato.

Vzorci, ki ostanejo vijolični, morda niso prejeli ustrezne količine mešanice sonde. Vzorcem, ki ostanejo vijolični, dodajte dodatnih 25 μ l mešanice sonde in ponovno pretresite. Če vzorec po tem postopku ostane vijoličen, ga znova testirajte.

8. Inkubirajte stojalo z mikroeprevetami 60 ± 5 minut v vodni kopeli pri 65 ± 2 °C.
Prepričajte se, da je nivo vode v vodni kopeli zadosten, da pokrije celotno količino hibridizacijske mikroeprevete.
Opomba: Stojalo za mikroeprevete bo plavalo v vodni kopeli.
9. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte s korakom »Zajem hibridov«.

Zajem hibridov

1. Z okvirja plošče odstranite vse vdolbinice mikroplošče za zajemanje, razen zahtevanih.
2. Neuporabljene vdolbinice mikroplošče za zajem vrnite v originalno vrečko in ponovno zaprite.
3. Z označevalcem zaporedno oštevilčite vsako kolono in označite mikroploščo za zajem z ustreznim identifikatorjem.

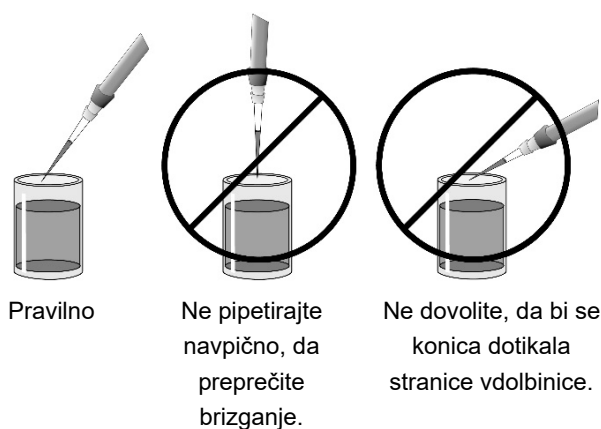
Vzorci bodo dodani v vdolbinice mikroplošče za zajem v skladu z ustvarjeno zasnovo plošče.

4. Po potrebi previdno odstranite hibridizacijsko mikroploščo iz grelnika Microplate Heater I ali stojala za mikroeprovete iz vodne kopeli.

Takoj odstranite pokrov mikroplošče in ga postavite na čisto površino ali pa odstranite pokrov stojala in počasi povlecite tesnilo plošče navzgor in čez stojalo za mikroeprovete.

5. Z 8-kanalno pipeto prenesite celotno vsebino (približno 100 µl) vdolbinic hibridizacijske mikroplošče ali hibridizacijskih mikroeprevet na dno ustreznih vdolbinic mikroplošče za zajem.

Za vsak prenos uporabite nove konice pipete in pustite, da se vsaka konica pipete odteče, da zagotovite popoln prenos vzorca. Če želite, lahko pipeto umirite tako, da sredino konice pipete naslonite na zgornji rob vdolbinice mikroplošče za zajem (glejte Slika 2 spodaj).



Slika 2. Pravilno pipetiranje.

6. Mikroploščo za zajem pokrijte s pokrovom mikroplošče ali novim tesnilom plošče in stresajte na stresalniku Rotary Shaker I pri 1100 ± 100 obratih na minuto 60 ± 5 minut pri temperaturi $20-25^{\circ}\text{C}$.

Med to inkubacijo pripravite pufer za spiranje (glejte »Pufer za spiranje«, stran 32).

7. Ko je inkubacija končana, odstranite mikroploščo za zajem iz stresalnika Rotary Shaker I in previdno odstranite pokrov mikroplošče ali tesnilo plošče.
8. Odstranite tekočino iz vdolbinic mikroplošče za zajem tako, da jo zavržete v umivalnik; mikroploščo za zajem v celoti obrnite nad umivalnik in močno stresite z gibom navzdol.

Pomembno: Mikroplošče ne obračajte znova.

Prepričajte se, da ne povzročite brizganja z odlivanjem preblizu dna umivalnika.

9. Popivajte tako, da 2–3-krat močno potapkate po čistih brisačah Kimtowels ali enakovrednih papirnatih brisačah z malo vlaken.

Prepričajte se, da je iz vdolbinic mikroplošče za zajem odstranjena vsa tekočina in da je vrh mikroplošče za zajem suh.

10. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte s korakom »Zaznavanje hibridov«.

Zaznavanje hibridov

- Z 8-kanalno pipeto dodajte reagent po mikroplošči za zajem v smeri od leve proti desni. Obrišite konice posode za reagent za enkratno uporabo, da odstranite odvečni reagent pred prenosom na mikroploščo.
 - Če 8-kanalne pipete ne uporabljate, jo lahko nadomestite s ponavljajočo pipeto. Alikvotirajte DR1 v dovolj veliko polipropilensko epruveto, da lahko vsebuje zahtevano količino.
 - Priporočljivo je, da se za izboljšanje doslednosti dovajanja reagenta uporabi tehnika obratnega pipetiranja. Postopek je opisan spodaj.
 - Če želite, lahko pipeto umirite tako, da sredino konice pipete naslonite na zgornji rob vdolbinice mikroplošče za zajem. Pazite, da se ne dotikate stranic vdolbinic mikroplošče za zajem, saj lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev (glejte Slika 2, stran 44).
1. Temeljito premešajte DR1 in previdno prenesite ustrezno količino (kot je primerno; glejte Preglednica 1, stran 27, oz. Preglednica 4, stran 28) v čisto posodo reagenta za enkratno uporabo.
 2. Z obratnim pipetiranjem previdno pipetirajte 75 µl DR1 v vsako vdolbinico mikroplošče za zajem, in sicer:
 - a. Pritrdite konice na 8-kanalno pipeto; poskrbite, da so vse konice trdno nameščene.
 - b. Potisnite bat pipete prek prvega omejevalnika do drugega omejevalnika.
 - c. Potopite konice v reagent.
 - d. Počasi sprostite bat in pustite, da reagent napolni konice.
 - e. Odmerite reagent v vdolbinice mikroplošče tako, da pritisnete bat do konca. Ne izpustite bata, dokler konice pipete niso potopljene v reagent.
 - f. Ponovno napolnite konice in ponavljajte, dokler niso napolnjene vse vdolbinice mikroplošče.Z opazovanjem intenzivnosti rožnate barve se prepričajte, da so vse vdolbinice mikroplošče za zajem napolnjene. Vse vdolbinice mikroplošče za zajeme morajo imeti podobno intenzivno rožnato barvo.
 3. Mikroploščo za zajem pokrijte s pokrovom mikroplošče, čistim filmom Parafilm ali podobnim in inkubirajte 30–45 minut pri temperaturi 20–25 °C.
 4. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte s korakom »Pranje«.

Pranje

Mikroploščo za zajem operite z eno od spodnjih metod.

Metoda avtomatiziranega pralnika plošč

Avtomatiziran pralnik plošč naj bo vedno VKLOPLJEN. Prepričajte se, da je rezervoar za izpiranje napolnjen in rezervoar za odpadke prazen. Avtomatiziran pralnik plošč bo redno izpiral sistem za čiščenje. Za dodatna navodila glejte *Uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč*.

- Prepričajte se, da je rezervoar za izpiranje napolnjen s pufrom za spiranje vsaj do oznake 1 liter. Če ni, pripravite pufer za spiranje (glejte »Pufer za spiranje«, stran 32).
- Prepričajte se, da je rezervoar za izpiranje napolnjen z deionizirano ali destilirano vodo.
- Prepričajte se, da je rezervoar za odpadke prazen in da je pokrov dobro pritrjen.
- Avtomatiziran pralnik plošč se samodejno napolni pred vsakim pranjem in izpere po vsakem pranju.
- Če uporabljate samo delni trak vdolbinic za zajem, morate prazne vdolbinice mikroplošče postaviti v ploščo za zajem, da se kolona konča pred izpiranjem.

1. Odstranite pokrov mikroplošče in postavite mikroploščo za zajem na ploščo avtomatiziranega pralnika plošč.
2. Prepričajte se, da je avtomatiziran pralnik plošč vklopljen in da zaslon prikazuje Digene Wash Ready (Pranje Digene pripravljeno) ali P1.
3. S pritiskom na gumb Rows (Vrstice) izberite število trakov za pranje, z gumboma + ali – pa prilagodite število.
4. Pritisnite gumb Rows (Vrstice), da se vrnete na zaslon Digene Wash Ready (Pranje Digene pripravljeno) ali P1.
5. Pritisnite gumb Start/Stop (Zagon/zaustavitev) za zagon.

Avtomatiziran pralnik plošče bo izvedel 6 ciklov polnjenja in aspiracije, ki bodo trajali približno 10 minut. Med programom bo kratek premor; pazite, da mikroplošče ne odstranite prehitro.

Ko avtomatiziran pralnik plošč konča s pranjem, se na njem izpiše Digene Wash Ready ali P1.

6. Ko je program končan, odstranite mikroploščo za zajem s plošče avtomatiziranega pralnika plošč.
Mikroplošča za zajem mora izgledati belo in v vdolbinicah mikroplošče za zajem ne sme ostati ostankov rožnate tekočine.
7. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte na korak »Pomnoževanje signala«, stran 47.

Ročna metoda spiranja

1. Odstranite DR1 iz vdolbinic mikroplošče za zajem tako, da na vrh mikroplošče za zajem položite čiste brisače Kimtowels ali enakovredne papirnate brisače z malo vlaken.
2. Prepričajte se, da so papirnate brisače v stiku s celotno površino mikroplošče za zajem in previdno obrnite mikroploščo.
3. Počakajte 1–2 minuti, da se mikroplošča za zajem odteče.
4. Dobro popivnjajte s čistimi brisačami Kimtowels ali enakovrednimi papirnatimi brisačami z malo vlaken.

Uporabljene papirnate brisače previdno zavrzite, da preprečite kontaminacijo z alkalno fosfatazo.

5. Z napravo za pranje ročno šestkrat operite mikroploščo za zajem.

Za pravilno pranje vsako mikroploščo za zajem dobro prelijte s pufrom za spiranje. S tem boste odstranili DR1 z vrhov vdolbinic mikroplošče za zajem. Pranje se začne pri vdolbinici mikroplošče za zajem A1 in se nadaljuje v vijugasti obliki v desno in navzdol. Ko so vse vdolbinice mikroplošče za zajem napolnjene, izpraznite tekočino v umivalnik z močnim gibom navzdol. Drugo pranje se začne pri vdolbinici mikroplošče za zajem H12 in se nadaljuje v vijugasti obliki v levo in navzgor. To zaporedje 2 pranj se ponovi še dvakrat za skupno 6 pranj na vdolbinico mikroplošče za zajem.

6. Po pranju popivnjajte mikroploščo za zajem tako, da jo obrnete na čiste brisače Kimtowels ali enakovredne papirnate brisače z malo vlaken in jo tri- do štirikrat močno potapkate. Zamenjajte papirnate brisače in ponovno popivnjajte.

7. Mikroploščo za zajem pustite obrnjeno in počakajte 5 minut, da se odcedi. Še enkrat popivnajte mikroploščo za zajem.
Mikroplošča za zajem mora izgledati belo in v vdolbinicah mikroplošče za zajem ne sme ostati ostankov rožnate tekočine.
8. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte na korak »Pomnoževanje signala«, stran 47.

Pomnoževanje signala

- Za ravnanje z DR2 uporabite nov par rokavic.
 - Z 8-kanalno pipeto dodajte reagent po mikroplošči za zajem v smeri od leve proti desni.
 - Če 8-kanalne pipete ne uporabljate, jo lahko nadomestite s ponavljajočo pipeto. Alikvotirajte DR2 v dovolj veliko polipropilensko epruveto, da lahko vsebuje zahtevano količino.
 - Neprekinjeno dodajajte DR2. Inkubacijski čas vseh vdolbinic mikroplošče za zajem mora biti čim bližji.
 - Pazite, da se ne dotikate stranic vdolbinic mikroplošče za zajem in da reagenta ne brizgate po konicah, saj lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev (glejte Slika 2, stran 44).
1. Temeljito premešajte DR2 in previdno prenesite ustrezno količino (kot je primerno; glejte Preglednica 1, stran 27, oz. Preglednica 4, stran 28) v čisto posodo reagenta za enkratno uporabo.
 2. S prej opisano tehniko obratnega pipetiranja (glejte »Zaznavanje hibridov«, stran 45) previdno pipetirajte 75 µl DR2 v vsako vdolbinico mikroplošče za zajem.
Z opazovanjem intenzivnosti rumene barve se prepričajte, da so bile vse vdolbinice mikroplošče za zajemanje natančno napolnjene; vse vdolbinice mikroplošče za zajem morajo imeti podobno intenzivno rumeno barvo.
 3. Mikroploščo za zajem pokrijte s pokrovom mikroplošče in inkubirajte 15 minut (in najpozneje 30 minut inkubacije) pri temperaturi 20–25 °C.
Pomembno: Izogibajte se neposredni sončni svetlobi.
 4. Za nadaljevanje testiranja nadaljujte na korak »Merjenje mikroplošče za zajem in ustvarjanje rezultatov«.

Merjenje mikroplošče za zajem in ustvarjanje rezultatov

1. Izmerite mikroploščo za zajem z instrumentom DML.
Za podrobnosti o merjenju mikroplošče za zajem in ustvarjanju poročil o rezultatih testa glejte uporabniški priročnik za ustrezno programsko opremo. Programska oprema *digene* za analizo testov omogoča vnos ustreznih podatkov o testu.
2. Če niste uporabili celotne mikroplošče za zajem, odstranite uporabljene vdolbinice mikroplošče za zajem iz okvirja mikroplošče; okvir mikroplošče temeljito sperite z destilirano ali deionizirano vodo, posušite in shranite za naslednji test.
3. Zavrzite vse alikvote reagenta in pripravljene reagente, razen če je navedeno drugače.
Pred odstranjevanjem razredčite preostali DNR v steklenički v skladu z nacionalnimi in lokalnimi laboratorijskimi postopki.

Interpretacija rezultatov

Mejna vrednost (CO) testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 1 pg/ml je enakovredna 100.000 kopijam HPV/ml ali 5.000 kopijam HPV na test.

Rezultati testiranja vzorcev STM

Vzorci STM z vrednostjo RLU/CO $\geq 1,0$ veljajo za »pozitivne« za enega ali več tipov HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68.

Vzorci STM z vrednostjo RLU/CO $< 1,0$ veljajo za »negativne« ali »Ni zaznane DNK HPV« za 13 testiranih tipov HPV. Zaporedja DNK HPV z visokim tveganjem so odsotna ali pa so ravni DNK HPV pod mejo zaznave testa.

Rezultati testiranja vzorcev SurePath

Vzorci SurePath z vrednostjo RLU/CO $\geq 1,0$ veljajo za »pozitivne« za enega ali več tipov HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68.

Vzorci SurePath z vrednostjo RLU/CO $< 1,0$ veljajo za »negativne« ali »ni zaznane DNK HPV« za 13 testiranih tipov HPV. Zaporedja DNK HPV so odsotna ali pa so ravni DNK HPV pod mejo zaznave testa.

Rezultati testiranja vzorcev PreservCyt

Vzorci PreservCyt z vrednostjo RLU/CO $\geq 1,0$ veljajo za »pozitivne« za enega ali več tipov HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68.

Vzorci PreservCyt z vrednostjo RLU/CO $< 1,0$ veljajo za »negativne« ali »ni zaznane DNK HPV« za 13 testiranih tipov HPV. Zaporedja DNK HPV so odsotna ali pa so ravni DNK HPV pod mejo zaznave testa.

Za vzorce PreservCyt z vrednostjo RLU/CO $\geq 1,0$ in $< 2,5$ družba QIAGEN priporoča ponovno testiranje vzorca, kot sledi:

- Če ima prvi ponovni test vrednost RLU/CO $\geq 1,0$, se vzorec poroča kot »pozitiven«. Nadaljnje testiranje ni potrebno.
- Če ima prvi ponovni test vrednost RLU/CO $< 1,0$, je potreben drugi ponovni test (tretji rezultat). Drugi rezultat je končni rezultat ($< 1,0$ je negativen, $\geq 1,0$ je pozitiven) in se poroča.

Vrednost RLU/CO blizu 1,0

Če je RLU/CO vzorca blizu, vendar manj kot 1,0, in obstaja sum na okužbo s HPV z visokim tveganjem, razmislite o alternativnih metodah testiranja in/ali ponovnem vzorcu.

Druge vrste HPV

Ker ta test zazna samo tipe HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68 z visokim tveganjem, se morate zavedati, da so lahko v vzorcu prisotni tudi drugi tipi HPV z nizkim tveganjem. Če testirate posebej za prisotnost spolno prenosljivega HPV z nizkim tveganjem, uporabite test *digene* HC2 HPV DNA Test, ki zazna vrste DNK HPV z nizkim in visokim tveganjem.

Preverjanje kalibracije analize

Preverjanje umerjanja testa se izvede za zagotovitev, da reagenti, kalibratorji in kontrole kakovosti delujejo pravilno, kar omogoča natančno določanje mejne vrednosti testa. Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zahteva umerjanje testa pri vsakem testu; zato morate preveriti vsak test. Ta postopek preverjanja ni mišljen kot nadomestilo za testiranje notranje kontrole kakovosti. Sprejemljivi razponi za umerjanje testa in kontrole kakovosti so bili določeni samo za instrumente DML, ki jih je odobrila družba QIAGEN.

Umerjanje testa samodejno izvede programska oprema *digene* za analizo testov in se natisne v poročilo o analizi podatkov. Vendar pa morajo uporabniki programske opreme *digene* Qualitative Software, različice 1.03 ali starejše, ročno opraviti preverjanje umerjanja testa, preden lahko poročajo o rezultatih pacientk. Za več informacij se obrnite na tehnične storitve družbe QIAGEN.

Test mora izpolnjevati navedena merila za umerjanje testa. Če katero koli od naslednjih meril ni veljavno, programska oprema ne bo interpretirala rezultatov vzorca.

Negativni kalibrator

Negativni kalibrator (NC) je treba testirati v treh ponovitvah za vsak test. Povprečje NC mora biti ≥ 10 in ≤ 250 RLU, koeficient variacije (CV) pa mora biti ≤ 25 %. Če je $CV > 25$ %, programska oprema odstrani vrednost RLU, ki je najbolj oddaljena od povprečja, kot izstopajočo vrednost ter ponovno izračuna povprečje in CV z uporabo preostalih vrednosti.

Če CV ostane > 25 %, je umerjanje testa neveljavno in test je treba ponoviti za vse vzorce pacientk. Zato ne poročajte o rezultatih vzorcev pacientk.

Pozitivni kalibrator

HRC je treba testirati v treh ponovitvah za vsak test. CV HRC mora biti ≤ 15 %. Če je $CV > 15$ %, programska oprema odstrani vrednost RLU, ki je najbolj oddaljena od povprečja, kot izstopajočo vrednost ter ponovno izračuna povprečje in CV z uporabo preostalih vrednosti.

Če CV ostane > 15 %, je umerjanje testa neveljavno in test je treba ponoviti za vse vzorce pacientk. Zato ne poročajte o rezultatih vzorcev pacientk.

Povprečje pozitivnega kalibratorja/povprečje negativnega kalibratorja

Programska oprema uporablja $HRC\bar{X}$ in $NC\bar{X}$ za izračun $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Veljaven $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ je opredeljen kot $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$. Če je $HRC\bar{X}/NC\bar{X} < 2,0$ ali > 15 , je umerjanje testa neveljavno in test je treba ponoviti za vse vzorce pacientk. Zato ne poročajte o rezultatih vzorcev pacientk.

Izračun mejne vrednosti

Programska oprema *digene* za analizo testov izračuna in poroča o RLU/CO ter pozitivnih/negativnih rezultatih za vse vzorce. Mejna vrednost za določanje pozitivnih vzorcev je $HRC\bar{X}$. Programska oprema *digene* za analizo testov uporablja vrednosti RLU vzorca za izražanje rezultatov kot RLU/CO vzorca.

Za avtomatizirano testiranje z RCS testni protokol RCS HPV uporabi faktor prilagoditve umerjanja (CAF) 0,8 za veljavni $HRC\bar{X}$. Ta CAF je potreben, da ostanejo značilnosti učinkovitosti avtomatiziranega testiranja z RCS enakovredne ročnemu testiranju. CAF se uporablja samo za rezultate avtomatiziranega testiranja z RCS; zato je ključnega pomena, da izberete pravi testni protokol, da ustvarite natančne rezultate testa.

Kontrole kakovosti

Testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test so priloženi vzorci za kontrolo kakovosti, ki jih morate uporabiti za notranjo kontrolo kakovosti. Priložene kontrole kakovosti so klonirane tarče DNK HPV in niso pridobljene iz divjega tipa HPV. To je enaka vrsta materiala, kot se uporablja za priložene kalibratorje. Dodatne kontrole kakovosti se lahko testirajo v skladu s smernicami ali zahtevami nacionalnih ali lokalnih predpisov ali akreditacijskih organizacij. Priložene kontrole kakovosti ne bodo delovale kot ustrezna kontrola kakovosti za obdelavo raztopine PreservCyt Solution ali tekočine SurePath Preservative Fluid.

Za navodila o vnašanju številke serije in rokov uporabnosti kontrol kakovosti glejte uporabniški priročnik za ustrezno programsko opremo *digene* za analizo testov. Da bi bil test veljaven, mora RLU/CO vsake kontrole kakovosti ustrezati opredeljenim merilom, kot je navedeno v Preglednica 10 spodaj. Če kontrole kakovosti niso znotraj teh razponov, je test neveljaven in ga je treba ponoviti. Zato ne poročajte o rezultatih pacientk.

Preglednica 10. Merila veljavnosti testa kontrol kakovosti

Kontrola kakovosti	Najmanjša RLU/CO	Največja RLU/CO	CV (%)
QC1-LR	0,001	0,999	≤ 25
QC2-HR	2	8	≤ 25

Omejitve

- Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za tipe HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68 ni priporočljiv za oceno suma spolne zlorabe.
- Razširjenost okužbe s HPV v populaciji lahko vpliva na uspešnost. Pozitivne napovedne vrednosti se zmanjšajo pri testiranju populacij z nizko razširjenostjo ali posameznikov brez tveganja okužbe.
- Negativen rezultat testa ne izključuje možnosti okužbe s HPV, ker lahko zelo nizke stopnje okužbe ali napake pri odvzemu vzorca povzročijo lažno negativen rezultat testa. Prav tako ta test ne zazna DNK tipov HPV z nizkim tveganjem (6, 11, 42, 43 in 44).
- Okužba s HPV ni dokončen pokazatelj prisotnosti bolezni materničnega vratu visoke stopnje, niti ne pomeni, da se bo v vseh primerih razvila bolezen materničnega vratu visoke stopnje ali rak.
- Obstaja majhna količina navzkrižne hibridizacije med sondo HPV z visokim tveganjem in tipi HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 in MM9. Bolnice, katerih vzorci vsebujejo visoke ravni teh tipov HPV, so lahko nepravilno napotene na kolposkopijo (15, 35).
- Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je zasnovan za odkrivanje tipov HPV z visokim tveganjem, vključno s 39, 58, 59 in 68. Analitične študije, ki jih je izvedla družba QIAGEN z uporabo klonirane plazmidne DNK HPV, kažejo, da test zazna te tipe pri koncentracijah v razponu od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml. To je enakovredno lastnostim odkrivanja drugih tipov HPV, ki so tarča testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Družba QIAGEN je lahko potrdil odkrivanje teh tipov HPV le v omejenem številu kliničnih vzorcev. Zaradi nizke prevalence teh tipov v splošni populaciji (28) značilnosti učinkovitosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za odkrivanje tipov HPV 39, 58, 59 in 68 niso statistično potrjene.
- Če so v času odvzema vzorca STM za testiranje prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam, kontracepcijskega želeja ali tuša, obstaja verjetnost pridobitve lažno negativnega rezultata, če ti vzorci vsebujejo ravni DNK HPV, ki dajejo vrednosti RLU/CO blizu testne mejne vrednosti.
- Če so v času odvzema vzorca materničnega vratu PreservCyt za pripravo vzorca s kompletom QIASymphony DSP HPV Media Kit prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam, vaginalnega lubrikanta ali krvi, obstaja verjetnost pridobitve lažno negativnega rezultata, če ti vzorci vsebujejo ravni DNK HPV, ki dajejo vrednosti RLU/CO blizu testne mejne vrednosti.
- Če je v času odvzema vzorca materničnega vratu PreservCyt za pripravo vzorca s kompletom QIASymphony DSP AXpH DNA Kit prisoten kontracepcijski žele, lahko pride do lažno negativnega rezultata testa.
- Če so v času odvzema vzorca materničnega vratu SurePath za pripravo vzorca s kompletom QIASymphony DSP HPV Media Kit prisotni kontracepcijski žele, krema proti glivicam ali krema proti vnetju, lahko pride do lažno negativnega rezultata testa.
- Možna je navzkrižna reaktivnost med sondo HPV z visokim tveganjem in plazmidom pBR322. Poročali so o prisotnosti homolognih zaporedij pBR322 v vzorcih človeških genitalij, do lažno pozitivnih rezultatov pa bi lahko prišlo v prisotnosti visokih ravni bakterijskega plazmida.
- Če pri izvajanju avtomatiziranega testiranja z RCS ne opazujete hibridizacijske plošče, da bi se prepričali o pravilnem prenosu vzorca, in ne popravite morebitnega neustreznega prenosa vzorca, lahko pride do lažno negativnih rezultatov.

Značilnosti učinkovitosti

Klinična uspešnost pri presejanju bolnic z normalnimi rezultati brisa Pap kot pomoč pri oceni tveganja za zdravljenje bolnic

Spodaj so opisani rezultati 8 neodvisnih kliničnih študij, ki so jih izvedle ugledne medicinske, akademske in vladne ustanove v centrih v ZDA in tujini. V študijah so bile uporabljene uveljavljene metode Pap, ki se uporabljajo v državah, v katerih je bila študija izvedena. V vseh primerih, razen v dveh, je bil za interpretacijo rezultatov brisa Pap uporabljen sistem ocenjevanja Bethesda. Za enakovredno terminologijo presejalnih testov za raka materničnega vratu v Evropski skupnosti si oglejte Evropske smernice za zagotavljanje kakovosti presejalnih testov za raka materničnega vratu (36). Poleg tega je bila z biopsijo, usmerjeno v kolposkopijo, za vsako študijo diagnosticirana huda bolezen materničnega vratu. Te študije so ocenile klinično uporabnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z visokim tveganjem v primerjavi z brisom Pap za starejše ženske (običajno starejše od 30 let). Vse razen ene študije so izvedle tudi prospektivno testiranje na HPV z uporabo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Študije so bile presečne presejalne študije splošne populacije, ki so uporabljale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z visokim tveganjem, razen če ni drugače navedeno spodaj. Dve študiji sta bili izvedeni v ZDA, dve v Evropi, dve v Latinski Ameriki, ena v Afriki in ena v Aziji.

Učinkovitost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, ugotovljena v 6 presečnih študijah (glejte Preglednica 11 in 12 spodaj), je povzeta za ženske, stare 30 let in več, s histološko potrjeno neoplazijo materničnega vratu visoke stopnje, ki je opredeljena kot cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) 3 ali hujša.

Preglednica 11. Ocene učinkovitosti – občutljivost in specifičnost

Populacija	n	Občutljivost (%)			Specifičnost (%)		
		(n/n)			(n/n)		
		95-% interval zaupanja (IZ)			95 % IZ		
		Samo Pap	Samo HPV	HPV + Pap	Samo Pap	Samo HPV	HPV + Pap
Zahodna Evropa 1	7592	51,6 (14/27) 32,0–71,3	96,3 (26/27) 81,0–99,9	100,0 (27/27) 87,2–100,0	98,5 (7453/7565) 98,2–98,8	96,2 (7275/7565) 95,7–96,6	95,1 (7193/7565) 94,6–95,6
Latinska Amerika 1	6115	58,4 (45/77) 46,68–69,6	94,8 (73/77) 87,2–98,6	97,4 (75/77) 90,9–99,7	98,7 (5962/6038) 98,4–99,0	93,9 (5669/6038) 93,3–94,5	93,4 (5637/6038) 92,7–94,0
Latinska Amerika 2*	6176	77,9 (53/68) 66,2–87,1	89,7 (61/68) 79,9–95,8	94,1 (64/68) 85,6–98,4	94,1 (5745/6108) 93,4–94,6	94,0 (5742/6108) 93,4–94,6	89,9 (5490/6108) 89,1–90,6
Afrika	2925	84,1 (90/107) 75,8–90,5	89,7 (96/107) 82,4–94,8	92,5 (99/107) 85,8–96,7	86,4 (2436/2818) 85,1–87,7	80,0 (2253/2818) 78,4–81,4	76,4 (2152/2818) 74,8–77,9
Azija	1936	97,6 (41/42) 87,4–99,9	100,0 (42/42) 91,6–100,0	100,0 (42/42) 91,6–100,0	76,3 (1445/1894) 74,3–78,2	83,0 (1572/1894) 81,2–85,0	68,0 (1287/1894) 65,8–70,1
ZDA 1	1040	50,0 (1/2) 1,26–98,7	100,0 (2/2) 15,8–100,0	100,0 (2/2) 15,8–100,0	97,6 (1013/1038) 96,5–98,4	96,2 (999/1038) 94,9–97,3	95,5 (991/1038) 94,0–96,7

* Podatki o testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, kjer so na voljo, podatki HCS uporabljeni drugače; združeni podatki.

Preglednica 12. Ocene učinkovitosti – pozitivna in negativna napovedna vrednost

Populacija	n	Razširjenost CIN 3 (%)	Pozitivna napovedna vrednost (%)			Negativna napovedna vrednost (%)		
		(n/n)	(n/n)			(n/n)		
		95 % IZ	Samo Pap	Samo HPV	HPV + Pap	Samo Pap	Samo HPV	HPV + Pap
Zahodna Evropa 1	7592	0,36	11,1	8,23	6,77	99,83	99,99	100,0
		(27/7592)	(14/126)	(26/316)	(27/399)	(7453/7466)	(7275/7276)	(7193/7193)
		0,23–0,52	6,2–17,9	5,5–11,8	4,5–9,7	99,7–99,9	99,9–100,0	99,9–100,0
Latinska Amerika 1	6115	1,26	37,2	16,5	15,8	99,47	99,93	99,96
		(77/6115)	(45/121)	(73/442)	(75/476)	(5962/5994)	(5669/5673)	(5637/5639)
		0,99–1,57	28,6–46,4	13,2–20,3	12,6–19,4	99,3–99,6	99,8–100,0	99,9–100,0
Latinska Amerika 2*	6176	1,10	12,7	14,3	9,4	99,74	99,88	99,93
		(68/6176)	(53/416)	(61/427)	(64/682)	(5745/5760)	(5742/5749)	(5490/5494)
		0,86–1,39	9,7–16,3	11,1–18,0	7,3–11,8	99,6–99,9	99,8–100,0	99,8–100,0
Afrika	2925	3,66	19,1	14,5	12,9	99,31	99,51	99,63
		(107/2925)	(90/472)	(96/661)	(99/765)	(2436/2453)	(2253/2264)	(2152/2160)
		3,01–4,40	15,6–22,9	11,9–17,4	10,6–15,5	98,9–99,6	99,1–99,8	99,3–99,8
Azija	1936	2,17	8,37	11,5	6,47	99,93	100,0	100,0
		(42/1936)	(41/490)	(42/364)	(42/649)	(1445/1446)	(1572/1572)	(1287/1287)
		1,57–2,92	6,1–11,2	8,4–15,3	4,7–8,7	99,6–100,0	99,8–100,0	99,7–100,0
ZDA 1	1040	0,19	3,85	4,88	4,08	99,90	100,0	100,0
		(2/1040)	(1/26)	(2/41)	(2/49)	(1013/1014)	(999/999)	(991/991)
		0,02–0,69	0,1–19,6	0,6–16,5	0,5–14,0	99,5–100,0	99,6–100,0	99,6–100,0

* Podatki o testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, kjer so na voljo, podatki HCS uporabljeni drugače; združeni podatki.

V vseh študijah je prišlo do enotnega in pogosto zelo pomembnega izboljšanja občutljivosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test v primerjavi s samim brisom Pap. Tako kot pri občutljivosti tudi negativna napovedna vrednost (NPV) HPV v vseh primerih presega vrednost samo Pap in se približuje 100 %. Ta negativna napovedna vrednost dokazuje visoko verjetnost odsotnosti hude bolezni materničnega vratu ali raka pri ženskah z normalno citologijo, ki niso okužene s HPV.

Čeprav je specifičnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test nižja kot pri samem Pap, je analiza razmerja verjetnosti pokazala, da opaženo zmanjšanje specifičnosti ni dovolj pomembno, da bi vplivalo na klinično uporabnost uporabe testa za identifikacijo žensk, pri katerih obstaja malo ali nič tveganja, da imajo ali razvijejo bolezen materničnega vratu. Kljub temu je pomembno, da odločitev o napotitvi bolnice na kolposkopijo temelji na vseh kliničnih podatkih in informacijah o tveganju ter bolnikovi anamnezi, ki so na voljo zdravniku. Pomembne spremenljivke vključujejo anamnezo okužbe s HPV in/ali nenormalen bris Pap, starost ob prvem spolnem odnosu, število spolnih partnerjev in sočasne spolno prenosljive bolezni (37, 38).

Čeprav se razširjenost bolezni visoke stopnje ne razlikuje bistveno med študijami, iz katerih je bila določena uspešnost, lahko razširjenost okužbe s HPV v populaciji vpliva na uspešnost in se običajno razlikuje glede na populacijo bolnic. Poleg tega se je pokazalo, da se razširjenost okužbe s HPV dramatično zmanjšuje s starostjo (17, 24–29, 38–40). Pozitivne napovedne vrednosti se zmanjšajo pri testiranju populacij z nizko razširjenostjo ali posameznic z majhnim tveganjem za okužbo.

Longitudinalna analiza je bila izvedena z uporabo rezultatov dveh študij; eno je v Združenih državah izvedel Nacionalni inštitut za raka (NCI) v Portlandu v Oregonu, drugo pa v Franciji v Laboratoire Pol Bouin CHU de Reims. Te longitudinalne analize so bile izvedene, da bi dokazali, da so Pap-negativne/HPV-negativne bolnice izpostavljene manjšemu tveganju za bolezen materničnega vratu v primerjavi s tradicionalno opredeljenimi ženskami z nizkim tveganjem, katerih stanje HPV ni znano, in v primerjavi s Pap-negativnimi/HPV-pozitivnimi bolnicami (glejte Preglednica 13 in 14 spodaj).

Preglednica 13. Longitudinalna analiza — relativno tveganje za bolezen visoke stopnje

Študijska skupina	Starost	Razvrstitev z nizkim tveganjem	n	Primeri CIN 3	Stopnja (na 100 bolnikovih let)	Relativno tveganje (95 % IZ)
NCI	30 in več	Bris Pap normalen, HPV negativen	12.054	28	0,043	0,897 (0,596–1,348)
		Zaporedni normalni brisi Pap*	9429	19	0,048	1,000
	Vse	Bris Pap normalen, HPV negativen	17.594	48	0,056	0,678 (0,514–0,894)
		Zaporedni normalni brisi Pap*	13.392	44	0,082	1,000
Francija	30 in več	Bris Pap normalen, HPV negativen	1690	3	0,084	0,849 (0,307–2,35)
		Zaporedni normalni brisi Pap†	2026	4	0,099	1,000
	Vse	Bris Pap normalen, HPV negativen	2180	3	0,066	0,491 (0,221–1,09)
		Zaporedni normalni brisi Pap†	2650	7	0,136	1,000

* Trije normalni brisi Pap v približno 2 letih.

† Dva normalna brisa Pap v približno 2 letih.

Preglednica 14. Longitudinalna analiza — stopnje bolezni, stratificirane glede na stanje HPV na začetku

Študijska skupina	Starost	Izhodiščno stanje	n	Primeri CIN 3	Stopnja (na 100 bolnikovih let)	Relativno tveganje (95 % IZ)
NCI	30 in več	Bris Pap normalen, HPV pozitiven	1078	24	0,451	10,50 (6,13–18,0)
		Bris Pap normalen, HPV negativen	12.054	28	0,043	1,00
	Vse	Bris Pap normalen, HPV pozitiven	2561	63	0,096	10,64 (7,33–15,5)
		Bris Pap normalen, HPV negativen	17.594	48	0,056	1,00
Francija	30 in več	Bris Pap normalen, HPV pozitiven	419	14	2,346	27,3 (8,41–88,3)
		Bris Pap normalen, HPV negativen	1696	3	0,084	1,00
	Vse	Bris Pap normalen, HPV pozitiven	619	22	2,520	37,0 (11,8–116)
		Bris Pap normalen, HPV negativen	2180	3	0,066	1,00

Klinično uporabnost rezultatov testa HPV dodatno dokazuje povečano tveganje za bolezni materničnega vratu pri HPV-pozitivnih ženskah v primerjavi s HPV-negativnimi ženskami.

Klinična učinkovitost pri presejalnem pregledu pacientk z rezultati brisa Pap ASC-US za določitev potrebe po napotitvi na kolposkopijo

Študija z naslovom »Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears« (Uporabnost testiranja DNK HPV za triažo žensk z mejnimi brisi Pap) je bila izvedena v ZDA leta 1996 pod vodstvom Kaiser Foundation Research Institute in Kaiser Permanente Medical Group. Vzorce materničnega vratu za rutinski bris Pap in za test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test so pridobili od žensk, ki so obiskovale več klinik Kaiser. Začetni bris Pap je bil ovrednoten po klasifikaciji Bethesda. Za enakovredno terminologijo presejalnih testov za raka materničnega vratu v Evropski skupnosti si oglejte Evropske smernice za zagotavljanje kakovosti presejalnih testov za raka materničnega vratu (36). Ženske (15 let ali več) z rezultati brisa Pap ASC-US (atipične celice nedoločenega pomena) so bile ponovno poslani na kolposkopijo in biopsijo. Kolposkopsko usmerjene histološke vzorce so pregledali patologi in postavili začetno diagnozo. Vsak histološki vzorec je pregledal tudi neodvisni patolog, neskladja med začetnim in neodvisnim pregledom pa je presojal tretji patolog.

Začetni vzorec je bil testiran s prototipom testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, ki je vseboval sonde za 11 od 13 tipov HPV (brez tipov HPV 59 in 68). Ni bilo pričakovati, da bo ta razlika povzročila bistveno drugačen profil učinkovitosti za test.

Rezultati testa HPV z visokim tveganjem in histološke diagnoze so bili na voljo pri 885 ženskah z brisom Pap ASC-US. Testiranje na večini bolnic je bilo opravljeno z vzorci, zbranimi v raztopini STM in raztopini PreservCyt Solution. Zaradi podobnosti med značilnostmi delovanja testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za STM in raztopino PreservCyt Solution je učinkovitost testa predstavljena samo za raztopino PreservCyt Solution.

Med tistimi pacientkami, ki so prejele napotnico za bris Pap ASC-US, je negativna napovedna vrednost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za prisotnost HSIL ali večje bolezni pri kolposkopiji 99 % (glejte Preglednica 15 spodaj).

Preglednica 15. Primerjava med testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test in konsenzno histologijo; referenčna populacija Pap ASC-US; Študija Kaiser, vzorci PreservCyt

		HSIL ali več v času kolposkopije		Skupaj
		+	-	
Rezultat testa <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	66	317	383
	-	5	497	502
Skupaj		71	814	885
Občutljivost $[TP/(TP+FN)] = 93,0\% (66/71)$ 95 % IZ = 84,3–97,7 Specifičnost $[TN/(TN+FP)] = 61,1\% (497/814)$ 95 % IZ = 57,7–64,4 Razširjenost bolezni = 8,0 % (71/885) Pozitivna napovedna vrednost analize = 17,2 % (66/383) Negativna napovedna vrednost analize = 99,0 % (497/502)				

Določene so teoretične pozitivne in negativne napovedne vrednosti, ki temeljijo na različni razširjenosti za prvotno ASC-US, za katero je bilo na podlagi rezultatov testa HPV z visokim tveganjem ugotovljeno, da je HSIL ali višja (glejte Preglednica 16 spodaj).

Preglednica 16. Teoretična pozitivna in negativna napovedna vrednost testiranja brisa Pap ASC-US za HPV z visokim tveganjem

Teoretična razširjenost za HSIL	Začetni rezultat brisa Pap ASC-US	
	Pozitivna napovedna vrednost analize	Negativna napovedna vrednost analize
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

Določene so razlike med različnimi starostnimi skupinami, vključenimi v to študijo (glejte Preglednica 17 spodaj).

Preglednica 17. Podatki študije Kaiser: učinkovitost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test v primerjavi s konsenznimi histološkimi rezultati (HSIL) – značilnosti, specifične za starost

	Starost < 30	Starost 30–39	Starost > 39
n	287	233	365
Razširjenost bolezni (%)	12,2	11,2	2,7
Občutljivost (%)	100	88,46	80,0
(n/n)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95 % IZ	90,0–100,0	69,9–97,6	44,4–97,5
Specifičnost (%)	31,4	66,2	79,15
(n/n)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95 % IZ	25,7–37,5	59,3–72,6	74,6–83,3
Negativna napovedna vrednost (%)	100,0	97,86	99,29
(n/n)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Pozitivna napovedna vrednost (%)	16,83	24,73	9,76
(n/n)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Klinična občutljivost in specifičnost za določanje tveganja za visoko stopnjo bolezni pri ženskah z brisi LSIL ali HSIL Pap

Multicentrična klinična študija z uporabo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bila izvedena z uporabo vzorcev, zbranih v več velikih kolposkopskih klinikah v bolnišnicah in zdravstvenih centrih (3 mesta) z visoko razširjenostjo bolezni materničnega vratu in HPV v zahodnih in južnih Združenih državah Amerike. Testiranje na HPV je bilo opravljeno na 3 preiskovalnih lokacijah, ki niso povezane s klinikami za kolposkopijo, iz katerih so bili odvzeti vzorci. Populacijo za to klinično študijo so sestavljale ženske z diagnozo LSIL ali HSIL na podlagi nedavnega brisa Pap, ki so bile napotene na kontrolno kolposkopijo. Od 702 vključenih bolnic jih je 327 imelo izvide brisa Pap višje od ASC-US in so imele na voljo ustrezne informacije; 96 od teh je imelo končno stanje bolezni HSIL ali več.

Vzorci odluščenih celic materničnega vratu so bili pridobljeni z napravo *digene* HC2 DNA Collection Device in preneseni v STM ali pa s pripomočkom v obliki metlice in nato sprani v raztopini PreservCyt Solution. Vzorci so bili zbrani med kolposkopijo. Vzorci so bili testirani s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test in rezultati primerjani s stanjem bolezni, ugotovljenim za vsako pacientko. Stanje bolezni temelji na rezultatih histološke ocene. Če pa je bila histologija negativna ali ni bilo histološkega rezultata, je bilo stanje bolezni določeno s citologijo v času kolposkopskega pregleda (glejte Preglednica 18 spodaj).

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bil opravljen v 3 velikih metropolitanskih zdravstvenih centrih, ki niso povezani z lokacijami, kjer zbirajo vzorce po kolposkopiji. Citologija je bila opravljena v referenčnem patološkem laboratoriju, histologija pa v ustanovah, ki izvajajo kolposkopijo. Rezultate testa so primerjali s stanjem bolezni, da bi ocenili občutljivost in specifičnost testa ter negativne in pozitivne napovedne vrednosti za odkrivanje cervikalne neoplazije visoke stopnje. Zaradi podobnosti med značilnostmi učinkovitosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za STM in raztopino PreservCyt Solution je učinkovitost testa predstavljena samo za raztopino PreservCyt Solution. Pri rezultatih testiranja HPV z visokim tveganjem pri vzorcih STM in vzorcih PreservCyt niso opazili nobene razlike.

Preglednica 18. Algoritem stanja bolnikove bolezni

Rezultat citologije	Histološki rezultat	Stanje bolezni
Negative (Negativno)	Negativno ali ni dokončano*	Negative (Negativno)
LSIL	Negative (Negativno)	LSIL
HSIL	Negative (Negativno)	HSIL
Rak	Negative (Negativno)	HSIL+
Negative (Negativno)	LSIL	LSIL
LSIL	Ni dokončano*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Rak	LSIL	LSIL
Negative (Negativno)	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ni dokončano*	HSIL
Rak	HSIL	HSIL
Negative (Negativno)	Rak	HSIL+
LSIL	Rak	HSIL+
HSIL	Rak	HSIL+
Rak	Ni dokončano*	HSIL+
Rak	Rak	HSIL+

* Biopsija in/ali endocervikalna kiretaža (ECC) nista bili izvedeni, ker pri kolposkopiji niso opazili nobenih nepravilnosti ali pa histološki rezultat ni bil na voljo.

Učinkovitost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bila določena z uporabo 327 vzorcev PreservCyt, od katerih je bilo 96 zbranih pri ženskah z diagnozo bolezni materničnega vratu visoke stopnje (glejte preglednici 19 in 20 spodaj). Primerjave so bile opravljene z uporabo vseh bolnic študije z nenormalnimi rezultati napotnega brisa Pap.

Preglednica 19. Rezultati testiranja na HPV z visokim tveganjem

			Končno stanje bolezni HSIL		Končno stanje bolezni LSIL		Končno stanje bolezni negativno		Skupaj
Rezultat HPV z visokim tveganjem			+	–	+	–	+	–	
Rezultat napotnega brisa Pap	LSIL		44	4	78	33	28	37	224
	HSIL		45	3	29	14	5	7	103
	Skupaj		89	7	107	47	33	44	327
	Skupaj		96		154		77		327

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je pokazal približno 93-% skupno občutljivost za prepoznavanje žensk z neoplazijo visoke stopnje v populaciji, napoteni na kolposkopijo, na podlagi diagnoze brisa Pap za LSIL, HSIL ali enakovredno (glejte Preglednica 20 spodaj). Test je tudi pokazal skoraj 95-% negativno napovedno vrednost v tej populaciji.

Preglednica 20. Značilnosti učinkovitosti testiranja DNK HPV z visokim tveganjem pri pacientkah, ki so imele napotnico za bris Pap za LSIL ali večjo bolezen in končno stanje bolezni HSIL

		Končno stanje bolezni		Skupaj
		HSIL	LSIL ali negativno	
Rezultat testa <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	89	140	229
	–	7	91	98
	Skupaj	96	231	327
Občutljivost $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96) 95 % IZ = 85,6–97,0 Specifičnost $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231) 95 % IZ = 33,1–46,0 Razširjenost bolezni za napotni LSIL na končni HSIL = 21,4 % Razširjenost bolezni za napotni HSIL do končnega HSIL = 46,6 % Skupna pozitivna napovedna vrednost = 38,9 % (89/229) Skupna negativna napovedna vrednost = 92,8 % (91/98)				

Medtem ko je bila specifičnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test videti nekoliko nizka, ni pričakovati stroge korelacije med odsotnostjo neoplazije in negativnim rezultatom HPV. DNK HPV je lahko prisotna pri ženskah, pri katerih bolezen ni napredovala v višjo stopnjo. Dejansko je bilo pri testiranju HPV s polimerazno verižno reakcijo (PCR) (analiza samo za raziskovalno uporabo) na pozitivnih rezultatih testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, katerih ustrezno stanje bolezni je bilo nižje od neoplazije nizke stopnje, skoraj 75 % vzorcev pozitivnih.

Določene so bile teoretične pozitivne in negativne napovedne vrednosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za začetne rezultate brisov Pap LSIL ali HSIL, ki so bili pri kolposkopiji ugotovljeni kot HSIL ali hujša bolezen (glejte Preglednica 21 spodaj).

Preglednica 21. Teoretična pozitivna in negativna napovedna vrednost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za začetne rezultate brisa Pap LSIL ali HSIL

Teoretična razširjenost za HSIL	Začetni rezultat brisa Pap za LSIL ali HSIL	
	Pozitivna napovedna vrednost analize	Negativna napovedna vrednost analize
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

Učinkovitost vaginalnega ali samoodvzetega vzorca

V literaturi, citirani za učinkovitost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pri samoodvzetih vaginalnih vzorcih, je bilo vključenih več kot 141.000 žensk, starih od 16 do 54 let. Študijske kohorte so vključevale ženske iz Kitajske (41, 42), Mehike (43, 44) in Združenega kraljestva (45). Zasnove študij so se nekoliko razlikovale, vendar so bile ženskam s pozitivnim rezultatom testa na splošno ponujene nadaljnje preiskave s kolposkopijo, rezultati pa so bili poročani v smislu občutljivosti in specifičnosti v primerjavi s primerjalno metodo.

V dveh študijah, kjer so bili na voljo podatki za primerjavo samoodvzetih vzorcev in vzorcev, odvzetih pri zdravniku, rezultati kažejo na visoko občutljivost za CIN2+ za obe metodi (42, 45); 81–85 % za samoodvzete vzorce v primerjavi s 96–100 % za vzorce, odvzete pri zdravniku. Rezultati specifičnosti so bili podobni za CIN2+ za obe metodi (42, 45); 81–82 % za samoodvzete vzorce v primerjavi s 83–85 % za vzorce, odvzete pri zdravniku. V drugih študijah, v katerih so bili na voljo samo podatki o učinkovitosti za samoodvzete vzorce, je bila občutljivost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za CIN2+ 3,4-krat večja od citologije (43) in 98-% občutljivost pred prilagoditvijo zaradi pristranskosti preverjanja (44).

Analitična občutljivost

Neklinični panel klonirane plazmidne DNK HPV je bil testiran, da bi ugotovili, ali je s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test vsakega od 13 tipov HPV, in da bi določili analitično občutljivost testa za vsakega od tipov HPV. Vsaka ciljna koncentracija HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml in 0,2 pg/ml) vsakega od 13 tipov DNK HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68) je bila izvedena v treh ponovitvah. Povprečna RLU za vsako koncentracijo vsakega tipa HPV je bila izračunana in primerjana s pozitivnim kalibratorjem.

Določena je bila meja zaznavnosti vsakega tipa HPV v STM (glejte Preglednica 22 spodaj). Meje zaznavnosti so se gibale od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml, odvisno od testiranega tipa HPV. Povprečna meja zaznavnosti vseh 13 tipov DNK HPV je bila 1,08 pg/ml s standardnim odklonom 0,05 pg/ml.

Preglednica 22. Povzetek meje zaznavnosti za občutljivost za vsak tip DNK HPV v STM

Tip DNK HPV	Koncentracija zaznavnosti DNK HPV (pg/ml)	Standardni odklon	95 % IZ
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
Povprečje (vsi tipi)	1,08	0,05	0,95–1,25

Enakovrednost med vrstami vzorcev

Enakovrednost med vzorci STM in PreservCyt

Enakovrednost med vzorci STM in PreservCyt je bila preučena glede enakega pridobivanja DNK HPV 18. Približno 106 pozitivnih celic HeLa, ki so vsebovale integrirane genome HPV 18, je bilo dodanih v STM in v skupino negativnih celic PreservCyt. Vsaka vrsta vzorca je bila obdelana v skladu z ustreznimi postopki priprave vzorca in denaturacije, kot je opisano v ustreznih navodilih za uporabo, in testirana s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Rezultati so pokazali, da je pridobivanje DNK HPV 18 iz celic človeškega karcinoma za ta dva medija enakovredna in da postopek priprave vzorca z raztopino PreservCyt Solution ne vpliva na analitično občutljivost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev PreservCyt in pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit

Študije so bile izvedene z uporabo vzorcev PreservCyt, zbranih v podpopulaciji žensk z normalno citologijo (n = 1276) in podpopulaciji žensk s citologijo ASC-US ali večjo od ASC-US (n = 402). Za vsak vzorec sta bili izvedeni ročna priprava vzorca in priprava vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit, ki jima je sledilo avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (glejte Preglednica 23 spodaj).

Preglednica 23. Ujemanje rezultatov vzorcev PreservCyt med ročno pripravo vzorca in pripravo vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (n = 1678)

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje RLU/CO $\geq$ 2,5	Vsi negativni	Močno negativno območje RLU/CO < 0,8
96,0 (409/426)	97,6 (372/381)	96,2 (1204/1252)	99,1 (1173/1184)
93,7–97,5	95,6–98,8	95,0–97,1	98,3–99,5

Relativna občutljivost in specifičnost testiranja vzorcev PreservCyt, pripravljenih s kompletom QIAasymphony DSP HPV Media Kit, močno korelira z rezultati, pridobljenimi z metodo ročne priprave vzorcev, kar dokazuje spodnja meja 95-% IZ za pozitivno in negativno ujemanje.

Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev PreservCyt in pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit

Študije so bile izvedene z uporabo vzorcev PreservCyt, zbranih v podpopulaciji žensk, starih 30 let in več, z normalno citologijo (n = 1901) in podpopulaciji žensk s citologijo ASC-US (n = 398). Za vsak vzorec sta bili izvedeni ročna priprava vzorca in priprava vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit, čemur je sledilo testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (glejte Preglednica 24 spodaj).

Preglednica 24. Ujemanje rezultatov vzorcev PreservCyt med ročno pripravo vzorcev in pripravo vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit (n = 2299)

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje RLU/CO $\geq 2,5$	Vsi negativni	Močno negativno območje RLU/CO $< 0,8$
92,7	96,5	99,1	99,9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89,3–95,2	93,4–98,1	98,6–99,4	99,6–100,0

Relativna občutljivost in specifičnost testiranja vzorcev PreservCyt, pripravljenih s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit, je v veliki korelaciji z rezultati, pridobljenimi z metodo ročne priprave vzorcev, kar dokazuje spodnja meja 95-% IZ za pozitivno in negativno ujemanje.

Enakovrednost med STM in ročno pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath

Dvofazno klinično vrednotenje je bilo izvedeno z uporabo 6 zbirnih centrov in 3 testnih mest v Združenih državah. Bolnice, ki obiskujejo kliniko za spolno prenosljive bolezni, porodniško/ginekološko kliniko, kliniko za kolposkopijo, bolnišnico ali center za načrtovanje družine, so bile upravičeni do vpisa v skladu z vnaprej določenimi merili za vključitev in izključitev. Faza izvedljivosti, namenjena določitvi uporabne mejne vrednosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za uporabo z vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath, je vključevala približno 400 pacientk. Faza klinične validacije, v katero je bilo vključenih približno 1500 pacientk za validacijo izbrane mejne vrednosti, se je začela po vmesni analizi faze izvedljivosti, ki je pokazala, da mejna vrednost 1,0 RLU/CO z uporabo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath daje sprejemljivo ujemanje z rezultati vzorcev STM.

V obeh fazah ocenjevanja so bili od vsake udeleženke, ki je privolila, pridobljeni vzorci materničnega vratu SurePath in STM. Vzorec SurePath je bil nato poslan v citološki laboratorij za pripravo preparata. Po citološki pripravi so bili preostali vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath in ustrezen vzorec STM testirani s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z uporabo mejne vrednosti CO 1,0 RLU/CO (glejte Preglednica 25 spodaj).

Preglednica 25. Ujemanje rezultatov vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z rezultati vzorcev STM (vse starosti in citološka klasifikacija) (n = 1490)

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ Močno pozitivno območje RLU/CO $\geq$ 2,5		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ Močno negativno območje RLU/CO < 0,8	
Vsi pozitivni		Vsi negativni	
93,5	96,4	95,3	96,0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90,7–95,6	94,1–98,0	93,8–96,5	94,6–97,1

Relativna občutljivost in specifičnost testiranja vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath močno korelira z rezultati, dobljenimi pri testiranju vzorcev STM, kar dokazuje spodnja meja 95-% IZ za pozitivno in negativno ujemanje.

Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath in pripravo vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit

Študije so bile izvedene z uporabo vzorcev SurePath, zbranih v naslednjih podpopulacijah:

- ženske z normalno citologijo (n = 1189)
- ženske s citologijo ASC-US ali večjo od ASC-US (n = 199)

Za vsak vzorec SurePath je bila izvedena priprava vzorca SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit in ročna priprava vzorca celičnega peleta po gradientu. Za vsakega od pripravljenih vzorcev je bilo izvedeno avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (glejte Preglednica 26 spodaj).

Preglednica 26. Ujemanje rezultatov med ročno pripravo vzorcev SurePath in pripravo vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (n = 1388)

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje RLU/CO $\geq$ 2,5	Vsi negativni	Močno negativno območje RLU/CO $<$ 0,8
91,7 (222/242)	97,5 (192/197)	99,0 (1134/1146)	99,7 (1124/1127)
87,6–94,6	94,2–98,9	98,2–99,4	99,2–99,9

Relativna občutljivost in specifičnost testiranja vzorcev SurePath, pripravljenih s kompletom QIAasymphony DSP HPV Media Kit, močno korelira z rezultati, pridobljenimi z metodo ročne priprave vzorcev, kar dokazuje spodnja meja 95-% IZ za pozitivno in negativno ujemanje.

Enakovrednost med ročno pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath in pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit

Študije so bile izvedene z uporabo vzorcev SurePath, zbranih v naslednjih podpopulacijah:

- ženske z normalno citologijo (n = 1200)
- ženske s citologijo ASC-US ali večjo od ASC-US (n = 183)

Za vsak vzorec celičnega peleta po gradientu SurePath sta bili izvedeni ročna priprava vzorca in priprava vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit, ki jima je sledilo avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (glejte Preglednica 27 spodaj).

Preglednica 27. Ujemanje rezultatov vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath med ročno pripravo vzorca in pripravo vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (n = 1383)

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje RLU/CO $\geq$ 2,5	Vsi negativni	Močno negativno območje RLU/CO < 0,8
92,6 (188/203) 88,2–95,5	97,4 (147/151) 93,4–99,0	94,4 (1114/1180) 92,9–95,6	99,3 (1078/1086) 98,6–99,6

Relativna občutljivost in specifičnost testiranja vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath, pripravljenih s kompletom QIAasymphony DSP HPV Media Kit, močno korelira z rezultati, pridobljenimi z metodo ročne priprave vzorcev, kar dokazuje spodnja meja 95-% IZ za pozitivno in negativno ujemanje.

Ujemanje med testnimi metodami

Izvedena je bila multicentrična študija (n = 2270) za oceno rezultatov kliničnih testov z RCS v primerjavi z rezultati testov z uporabo ročne metode. Testiranje je bilo izvedeno na 3 mestih zunaj družbe QIAGEN z vzorci pacientk, odvzetimi na 5 mestih odvzema. Nabor podatkov je obsegal 1269 vzorcev materničnega vratu, zbranih v raztopini PreservCyt Solution, in 1001 vzorcev, zbranih v STM.

Za to populacijo pacientk so bila izračunana statistična ujemanja med primerljivimi vzorci, testiranimi z RCS in z ročnim testom (glejte preglednici 28 in 29 spodaj).

Preglednica 28. Povzetek ujemanja med avtomatiziranim testiranjem z RCS in ročnim testiranjem – vzorci STM (n = 1001)

Citološka klasifikacija	Razširjenost HPV (%)	Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
		Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje (RLU/CO $\geq$ 2,5)	Vsi negativni	Močno negativno območje (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 let	21	99,3 (139/140) 96,1–100,0	99,1 (112/113) 95,2–100,0	99,3 (538/542) 98,1–99,8	100,0 (531/531) 99,3–100,0
WNL $\geq$ 30 let	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
Drugo	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
Vsi vzorci STM	28	98,6 (279/283) 96,4–99,6	99,2 (237/239) 97,0–99,9	99,2 (712/718) 98,2–99,7	99,9 (703/704) 99,2–100,0

* WNL = v mejah normale.

Preglednica 29. Povzetek ujemanja med avtomatiziranim testiranjem z RCS in ročnim testiranjem – vzorci PreservCyt (n = 1269)

Citološka klasifikacija	Razširjenost HPV (%)	Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
		Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje (RLU/CO $\geq$ 2,5)	Vsi negativni	Močno negativno območje (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 let	20	96,2 (75/78) 89,2–99,2	100,0 (64/64) 94,4–100,0	98,4 (301/306) 96,2–99,5	99,0 (293/296) 97,1–99,8
WNL $\geq$ 30 let	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
Drugo	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
Vsi vzorci PreservCyt†	20	96,4 (238/247) 93,2–98,3	98,6 (211/214) 96,0–99,7	98,5 (1007/1022) 97,6–99,2	98,9 (990/1001) 98,0–99,4

* WNL = v mejah normale.

† Citološki podatki za 4 pacientke niso na voljo.

Dodatna klinična študija je bila izvedena z uporabo preostalih arhiviranih vzorcev PreservCyt, zbranih v podpopulaciji žensk, starih 30 let in več, z normalno citologijo (glejte Preglednica 30 spodaj) z razširjenostjo HPV 4,8 %.

Preglednica 30. Povzetek ujemanja med avtomatiziranim testiranjem z RCS in ročnim testiranjem – ženske z WNL, stare 30 in več let (n = 2077)

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje (RLU/CO $\geq$ 2,5)	Vsi negativni	Močno negativno območje (RLU/CO < 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

V močno pozitivni regiji je bilo 7 neskladnih rezultatov med rezultati ročnega testiranja in avtomatiziranega testiranja z RCS. Začetni rezultati ročnega testiranja teh 7 vzorcev so bili zunaj priporočenega algoritma za ponovno testiranje vzorcev PreservCyt; ker pa je zasnova študije zahtevala testiranje vseh vzorcev v treh ponovitvah, so bili na voljo ponovni rezultati za razrešitev neskladja.

Podatki ponovnega testiranja za vsakega od 7 neskladnih vzorcev kažejo, da so vsi neskladni vzorci negativni na DNK HPV (glejte Preglednica 31 spodaj). Na podlagi ponovljenih negativnih rezultatov, pridobljenih za obe ponovitvi, je bil vsak od prvotno pozitivnih rezultatov ročnega testa verjetno lažno pozitiven.

Preglednica 31. Neskladni vzorci PreservCyt za ženske z WNL, stare 30 let in več (n = 7)

Vzorec	Lokacija	Ročno testiranje (RLU/CO)			Avtomatizirano testiranje RCS (RLU/CO)		
		Začetna	Ponovitev 1	Ponovitev 2	Začetna	Ponovitev 1	Ponovitev 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

Rezultati te klinične študije kažejo splošno ujemanje med avtomatiziranim testiranjem z RCS in ročnim testiranjem vzorcev STM ali PreservCyt.

Obnovljivost

Splošna obnovljivost ročnega testiranja

Izvedena je bila multicentrična študija obnovljivosti, da bi določili meddnevno, medmestno in splošno obnovljivost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z uporabo panela tarč DNK HPV ter HPV-pozitivnih in HPV-negativnih kliničnih vzorcev STM.

Trije zunanji laboratoriji so izvedli testiranje z isto serijo testnih kompletov *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test v treh različnih dneh z identičnim panelom obnovljivosti. Panel za ponovljivost je vključeval naslednje vzorce:

- 12 zbirov denaturiranih kliničnih vzorcev STM;
- 3 zbire nedenaturiranih kliničnih vzorcev PreservCyt;
- negativen kalibrator;
- pozitiven kalibrator HPV z visokim tveganjem pri koncentracijah 0,5, 1, 2,5, 5 in 10 pg/ml.

Vsi člani panela so bili testirani s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test vsak dan v treh ponovitvah. Rezultati kažejo, da je obnovljivost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s kliničnimi vzorci zelo dobra (glejte Preglednica 32 spodaj).

Preglednica 32. Splošna obnovljivost – multicentrična obnovljivost (vsi postopki na vseh mestih)

Statistična mera	Rezultat.
Pričakovano pozitivno z opaženim pozitivnim rezultatom	100,0 %
(95-% IZ)	(99,0–100,0)
Pričakovano pozitivno z opaženim negativnim rezultatom	99,0 %
(95-% IZ)	(97,49–99,73)
Ujemanje	99,5 %
(95-% IZ)	(98,70–99,86)
Kappa	0,990

Obnovljivost s kliničnimi vzorci STM

Ročno testiranje

Izvedena je bila študija za oceno obnovljivosti ročnega testiranja kliničnih vzorcev STM s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 20-članski panel, sestavljen iz kliničnih zbirov (10 pozitivnih in 10 negativnih), je bil pripravljen s kombiniranjem predhodno testiranih vzorcev STM. Vzorci so bili testirani v ponovitvah po 4 vsakih 5 dni za skupno 20 ponovitev na vzorec. Testiranje je bilo izvedeno s kombinirano mešanico sond, sestavljeno iz sonde HPV z visokim tveganjem in sonde HPV z nizkim tveganjem. Pričakovali so, da se obnovljivost testa ne bo razlikovala pri uporabi samo mešanice sonde v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Izračunali so povprečno RLU/CO in 95-% IZ pri povprečju (glejte Preglednica 33 spodaj).

Preglednica 33. Obnovljivost vzorcev STM – ročno testiranje (padajoči vrstni red po povprečni RLU/CO)

ID številka vzorca	Povprečni RLU/CO	95 % IZ	Pozitiven rezultat testa (%) (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)

Za 5 vzorcev s povprečno RLU/CO pri 20 % ali več nad mejno vrednostjo je bilo 100 od 100 ponovitev (100,0 %) pozitivnih. Za 5 vzorcev s povprečno RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 60 od 100 (60 %; 95-% IZ = 49,7–69,6) ponovitev pozitivnih in 40 od 100 (40 %) negativnih. Za 10 vzorcev s povprečno RLU/CO pri 20 % ali več pod mejno vrednostjo je bilo 200 od 200 ponovitev (100 %) negativnih.

V skladu z rezultati je mogoče pričakovati, da bodo vzorci, ki so za 20 % ali več oddaljeni od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da ročno testiranje vzorcev STM s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Avtomatizirano testiranje z RCS

Izvedena je bila študija za oceno obnovljivosti znotraj serije, od dneva do dneva in med laboratoriji pri avtomatiziranem testiranju vzorcev STM z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 16-članski panel zbirov kliničnih vzorcev (glejte Preglednica 34 spodaj) je bil testiran z uporabo ene same serije reagentov, dvakrat na dan 3 različne dni. Vsak član panela je bil testiran v štirih ponovitvah.

Preglednica 34. Obnovljivost vzorcev STM – sestava panela za avtomatizirano testiranje z RCS

Član panela	Približna RLU/CO	Pričakovan rezultat testa
1N	< 0,4	Negative (Negativno)
2N	0,4–0,8	Negative (Negativno)
3P	0,8–1,2	Visoko negativno/nizko pozitivno
4P	0,8–1,2	Visoko negativno/nizko pozitivno
5P	0,8–1,2	Visoko negativno/nizko pozitivno
6P	1,2–2,0	Nizko pozitivno
7P	1,2–2,0	Nizko pozitivno
8P	1,2–2,0	Nizko pozitivno
9P	2,0–5,0	Nizko pozitivno
10P	5,0–10,0	Srednje pozitivno
11N	< 0,4	Negative (Negativno)
12N	< 0,4	Negative (Negativno)
13N	< 0,4	Negative (Negativno)
14XR	Pozitivni klinični material za DNK HPV z nizkim tveganjem v negativnem zbiru kliničnih vzorcev STM	Visoko negativno/nizko pozitivno
15XR	Plazmid DNK HPV z nizkim tveganjem v negativnem zbiru kliničnih vzorcev STM	Visoko negativno/nizko pozitivno
16XR	Kontrola plazmidnega vektorja DNK v negativnem zbiru kliničnih vzorcev STM	Visoko negativno/nizko pozitivno

Dva člana panela (14XR in 15XR) sta bila vključena za oceno potenciala za navzkrižno hibridizacijo mešanice sond testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z vzorci, ki vsebujejo samo tipe DNK HPV 6, 11, 42, 43 in 44 z nizkim tveganjem. Član panela 16XR je bil sestavljen iz DNK pGEM® v koncentraciji 1,49 ng/ml in je služil kot vektorska kontrola za člana panela 15XR. Rezultati tega testiranja niso pokazali lažno pozitivnih rezultatov zaradi prisotnosti tipov DNK HPV z nizkim tveganjem v kliničnih vzorcih. Ti rezultati so skladni z ročnim testiranjem.

Obnovljivost je bila izračunana v skladu z metodo, ki jo opisuje NCCLS E5-A (46) (glejte Preglednica 35 spodaj). Ta metoda zahteva izračun komponent variance za vsakega od virov variabilnosti: laboratorij, dan, postopek in napaka (opredeljeni kot variacija znotraj testov in med testi).

Preglednica 35. Obnovljivost vzorcev STM – avtomatizirano testiranje z RCS; kvantitativna obnovljivost

			Standardni odklon					
Član panela	n	Povprečni RLU/CO	V postopku	Med postopki	Med dnevi	Med laboratoriji	Skupaj	Skupni CV (%)
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

* Negativne komponente variance so nastavljene na nič.

† Dve neveljavni ponovitvi za člana panela 8P sta onemogočili analizo komponent variance zaradi neenake velikosti primerjanih skupin.

‡ N/A: analiza variance ni mogoča zaradi manjšega števila ponovitev kot pri drugih članih panela.

Obnovljivost kliničnih vzorcev PreservCyt

Ročno testiranje

Obnovljivost ročnega testiranja vzorcev PreservCyt s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bila ugotovljena v študiji z uporabo 24 lažnih vzorcev pri različnih koncentracijah DNK HPV. Vzorci so bili sestavljeni iz raztopine PreservCyt Solution in belih krvnih celic z in brez bakterij, ki vsebujejo plazmid HPV 16.

Vzorci so bili testirani v ponovitvah po 4 vsakih 5 dni za skupno 20 ponovitev na vzorec. Vsak dan od petih dni študije je bilo iz vsakega vzorca pripravljenih in testiranih 8 ml vzorca v skladu z navodili za uporabo kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit. Izračunana sta bila povprečje in 95-% IZ (glejte Preglednica 36 spodaj).

Preglednica 36. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – ročno testiranje z ročno pripravo vzorcev; kvalitativna obnovljivost (padajoči vrstni red glede na povprečno RLU/CO)

ID številka vzorca	Povprečni RLU/CO	95 % IZ	Pozitiven rezultat testa (%) (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)

Za 6 vzorcev s povprečno RLU/CO pri 20 % ali več nad mejno vrednostjo je bilo 114 od 120 ponovitev (95,0 %) pozitivnih. Za 7 vzorcev s povprečno RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 88 od 139 (63,3 %; 95-% IZ = 54,3–70,9) ponovitev pozitivnih in 51 od 139 (36,7 %) negativnih. Za 4 vzorce znotraj 10 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 41 od 79 (51,9 %) ponovitev pozitivnih in 38 od 79 (48,1 %) negativnih. Za 11 vzorcev s povprečno RLU/CO pri 20 % ali več pod mejno vrednostjo je bilo 220 od 220 ponovitev (100 %) negativnih.

V skladu z rezultati je mogoče pričakovati, da bodo vzorci, ki so za 20 % ali več oddaljeni od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da ročno testiranje vzorcev PreservCyt s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Avtomatizirano testiranje z RCS z ročno pripravo vzorcev

Interna študija avtomatiziranega testiranja z RCS je bila izvedena z uporabo kliničnih vzorcev PreservCyt, pridobljenih pretežno od žensk s citološkim rezultatom ASC-US ali višjim od ASC-US (razširjenost HPV 57 %). Vzorci so bili razdeljeni na 2 alikvota; vsak alikvot je bil nato posamično obdelan s kompletom *digene* HC2 Sample Conversion Kit in testiran v dvojniku s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tako kot pri drugih kvalitativnih testih za diagnostično uporabo in vitro je variabilnost rezultatov testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, pridobljenih iz kliničnih vzorcev, povezana predvsem z enim ali kombinacijo naslednjih dejavnikov: odvzemom vzorca, pripravo vzorca in postopkom testiranja. Ker so bili primerjani rezultati testov pridobljeni iz istega kliničnega vzorca, je preskusna zasnova nadzorovala variabilnost zaradi odvzema vzorca. Ponovljivost rezultatov, dobljenih iz 2 posamezno pripravljenih alikvotov vzorcev iz istega kliničnega vzorca (v nadaljevanju imenovanih »vmesno pripravljeni alikvoti«), odraža odstopanje zaradi kombinacije priprave vzorca in postopka testiranja. Ponovljivost rezultatov, dobljenih iz istega alikvota vzorca (v nadaljevanju imenovanega »znotraj pripravljen alikvot«), odraža samo odstopanje od testnega postopka (glejte Preglednica 37 spodaj).

Preglednica 37. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – avtomatizirano testiranje z RCS z ročno pripravo vzorcev; kvalitativna obnovljivost

		Pozitivno ujemanje (%) (n/n)	Negativno ujemanje (%) (n/n)	Splošno ujemanje(%) (n/n)
Analiza		95 % IZ	95-% IZ	95 % IZ
Znotraj pripravljen alikvot	Vsi podatki	99,62 (261/262)	94,7 (160/169)	97,7 (421/431)
		97,9–100,0	90,1–97,5	95,8–98,9
	Močno pozitivna in močno negativna območja	100,0 (249/249)	98,2 (160/163)	99,3 (409/412)
		98,5–100,0	94,7–99,6	97,9–99,9
Vmesno pripravljen alikvot	Vsi podatki	99,6 (264/265)	98,2 (163/166)	99,1 (427/431)
		97,9–100,0	94,8–99,6	97,6–99,8
	Močno pozitivna in močno negativna območja	100,0 (249/249)	99,4 (161/162)	99,8 (410/411)
		98,5–100,0	96,6–100,0	98,7–100,0

Izvedena je bila dodatna študija za ovrednotenje kvantitativne obnovljivosti rezultatov, pridobljenih z avtomatiziranim testiranjem simuliranih vzorcev PreservCyt z RCS. V študiji so sodelovala tri mesta testiranja, vključno s družbo QIAGEN.

Vsak preskusni laboratorij je izvedel avtomatizirano testiranje RCS in ročno testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test dvakrat na dan v 5 različnih dneh s priloženim 6-članskim panelom obnovljivosti. Vsak član panela je bil sestavljen iz gojenih celic, dodanih v raztopino PreservCyt Solution, ki naj bi dala približno vrednost RLU/CO (glejte Preglednica 38 spodaj).

Člani panela s pozitivno DNK HPV so bili pripravljene z dodajanjem različnih količin DNK HPV-pozitivnih celic SiHa (iz laboratorijske celične linije). Negativni član panela je bil sestavljen iz HPV-negativnih celic Jurkat (iz druge laboratorijske celične linije). Končna celična koncentracija vseh 6 članov panela je bila približno 5×10^4 celic/ml.

Preglednica 38. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – avtomatizirano testiranje z RCS z ročno pripravo vzorcev; kvantitativna obnovljivost članov panela

Član panela	Vrsta celice	Približna RLU/CO	Pričakovan rezultat testa
1N	Jurkat	< 1,0	Negative (Negativno)
2N	Jurkat	< 1,0	Negative (Negativno)
3P	SiHa in Jurkat	5,0–8,0	Nizko pozitivno
4P	SiHa in Jurkat	5,0–8,0	Nizko pozitivno
5P	SiHa	30,0–50,0	Srednje pozitivno
6P	SiHa	200,0	Visoko pozitivno

Obnovljivost je bila izračunana v skladu z metodo, ki jo opisuje NCCLS E5-A (46) (glejte Preglednica 39 spodaj). Ta metoda zahteva izračun komponent variance za vsakega od virov variabilnosti: laboratorij, dan, postopek in napaka (opredeljeni kot variacija znotraj testov in med testi). Vsak od 6 članov panela je bil testiran v štirih ponovitvah v vsakem od 10 postopkov (2 postopka na dan v 5 dneh testiranja) v vsakem od 3 testnih laboratorijev.

Preglednica 39. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – avtomatizirano testiranje z RCS z ročno pripravo vzorcev; kvantitativna obnovljivost

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon					Skupaj	Skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki	Med dnevi	Med laboratoriji			
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	

* Negativne komponente variance so nastavljene na nič.

Za dopolnitev te začetne študije obnovljivosti je bila na zunanjem mestu družbe QIAGEN s podatki iz vzorcev, ki so zelo blizu mejne vrednosti testa, izvedena dodatna študija natančnosti z uporabo sistema RCS.

Panel so sestavljali 1 negativen, 2 negativna ali nizko pozitivna in 2 nizko pozitivna člana. Vsak član panela je bil pripravljen z dodajanjem gojenih celic Jurkat in SiHa v raztopino PreservCyt Solution, ki naj bi dala ciljne vrednosti RLU/CO (glejte Preglednica 40 spodaj).

To zunanje mesto je izvedlo avtomatizirano testiranje z RCS z uporabo ene serije reagentov *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za vsak testni postopek, pri čemer je test izvedlo dvakrat na dan 3 različne dni s priloženim 5-članskim panelom simuliranih vzorcev PreservCyt. Vsak član panela je bil razdeljen na 4 vzorce in vsi 4 vzorci so bili testirani na isti mikroplošči (glejte Preglednica 41 spodaj).

Preglednica 40. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – avtomatizirano testiranje z RCS z ročno pripravo vzorcev; kvantitativna obnovljivost članov panela blizu mejne vrednosti testa

Član panela	Približna RLU/CO	Pričakovani rezultat testa
1N	0,2	Negative (Negativno)
2N	0,8–1,2	Visoko negativno/nizko pozitivno
3P	0,8–1,2	Visoko negativno/nizko pozitivno
4P	1,2–2,0	Nizko pozitivno
5P	1,2–2,0	Nizko pozitivno

Preglednica 41. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – avtomatizirano testiranje z RCS z ročno pripravo vzorcev; kvantitativna obnovljivost blizu mejne vrednosti testa

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon				Skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki	Med dnevi	Skupaj	
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

* Negativne komponente variance so nastavljene na nič.

Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit

Interna študija priprave vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit je bila izvedena z uporabo kliničnih vzorcev PreservCyt, pridobljenih od žensk z enim od naslednjih dveh citoloških rezultatov:

- ASC-US ali več kot ASC-US
- negativno na intraepitelno lezijo ali malignost (NILM)

Iz vsakega vzorca sta bila odvzeta dva vzorca. Vsak vzorec je bil individualno pripravljen z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, rezultati pa so bili določeni z avtomatiziranim testiranjem z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tako kot pri drugih kvalitativnih testih za diagnostično uporabo in vitro je variabilnost rezultatov testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, pridobljenih iz kliničnih vzorcev, povezana predvsem z enim ali kombinacijo naslednjih dejavnikov: odvzemom vzorca, pripravo vzorca in postopkom testiranja. Ker so bili primerjani rezultati testa pridobljeni iz istega kliničnega vzorca (imenovanega »med vzorci«), je preskusna zasnova nadzorovala variabilnost zaradi odvzema vzorca. Obnovljivost rezultatov (glejte Preglednica 42 spodaj), pridobljenih iz 2 posamezno pripravljenih vzorcev iz istega kliničnega vzorca, odraža odstopanje zaradi priprave vzorca in postopka testiranja.

Preglednica 42. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost med vzorci

Pozitivno ujemanje (%)	Negativno ujemanje (%)	Splošno ujemanje(%)
(n/n)	(n/n)	(n/n)
95 % IZ	95-% IZ	95 % IZ
99,0	96,4	97,3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94,3–99,8	92,4–98,3	94,6–98,7

Izvedena je bila dodatna študija za ovrednotenje obnovljivosti rezultatov z uporabo simuliranih vzorcev PreservCyt. Pripravi vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit je sledilo avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 8 pozitivnih članov panela je bilo pripravljenih z dodajanjem DNK HPV-pozitivnih celic SiHa ali HeLa k DNK HPV-negativnim celicam C-33 A v raztopini PreservCyt Solution, medtem ko sta 2 DNK HPV-negativna člana panela vsebovala samo DNK HPV-negativne celice C-33 A.

Trije različni upravljavci so izvedli testiranje v enem dnevu z uporabo 3 različnih instrumentov QIAAsymphony SP in 3 različnih serij kompletov QIAAsymphony DSP HPV Media Kit s člani panela 2N, 3E, 5P, 7P in 9P. Člani panela 2N, 3E, 5P in 7P so bili testirani z 18 ponovitvami v 3 različnih postopkih, kar je prineslo 54 podatkovnih točk za vsakega člana panela. Član panela 9P je bil testiran s 16 ponovitvami v 3 različnih postopkih, kar je prineslo 48 podatkovnih točk.

En upravljavec je izvedel test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test na 3 različne dni z uporabo 3 različnih instrumentov QIAAsymphony SP in ene serije kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit s člani panela 1N, 4E, 6P, 8P in 10P. Člani panela 1N, 4E, 6P in 8P so bili testirani z 18 ponovitvami v 8 različnih postopkih, kar je prineslo 144 podatkovnih točk za vsakega člana panela. Član panela 10P je bil testiran s 16 ponovitvami v 8 različnih postopkih, kar je prineslo 128 podatkovnih točk.

Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo je bilo 572 od 572 (100,0 %) pozitivnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 98 od 198 (49,5 %) pozitivnih in 100 od 198 (50,5 %) negativnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več pod mejno vrednostjo je bilo 198 od 198 (100,0 %) negativnih (glejte Preglednica 43 spodaj).

Preglednica 43. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost

Član panela	Vrsta celice	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon	Pozitiven rezultat testa (%) (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 in C-33 A	0,81	0,11	6 (3/54)
4E	SiHa in C-33 A	1,09	0,18	66 (95/144)
5P	HeLa in C-33 A	3,17	0,46	100 (54/54)
6P	SiHa in C-33 A	4,81	0,74	100 (144/144)
7P	HeLa in C-33 A	6,77	0,97	100 (54/54)
8P	SiHa in C-33 A	9,41	1,39	100 (144/144)
9P	HeLa in C-33 A	13,72	2,81	100 (48/48)
10P	SiHa in C-33 A	28,13	5,08	100 (128/128)

V skladu z rezultati je mogoče pričakovati, da bodo vzorci, ki so za 20 % ali več oddaljeni od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit, ki ji sledi testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, daje obnovljive rezultate.

Rezultati interne študije so bili uporabljeni tudi za ovrednotenje kvantitativne obnovljivosti rezultatov, pridobljenih s pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (glejte Preglednica 44 in Preglednica 45 spodaj).

Preglednica 44. Obnovljivost vzorcev PreservCyt — priprava vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost pri istem upravljavcu

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon			Ocenjeno skupno standardno odstopanje	Ocenjeni skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki	Med kombinacijami*		
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

* Med kombinacijami instrumentov QIAasymphony SP in različnimi dnevi.

Preglednica 45. Obnovljivost vzorcev PreservCyt — priprava vzorca z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost na isti dan

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon			Ocenjeni skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki†	Ocenjeno skupno standardno odstopanje	
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

† Postopek je sestavljen iz kombinacije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit, instrumenta QIASymphony SP in upravljavca.

Kvantitativna obnovljivost je zelo visoka, kar kažejo vse vrednosti CV pod 25 %. Standardni odkloni med postopki so primerljivi z ustrežno vrednostjo v postopku, kar kaže na dosledne rezultate ne glede na uporabljeni instrument ali serijo kompleta.

Priprava vzorcev s kompletom QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Interna študija priprave vzorcev z uporabo kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit je bila izvedena z uporabo kliničnih vzorcev PreservCyt, pridobljenih od žensk s citologijo ASC-US ali NILM. Iz vsakega vzorca sta bila odvzeta dva vzorca. Vsak vzorec je bil individualno pripravljen z uporabo kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, rezultati pa so bili določeni z avtomatiziranim testiranjem z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tako kot pri drugih kvalitativnih testih za diagnostično uporabo in vitro je variabilnost rezultatov testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, pridobljenih iz kliničnih vzorcev, povezana predvsem z enim ali kombinacijo naslednjih dejavnikov: odvzemom vzorca, pripravo vzorca in postopkom testiranja. Ker so bili primerjani rezultati testa pridobljeni iz istega kliničnega vzorca (imenovanega »med vzorci«), je preskusna zasnova nadzorovala variabilnost zaradi odvzema vzorca. Obnovljivost rezultatov (glejte Preglednica 46 spodaj), pridobljenih iz 2 posamezno pripravljenih vzorcev iz istega kliničnega vzorca, odraža odstopanje zaradi priprave vzorca in postopka testiranja.

Preglednica 46. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit; kvalitativna obnovljivost med vzorci

Pozitivno ujemanje (%)	Negativno ujemanje (%)	Splošno ujemanje(%)
(n/n)	(n/n)	(n/n)
95 % IZ	95-% IZ	95 % IZ
95,3	96,7	96,2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89,4–98,0	92,3–98,5	93,3–97,9

Izvedena je bila dodatna študija za ovrednotenje obnovljivosti rezultatov z uporabo simuliranih vzorcev PreservCyt. Pripravi vzorca z uporabo kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit je sledilo avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Trije različni upravljavci so izvedli test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test na različne dni z uporabo različnih instrumentov in različnih serij reagentov z 9-članskim panelom. Vsak član panela je bil testiran v dvojniku v 24 različnih postopkih, kar je prineslo 48 podatkovnih točk za vsakega člana panela. 8 pozitivnih članov panela je bilo pripravljenih z dodajanjem DNK HPV-pozitivnih celic SiHa ali HeLa k DNK HPV-negativnim celicam H9 v raztopini PreservCyt Solution, medtem ko je DNK HPV-negativni član panela vseboval samo DNK HPV-negativne celice H9.

Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo je bilo 237 od 240 (98,8 %) pozitivnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 95 od 144 (66,0 %) pozitivnih in 49 od 144 (34,0 %) negativnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več pod mejno vrednostjo je bilo 48 od 48 (100,0 %) negativnih (glejte Preglednica 47 spodaj).

Preglednica 47. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit; kvalitativna obnovljivost

Član panela	Vrsta celice	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon	Pozitiven rezultat testa (%) (n/N)
1N	H9	0,17	0,03	0 (0/48)
2E	H9 in HeLa	1,00	0,16	56 (27/48)
3E	H9 in HeLa	1,16	0,57	54 (26/48)
4E	H9 in SiHa	1,18	0,23	88 (42/48)
5P	H9 in SiHa	1,89	0,20	100 (48/48)
6P	H9 in HeLa	2,05	0,43	96 (46/48)
7P	H9 in SiHa	2,97	0,45	100 (48/48)
8P	H9 in HeLa	5,67	0,61	100 (48/48)
9P	H9 in SiHa	9,91	1,63	98 (47/48)

V skladu z rezultati je mogoče pričakovati, da bodo vzorci, ki so za 20 % ali več oddaljeni od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da priprava vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit, ki ji sledi testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, daje obnovljive rezultate.

Rezultati interne študije so bili uporabljeni tudi za ovrednotenje kvantitativne obnovljivosti rezultatov, pridobljenih s pripravo vzorcev PreservCyt z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit (glejte Preglednica 48 spodaj).

Preglednica 48. Obnovljivost vzorcev PreservCyt – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; kvantitativna obnovljivost

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon			Ocenjeno skupno standardno odstopanje	Ocenjeni skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki	Med kombinacijami*		
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

* Med kombinacijami kompletov *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, kompletov QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, uporabljenega RCS, uporabljenega QIASymphony SP in upravljavca.

Obnovljivost kliničnih vzorcev SurePath

Ročno testiranje

Obnovljivost ročnega testiranja vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bila ugotovljena v študiji, v kateri so sodelovali 3 različni laboratoriji. Člani panela so bili testirani z uporabo mejne vrednosti 1,0 RLU/CO ob različnih dnevih in z različnimi postopki z identično skupino članov panela z znanim pozitivnim ali negativnim stanjem HPV. Panel je sestavljalo 5 pozitivnih, 2 visoko negativna/nizko pozitivna in 5 negativnih članov.

Vsak član panela je bil pripravljen s kombiniranjem edinstvenih kliničnih vzorcev, zbranih v SurePath Preservative Fluid z znanim negativnim in pozitivnim stanjem HPV, da bi dobili želene ciljne vrednosti RLU/CO. Vsak član panela je bil testiran v dvojniku, dvakrat na dan, v obdobju 5 dni v vsakem od 3 sodelujočih laboratorijev (glejte Preglednica 49 spodaj).

Preglednica 49. Obnovljivost vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath – ročno testiranje; kvalitativna obnovljivost

Član panela	Povprečni RLU/CO	Pozitiven rezultat testa (%) (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)

Avtomatizirano testiranje z RCS

Obnovljivost rezultatov vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath z avtomatiziranim testiranjem z RCS je bila primerjana z rezultati, pridobljenimi z ročnim testiranjem. Testirana sta bila dva ločena alikvota iz istega obdelanega vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath (iz istega vzorca) (glejte Preglednica 50 spodaj).

Preglednica 50. Obnovljivost vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath – avtomatizirano testiranje z RCS; ujemanje rezultatov med avtomatiziranim testiranjem z RCS in ročnim testiranjem

Pozitivno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ		Negativno ujemanje (%) (n/n) 95 % IZ	
Vsi pozitivni	Močno pozitivno območje (RLU/CO $\geq$ 2,5)	Vsi negativni	Močno negativno območje (RLU/CO $<$ 0,8)
99,0 (417/421)	100,0 (375/375)	97,7 (1057/1079)	98,7 (1050/1064)
97,6–99,7	99,0–100,0	96,9–98,75	97,8–99,28

Priprava vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit

Izvedena je bila študija za oceno obnovljivosti rezultatov z uporabo simuliranih vzorcev SurePath. Pripravi vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit je sledilo avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 4 pozitivni člani panela so bili pripravljene z dodajanjem DNK HPV-pozitivnih celic SiHa k DNK HPV-negativnim celicam H-9 v SurePath Preservative Fluid, medtem ko je DNK HPV-negativni član panela vseboval samo DNK HPV-negativne celice H-9 v SurePath Preservative Fluid.

Trije različni upravljavci so izvedli testiranje v 6 različnih dneh z uporabo 3 različnih instrumentov QIAAsymphony SP in 3 različnih serij kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit s člani panelov 1N, 2E, 3P, 4P in 5P. Člani panela 1N, 2E, 3P in 4P so bili testirani z 18 ponovitvami v 37 različnih postopkih, kar je prineslo 666 podatkovnih točk za člana panela 2E in 3P ter 665 podatkovnih točk za člana panela 1N in 4P. Član panela 5P je bil testiran s 16 ponovitvami v 37 različnih postopkih, kar je prineslo 590 podatkovnih točk. Štiri podatkovne točke so bile izključene zaradi nezadostne količine, kot jo je med pripravo vzorca označil QIAAsymphony SP.

Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo je bilo 1921 od 1921 (100,0 %) pozitivnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 410 od 666 (61,6 %) pozitivnih in 256 od 666 (38,4 %) negativnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več pod mejno vrednostjo je bilo 664 od 665 (99,8 %) negativnih (glejte Preglednica 51 spodaj).

Preglednica 51. Obnovljivost vzorcev SurePath – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost

Član panela	Vrsta celice	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon	Pozitiven rezultat testa (%) (n/N)
1N	H-9	0,38	0,06	0,2 (1/665)
2E	SiHa in H-9	1,06	0,17	61,6 (410/666)
3P	SiHa in H-9	4,51	0,78	100,0 (666/666)
4P	SiHa in H-9	8,34	1,57	100,0 (665/665)
5P	SiHa in H-9	24,69	5,12	100,0 (590/590)

V skladu z rezultati je mogoče pričakovati, da bodo vzorci SurePath, ki so za 20 % ali več oddaljeni od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci SurePath blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da priprava vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, ki ji sledi testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, daje obnovljive rezultate.

Rezultati interne študije so bili uporabljeni tudi za ovrednotenje kvantitativne obnovljivosti rezultatov, pridobljenih s pripravo vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit.

Trije različni upravljavci so izvedli testiranje v 6 različnih dneh z uporabo 3 različnih instrumentov QIAAsymphony SP in 3 različnih serij kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit s člani panelov 1N, 2E, 3P, 4P in 5P. Člani panela 1N, 2E, 3P in 4P so bili testirani z 18 ponovitvami, kar je prineslo 162 podatkovnih točk za vsakega člana panela. Član panela 5P je bil testiran s 16 ponovitvami, kar je prineslo 144 podatkovnih točk (glejte Preglednica 52 spodaj).

Preglednica 52. Obnovljivost vzorcev SurePath – priprava vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon			Ocenjeno skupno standardno odstopanje	Ocenjeni skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki	Med kombinacijami*		
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

* Postopek je sestavljen iz kombinacije kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, instrumenta QIAAsymphony SP in upravljavca na določen dan.

Kvantitativna obnovljivost je zelo visoka, kar kažejo vse vrednosti CV pod 26 %. Standardni odkloni med postopki so primerljivi z ustrežno vrednostjo v postopku, kar kaže na dosledne rezultate ne glede na uporabljeni instrument ali serijo kompleta.

Priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit

Izvedena je bila študija za oceno obnovljivosti rezultatov z uporabo simuliranih vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath. Pripravi vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit je sledilo avtomatizirano testiranje z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Material celične kulture v 70 % tekočini SurePath Preservative Fluid je bil uporabljen za posnemanje vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath. 4 pozitivni člani panela so bili pripravljene z dodajanjem DNK HPV-pozitivnih celic SiHa k DNK HPV-negativnim celicam H-9 v SurePath Preservative Fluid, medtem ko je DNK HPV-negativni član panela vseboval samo DNK HPV-negativne celice H-9 v SurePath Preservative Fluid.

Štirje različni upravljavci so izvedli testiranje v 6 različnih dneh z uporabo 3 različnih instrumentov QIAAsymphony SP in 3 različnih serij kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit s člani panela 1, 2, 3, 4 in 5. Člani panela 1, 2, 3 in 4 so bili testirani z 18 ponovitvami v 37 različnih postopkih, kar je prineslo 666 podatkovnih točk za člana panela 1 in 3 ter 665 podatkovnih točk za člana panela 2 in 4. Dve podatkovni točki sta bili izključeni zaradi nezadostne količine, kot jo je med pripravo vzorca označil QIAAsymphony SP. Član panela 5 je bil testiran s 16 ponovitvami v 37 različnih postopkih, kar je prineslo 592 podatkovnih točk.

Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo je bilo 1923 od 1923 (100,0 %) pozitivnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo je bilo 416 od 665 (62,6 %) pozitivnih in 249 od 665 (37,4 %) negativnih. Pri članih panela s povprečno RLU/CO 20 % ali več pod mejno vrednostjo je bilo 666 od 666 (100 %) negativnih (glejte Preglednica 53 spodaj).

Preglednica 53. Obnovljivost vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath – priprava vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost

Član panela	Vrsta celice	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon	CV (%)	Pozitiven rezultat testa (%) (n/N)
1	H-9	0,12	0,02	18,77	0,0 (0/666)
2	SiHa in H-9	0,96	0,11	11,15	62,6 (416/665)
3	SiHa in H-9	4,72	0,56	11,89	100,0 (666/666)
4	SiHa in H-9	9,34	0,98	10,46	100,0 (665/665)
5	SiHa in H-9	24,9	3,37	13,55	100,0 (592/592)

V skladu z rezultati je mogoče pričakovati, da bodo vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath, ki so za 20 % ali več oddaljeni od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci celičnega peleta po gradientu SurePath blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, ki ji sledi testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, daje obnovljive rezultate.

Rezultati interne študije so bili uporabljeni tudi za ovrednotenje kvantitativne obnovljivosti rezultatov, pridobljenih s pripravo vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit.

Štirje različni upravljavci so izvedli testiranje v 6 različnih dneh z uporabo 3 različnih instrumentov QIAAsymphony SP in 3 različnih serij kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit s člani panela 1, 2, 3, 4 in 5. Člani panela 1, 2, 3 in 4 so bili testirani z 18 ponovitvami, kar je prineslo 162 podatkovnih točk za vsakega člana panela. Član panela 5 je bil testiran s 16 ponovitvami, kar je prineslo 144 podatkovnih točk (glejte Preglednica 54 spodaj).

Preglednica 54. Obnovljivost vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath – priprava vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost

Član panela	n	Povprečni RLU/CO	Standardni odklon				Ocenjeni skupni CV (%)
			V postopku	Med postopki	Med kombinacijami*	Ocenjeno skupno standardno odstopanje	
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

* Med kombinacijami različnih dni, upravljavcev, serij kompletov QIAAsymphony DSP HPV Media Kit in instrumentov QIAAsymphony SP.

Kvantitativna obnovljivost je zelo visoka, kar kažejo vse vrednosti CV pod 20 %. Standardni odkloni med postopki so primerljivi z ustrežno vrednostjo v postopku, kar kaže na dosledne rezultate ne glede na uporabljeni instrument ali serijo kompleta.

Navzkrižna reaktivnost

Da bi ugotovili, ali bo prišlo do navzkrižne reaktivnosti s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, so testirali vrsto bakterij, virusov in plazmidov, ki jih pogosto najdemo v ženskem anogenitalnem traktu, ter zbirko kutanotropnih tipov HPV, za katere so bili na voljo kloni. Vsi mikroorganizmi so bili testirani pri koncentracijah 1×10^5 in 1×10^7 organizmov na ml. DNK, ki so bile očiščene virusov in plazmidov, so testirali pri koncentraciji 4 ng/ml.

Testirane so bile naslednje bakterije, ki so bile v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test vse negativne:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC® 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 ali 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli**
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*

* Testirana sta bila sev *E. coli*, uporabljen za gojenje plazmidov (HB101) in klinični izolat *E. coli*.

- *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* (sev Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

Testirane so bile naslednje virusne ali plazmidne DNK ali človeški serum, ki so bile v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test vse negativne:

- Adenovirus 2
- Citomegalovirus
- Virus Epstein-Barr
- Serum, pozitiven na površinski antigen hepatitisa B
- Herpes Simplex I
- Herpes Simplex II
- Virus humane imunske pomanjkljivosti (HIV, RT DNK)
- HPV tipi 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 in 30
- Opičji virus tipa 40 (SV40)

Edini plazmid, ki je pokazal navzkrižno reaktivnost v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, je bil pBR322. Navzkrižna reaktivnost med pBR322 in mešanico sonde ni nepričakovana, saj je pri izolaciji vložka HPV težko odstraniti vso vektorsko DNK pBR322. Poročali so o prisotnosti homolognih sekvenc pBR322 v vzorcih človeških genitalij, lažno pozitivni rezultati pa se lahko pojavijo v prisotnosti visokih ravni bakterijskega plazmida. Vendar pa 298 kliničnih vzorcev, ki so bili s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pozitivni, ni imelo pozitivnih rezultatov zaradi pBR322 pri testiranju s sondo pBR322. Tako se zdi, da je verjetnost lažno pozitivnega rezultata testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zaradi homolognih sekvenc pBR322 v kliničnih vzorcih majhna.

Navzkrižna hibridizacija

S testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test so testirali 18 različnih tipov HPV (visoko in nizko tveganjih) v koncentracijah 4 ng/ml DNK HPV. Vse tarče HPV z visokim tveganjem so bile pozitivne. Ta študija je tudi pokazala, da obstaja majhna količina navzkrižne hibridizacije med tipoma HPV 6 in 42 ter testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Vzorci pacientk z visokimi vrednostmi (4 ng/ml ali več) HPV tipa 6 ali 42 lahko podajo lažno pozitivne rezultate testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. To je klinično pomembno, saj so lahko pacientke s 4 ng/ml ali več HPV tipa 6 ali 42 po nepotrebnem napotene na kolposkopijo.

Izkazalo se je tudi, da test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test navzkrižno reagira s tipi HPV 40, 53 in 66. Ti tipi so redki in ni dovolj dokazov, da bi ugotovili natančno povezavo med okužbo s temi tipi in razvojem bolezni visoke stopnje (15). V literaturi so tudi poročali, da lahko kompleksne sonde, podobne tistim, uporabljenim v tem testu, povzročijo lažno pozitivne rezultate zaradi navzkrižne hibridizacije s tipi HPV 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ali MM9 (35). Čeprav je več teh vrst HPV redkih ali novih vrst, ki jih pri hudi bolezni ne srečamo pogosto, lahko pacientke, katerih vzorci vsebujejo visoke ravni teh vrst DNK HPV, nepravilno napotimo na kolposkopijo.

Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce STM

V testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bil ovrednoten vpliv krvi in drugih potencialno motečih opredeljenih ali nedefiniranih snovi. Polna kri, tuš, krema proti glivicam in kontracepcijski žele (sredstva, ki jih običajno lahko najdemo v vzorcih materničnega vratu) so bili dodani STM-negativnim in STM-pozitivnim vzorcem (zbiri kliničnih vzorcev in neklinični vzorci) v koncentracijah, ki jih je mogoče najti v vzorcih materničnega vratu.

Pri nobeni od štirih učinkovin v kateri koli koncentraciji niso opazili lažno pozitivnih rezultatov. Vendar pa se lahko v kliničnih vzorcih z vrednostmi DNK HPV, ki so blizu mejne vrednosti za test (1 pg/ml), pojavi lažno pozitiven rezultat, če so prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam ali kontracepcijskega želeja. Vendar pa je zelo malo verjetno, da bo klinični vzorec skoraj v celoti sestavljen iz ene od teh snovi, ker se maternični vrat rutinsko očisti pred pridobitvijo vzorcev za Pap bris in za testiranje HPV.

Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce PreservCyt

Ročna priprava vzorca

V testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test je bil ovrednoten vpliv krvi in drugih potencialno motečih opredeljenih ali nedefiniranih snovi, ki so potencialno prisotne v vzorcih PreservCyt. Polna kri, tuš, krema proti glivicam in kontracepcijski žele (sredstva, ki jih lahko običajno najdemo v vzorcih materničnega vratu) so bili dodani skupkom negativnih in pozitivnih kliničnih vzorcev PreservCyt v koncentracijah, ki jih je mogoče najti v vzorcih materničnega vratu. Pri nobenem od 4 učinkovin v kateri koli koncentraciji niso opazili lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov. Poleg tega snovi, ki so del nekaterih kliničnih vzorcev, ne zavirajo odkrivanja DNK HPV s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP HPV Media Kit

Vpliv krvi in drugih potencialno motečih snovi v vzorcih PreservCyt je bil ocenjen z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit za pripravo vzorcev in avtomatiziranega testiranja z RCS z uporabo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Testirani je bil vpliv naslednjih potencialno motečih snovi:

- Krema proti glivicam
- Protivnetna krema
- Kri
- Kontracepcijski žele
- Tuš
- Ženske dezodorantne svečke
- Lubrikant
- Spermicid

Vsaka snov je bila dodana negativnim in pozitivnim kliničnim zbirom. Pri nobeni od snovi v koncentraciji, ki jo lahko najdemo v vzorcih materničnega vratu, niso opazili lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov. Vendar pa se v kliničnih vzorcih z ravnmi DNK HPV, ki so blizu mejne vrednosti za test, pojavi lažno negativen rezultat, če so prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam, vaginalnega lubrikanta ali krvi. Vendar pa je zelo malo verjetno, da bo klinični vzorec skoraj v celoti sestavljen iz ene od teh snovi, ker se maternični vrat rutinsko očisti pred pridobitvijo vzorcev za Pap bris in za testiranje HPV.

Priprava vzorcev s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit

Vpliv polne krvi v vzorcih PreservCyt je bil ocenjen z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit za pripravo vzorcev in testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za testiranje. Vidno krvavi klinični vzorci so bili izbrani in testirani z metodo ročne priprave vzorcev in avtomatizirano metodo priprave vzorcev z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit. Rezultati so bili primerjani za 238 vzorcev, pri čemer je bilo skupno ujemanje 94,12 % in McNemarjeva vrednost $p = 0,2850$, kar kaže, da med ročno metodo priprave vzorca in avtomatizirano metodo priprave vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit ni statistično pomembne razlike v klinični učinkovitosti.

Testirani je bil vpliv naslednjih potencialno motečih snovi:

- Tuš
- Krema proti glivicam
- Kontracepcijski žele
- Mononuklearne celice periferne krvi (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)
- Lubrikant
- Žensko razpršilo
- Spermicid
- Magnetni delci
- Tekočina TopElute Fluid

Vsaka snov je bila dodana v negativne in pozitivne celične zbirke v koncentracijah, ki jih je mogoče najti v vzorcih materničnega vratu ali jih je mogoče dodati med pripravo vzorca. Pri nobeni od snovi v kateri koli koncentraciji niso opazili lažno pozitivnih rezultatov. Lažno negativnih rezultatov niso opazili, z izjemo kontracepcijskega želeja.

Ne odzemi vzorca materničnega vratu PreservCyt za avtomatizirano pripravo vzorca s kompletom QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit, če je prisoten kontracepcijski žele.

Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce SurePath

Priprava vzorcev SurePath z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit

Vpliv krvi in drugih potencialno motečih snovi v vzorcih SurePath je bil ocenjen z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit za pripravo vzorcev in avtomatiziranega testiranja z RCS z uporabo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Testirani je bil vpliv naslednjih potencialno motečih snovi:

- Krema proti glivicam
- Protivnetna krema
- Kri
- Kontracepcijski žele
- Tuš
- Ženske dezodorantne svečke
- Lubrikant
- Spermicid

Vsaka snov je bila dodana negativnim in pozitivnim kliničnim zbiram. Pri nobeni od snovi v koncentraciji, ki jo lahko najdemo v vzorcih materničnega vratu, niso opazili lažno pozitivnih rezultatov.

Lažno negativnih rezultatov niso opazili, z izjemo naslednjih snovi:

- Kontracepcijski žele je povzročil lažno negativne rezultate pri zelo nizki koncentraciji.
- Če je v vzorcu prisotna visoka koncentracija kreme proti glivicam, je lahko v kliničnih vzorcih z vrednostmi DNK HPV, ki so blizu mejne vrednosti za test, poročan lažno negativen rezultat. Vendar pa je zelo malo verjetno, da bo klinični vzorec skoraj v celoti sestavljen iz kreme proti glivicam, ker se maternični vrat rutinsko očisti pred pridobitvijo vzorcev za Pap bris in za testiranje HPV.

Ne odzemi vzorca materničnega vratu SurePath za avtomatizirano pripravo vzorca z uporabo kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, če je prisotna krema proti glivicam ali kontracepcijski žele.

Priprava vzorcev celičnega peleta po gradientu SurePath z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Vpliv krvi in drugih potencialno motečih snovi v vzorcih celičnega peleta po gradientu SurePath je bil ocenjen z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit za pripravo vzorcev in avtomatiziranega testiranja z RCS z uporabo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Testirani je bil vpliv naslednjih potencialno motečih snovi:

- Krema proti glivicam
- Protivnetna krema
- Kri
- Kontracepcijski žele
- Tuš
- Ženske dezodorantne svečke
- Lubrikant
- Spermicid

Vsaka snov je bila dodana negativnim in pozitivnim kliničnim zbirom, ki so bili nato obdelani s sistemom BD PrepMate System za posnemanje vzorca celičnega peleta po gradientu SurePath. Pri krvi in kremi proti glivicam so opazili en sam lažno pozitiven rezultat; vendar statistična analiza ni pokazala pomembnih motenj. Pri nobeni drugi snovi v koncentraciji, ki jo lahko najdemo v vzorcih materničnega vratu, niso opazili lažno pozitivnih rezultatov.

Lažno negativne rezultate so opazili pri kremi proti glivicam, protivnetni kremi in kontracepcijskem želeju. Ne odzemite vzorca materničnega vratu SurePath za avtomatizirano pripravo vzorca z uporabo kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit, če je prisotna krema proti glivicam, protivnetna krema ali kontracepcijski žele.

Prenos

Sistem RCS je bil zasnovan za zmanjšanje kontaminacije vzorca ali prenosa preostale alkalne fosfataze z uporabo pipetnih konic za enkratno uporabo za aspiracijo reagenta in vzorca. Da bi potrdilo to oblikovno značilnost, je družba QIAGEN izvedla več študij, s katerimi je želelo oceniti, ali je uporaba RCS povečala možnost prenosa ali navzkrižne kontaminacije vzorcev v primerjavi z ročno metodo. Za oceno potenciala prenosa iz sistema v sistem je bilo uporabljenih več instrumentov RCS.

V eni študiji so materialu negativne kontrole dodali 2 ng in 20 ng plazmida DNK HPV za pripravo visoko pozitivnih vzorcev STM. Koncentracija 20 ng/ml daje vrednosti RLU, ki so približno 3- do 5-krat višje od vrednosti najvišje pozitivnega kliničnega vzorca, ki se pričakuje med rutinskim kliničnim testiranjem. Ti simulirani visoko pozitivni vzorci so bili postavljeni po celotni mikroplošči v vzorcu šahovnice, ki se je izmenjeval z vdolbinicami, ki so vsebovale samo negativno kontrolo (testne vdolbinice). Ta zasnova upošteva morebitne dodatne učinke zaporednih visoko pozitivnih vzorcev. Mikroplošče so bile nato testirane z uporabo ročne metode testiranja in metode avtomatiziranega testiranja z RCS. Po obdelavi so primerjali število lažno pozitivnih testnih vdolbinic. Avtomatizirano testiranje z RCS ni dalo več lažno pozitivnih testnih vdolbinic kot ročno testiranje s temi simuliranimi vzorci STM, tudi če je bilo na mikroplošči izjemno veliko zaporedje pozitivnih vzorcev.

V drugi oceni prenosa so vzorce PreservCyt HPV-pozitivnih pacientk združili v skupino vzorcev z različnimi ravni kemiluminiscence, da so dobili vrednosti RLU/CO, reprezentativne za razpon, pričakovan med rutinskim kliničnim avtomatiziranim testiranjem z RCS. Pozitivni vzorci so se gibali med približno 200–1800 RLU/CO. Da bi ocenili možnost prenosa, vključno z morebitnimi dodatnimi vplivi zaporednih visoko pozitivnih rezultatov, so te pozitivne člane panela postavili na mikroplošče v vzorcu šahovnice poleg negativnih kontrolnih vdolbinic. Te plošče so nato testirali z metodo avtomatiziranega testiranja z RCS.

Rezultati te ocene prenosa, pri kateri so bili uporabljeni združeni vzorci pacientk, nakazujejo potencialno lažno pozitivno stopnjo 0,3 % zaradi vplivov prenosa pri izvajanju avtomatiziranega testiranja z RCS s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Izkušnje družbe QIAGEN pri izvajanju testov z združenimi vzorci PreservCyt kažejo, da združevanje vzorcev pacientk PreservCyt ustvari vzorce, ki nimajo podobnih lastnosti kot vzorci posamezne pacientke. Čeprav vplivi tega združevanja na potencial prenosa avtomatiziranega testiranja z RCS niso znani, dodatno predklinično testiranje avtomatiziranega testiranja z RCS ni pokazalo povečane možnosti za lažno pozitivne rezultate zaradi prenosa. Te ocene so bile izvedene z uporabo vzorcev umetnih plazmidov s koncentracijo DNK, ki je bila skoraj 5-krat višja od opažene v kliničnem okolju.

Pri tretji oceni prenosa so ustvarili testne vzorce z dodajanjem fluorescentnega barvila v koncentracijah, ki so reprezentativne za dinamični razpon testa RLU, v matrike ozadja, ki so se približale viskoznosti kliničnih vzorcev in reagentov testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Ti testni vzorci so bili nato obdelani s 3 ločenimi instrumenti RCS, pri čemer je bil ovrednoten potencial prenosa vsakega od naslednjih ključnih postopkovnih korakov z RCS:

- Prenos vzorca
- Prenos s plošče na ploščo
- Dodatek sonde
- Stresanje mikroplošče
- Pranje mikroplošče

Nastala fluorescenca je bila izmerjena pri vzbujevalni valovni dolžini 485 nm in emisijski valovni dolžini 535 nm in je bila dovolj občutljiva za zaznavanje dogodka prenosa v razmerju 1:20.000, kar bi ustrezalo lažno pozitivnemu rezultatu s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (tj. 1 pg v 20 ng). Rezultati te ocene niso pokazali nobenega dogodka prenosa med nobenim ključnim postopkovnim korakom z RCS, ki bi privedel do lažno pozitivnega rezultata testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Stabilnost reagenta na plošči

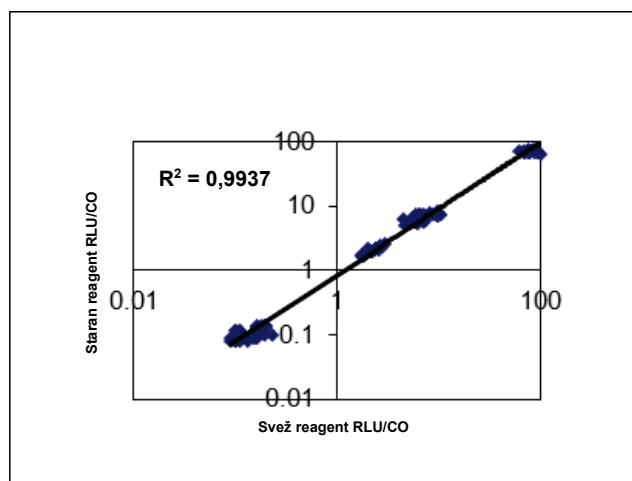
Družba QIAGEN je ocenila značilnosti učinkovitosti avtomatiziranega testiranja z RCS pri uporabi reagentov, ki so ostali na plošči sistema dlje časa. Reagenti, ki bodo najverjetneje dlje časa nameščeni na plošči, vključujejo mešanico sonde, DR1, DR2 in mikroploščo za zajem.

Učinkovitost testa je bila ocenjena z uporabo sveže pripravljenih reagentov in reagentov, ki so se na plošči instrumenta RCS starali 16 ur pri sobni temperaturi (za simulacijo dveh delovnih izmen v laboratoriju). Testiranje simuliranih kliničnih vzorcev je bilo izvedeno z uporabo dveh instrumentov RCS v vsakem od dveh dni testiranja z opredeljeno matriko reagentov (glejte Preglednica 55 spodaj).

Preglednica 55. Zasnova študije za stabilnost reagentov na plošči

Instrument RCS	1. dan	2. dan
1	Starani reagenti	Sveži reagenti
2	Sveži reagenti	Starani reagenti

Graf vseh podatkovnih točk RLU/CO je prikazan na Slika 3 spodaj. Graf in regresijska analiza za starane v primerjavi s svežimi reagenti kažeta na ujemanje med staranimi in svežimi reagenti.



Slika 3. Graf razpršitve, ki primerja vrednosti kalibratorja testa in kontrolnih vrednosti z uporabo staranih in svežih reagentov.

Nadaljnji pregled rezultatov ujemanja kaže, da se pri uporabi starih reagentov kvalitativni rezultati niso spremenili (glejte Preglednica 56 spodaj).

Preglednica 56. Ujemanje med svežimi in staranimi reagenti

Statistična mera	Rezultat.
Splošno ujemanje(%) (n/N)	100,0 % (96/96)
95 % IZ	97,97–100,0
Pozitivno ujemanje (%) (n/N)	100,0 % (64/64)
95 % IZ	97,97–100,0
Negativno ujemanje (%) (n/N)	100,0 % (32/32)
95 % IZ	97,97–100,0
R ²	0,9937
Naklon	0,97
Odsek	0,47
Kappa	1,0

Analiza podatkov kaže, da so rezultati statistično enaki za sveže in starane reagente, kar kaže, da so reagenti dovolj stabilni, ko so na plošči instrumenta v obdobju do 16 ur.

Reference

1. Broker, TR in Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. V: 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, str. 17-36. S konference 1985 Cancer Cells Conference v 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. V: Belshe, R.B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG Wright, str. 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, Francija: Mednarodna agencija za raziskave raka.
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]. V: 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) Vrednotenje natančnosti pripomočkov v klinični kemiji: odobrena smernica. Dokument NCCLS E5-A.

Simboli

Simboli v naslednji preglednici se uporabljajo pri označevanju povezanih izdelkov.

Simbol	Opredelitev simbola
 96/384	Vsebuje dovolj za 96/384 testov
	Koda serije
	In vitro diagnostični medicinski pripomoček
	Simbol z oznako CE-IVD
	Kataloška številka
	Proizvajalec
	Pooblaščen zastopnik v Evropski skupnosti
	Uporabno do
	Omejitev temperature
	Glejte navodila za uporabo
	Globalna trgovinska identifikacijska številka

Navodila za odpravljanje težav

Komentarji in predlogi

Nepravilna sprememba barve ali brez spremembe barve med denaturacijo

- | | |
|--|---|
| a) DNR ni pravilno pripravljen | Prepričajte se, da DNR vsebuje indikatorsko barvilo in je temno vijolične barve. |
| b) DNR ni dodan | Prepričajte se, da je bil vzorcu dodan DNR, tako da izmerite količino vzorca (pričakovano 1,5 ml). Če količina kaže, da DNR ni bil dodan, dodajte pravilen dodatek, premešajte in nadaljujte s testom, če opazite ustrezno spremembo barve. |
| c) Vzorec vsebuje kri ali druge snovi, ki prikrijejo spremembo barve | Pri teh vrstah vzorcev ni pričakovati natančno opisane spremembe barve; to ne sme negativno vplivati na rezultate testa. |
| d) pH vzorca je lahko neobičajno kisel | Če ni nobenega od drugih vzrokov, je lahko vzorec neobičajno kisel in do pričakovane spremembe barve ne pride. Pred nanosom očetne kisline na maternični vrat vzemite nov vzorec, ker bo neustrezen pH vzorca negativno vplival na rezultate testa. |

Kontrole kakovosti dajejo napačne rezultate

- | | |
|--|---|
| a) Za test je bil izbran napačen testni protokol | Če je testni protokol napačen za test, ki ga izvajate, v 30 minutah po dodatku DR2 ponovno odčitajte mikroploščo z uporabo pravilnega testnega protokola. |
| b) Obratna postavitve QC1-LR in QC2-HR | Ponovno testirajte vzorce. |
| c) Obratna postavitve HRC in QC2-HR | Ponovno testirajte vzorce. |

Med hibridizacijo je opažena napačna sprememba barve

- | | |
|--|---|
| a) Neustrezno mešanje mešanice sonde z denaturiranimi kalibratorji, kontrolami kakovosti in/ali vzorci; ali mešanica sonde ni dodana; ali napačna količina dodanega reagenta | Hibridizacijsko mikroploščo ali stojalo za mikroepruvete, ki vsebuje mikroepruvete, stresajte dodatni 2 minuti. Če mikroepruvete ali vdolbinice mikroplošče še vedno ostanejo vijolične, dodajte dodatnih 25 µl pravilne mešanice sonde in dobro premešajte. Če po dodajanju mešanice sonde in ponovnem mešanju ne pride do ustrezne spremembe barve in vzorec ni vseboval krvi ali drugih materialov, ponovno testirajte vzorec. |
| b) Vzorec vsebuje kri ali druge snovi, ki prikrijejo spremembo barve | Pri teh vrstah vzorcev ni pričakovati natančno opisane spremembe barve; to ne sme negativno vplivati na rezultate testa. |

Komentarji in predlogi

- c) Vzorec je imel <1000 µl STM Preverite količino prvotnega vzorca. Količina mora biti 1425 µl ± 20 µl (po odstranitvi 75 µl alikvota za testiranje). Če je količina <1425 µl, je prvotni vzorec vseboval <1000 µl STM. Pridobite nov vzorec.

Test ni uspešen pri validaciji testa; v pozitivnih kalibratorjih, kontrolah kakovosti ali **vzorcih ni opaziti nobenega signala**

- a) Redčilu Probe Diluent ni dodana sonda Pripravite mešanico sonde, kot je opisano v teh navodilih za uporabo. Previdno označite epruvete.
- b) Sonda, kontaminirana z RNazo med pripravo Pri pipetiranju sonde uporabite konice za pipetiranje z aerosolno zaporo in nosite rokavice. Mešanico sonde pripravite v sterilni posodi. Uporabljajte samo čiste, nove posode za reagente za enkratno uporabo.
- c) Neustrezno mešanje mešanice sonde Po dodajanju sonde v redčilo Probe Dilutent zelo temeljito mešajte z vrtinčenjem pri visoki hitrosti vsaj 5 sekund. Nastati mora viden vrtinec.
- d) Neustrezno mešanje mešanice sonde in denaturiranega vzorca Po dodajanju mešanice sonde in vzorca v vsako vdolbinico hibridizacijske mikroplošče ali hibridizacijsko mikroepreveto stresajte na stresalniku Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ±100 vrt/min, 3 ± 2 minuti. Preverite spremembo barve iz vijolične v rumeno v vsaki vdolbinici mikroplošče ali mikroepreveti.
- e) Napačen čas ali temperatura med korakom hibridizacije Hibridizirajte 60 ±5 minut pri 65 ±2 °C. Preverite temperaturo grelnika Microplate Heater I ali vodne kopeli. Prepričajte se, da je grelnik Microplate Heater I ali vodna kopel nastavljena na pravilno temperaturo za segrevanje vzorcev in da je pred uporabo predhodno segret/-a 60 minut. Prepričajte se, da je nivo vode zadosten za segrevanje vzorcev na pravilno temperaturo. Vodne kopeli je treba občasno umeriti.
- f) Neustrezno mešanje med korakom zajemanja Stresajte na stresalniku Rotary Shaker I 60 ± 5 minut pri temperaturi 20–25 °C, kot je opisano v teh navodilih za uporabo. Z umerjanjem preverite hitrost stresalnika Rotary Shaker I. (Glejte *Uporabniški priročnik za Rotary Shaker I*).
- g) Neuspešno dodajanje pravilne količine DR1 ali neuspešna inkubacija za določen čas Z 8-kanalno pipeto pipetirajte 75 µl DR1 v vsako vdolbinico mikroplošče. Inkubirajte 30–45 minut pri temperaturi 20–25 °C.
- h) Neuspešno dodajanje pravilne količine DR2 ali neuspešna inkubacija za določen čas Z 8-kanalno pipeto pipetirajte 75 µl DR2 v vsako vdolbinico mikroplošče. Inkubirajte 15–30 minut pri temperaturi 20–25 °C.

Komentarji in predlogi

- | | |
|--|--|
| i) Okvara instrumenta DML ali nepravilno programiranje | Za nadaljnja navodila glejte ustrezen uporabniški priročnik za instrument DML in uporabniški priročnik za programsko opremo ali se obrnite na tehnično službo družbe QIAGEN. |
|--|--|

Povišane vrednosti RLU v kalibratorjih, kontrolah kakovosti in/ali vzorcih (≥ 200 RLU v številnih ali vseh vdolbinicah mikroplošče); test morda ne bo opravil validacije testa

- | | |
|---|---|
| a) DNR ni dodan; napačna količina dodanega reagenta; neustrezno mešanje DNR z vzorci, kalibratorji ali kontrolami kakovosti | Prepričajte se, da ponavljajoča se pipeta pravilno dovaja, preden dodate DNR. Umerjene pipete so bistvenega pomena. V vsako epruveto dodajte polovico količine DNR in dobro premešajte. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, poskrbite, da tekočina opere celotno notranjo površino epruvete. Kalibratorji, kontrole kakovosti in vzorci se morajo po dodatku DNR obarvati vijolično. |
| b) Prepuščanje svetlobe v instrumentu DML; vrata niso zatesnjena; tesnilo okoli vrat je zlomljeno | Preverite odčitavanje ozadja (merjenje neobdelanih podatkov) instrumenta DML, tako da odčitate prazno mikroploščo. Odčitek, večji od 50 RLU, pomeni, da prihaja do prepuščanja svetlobe. Za navodila glejte uporabniški priročnik za ustrezen instrument DML ali se obrnite na tehnično službo družbe QIAGEN. |
| c) Kontaminacija DR2 ali vdolbinic mikroplošče za zajem z DR1 ali eksogeno alkalno fosfatazo | Glejte »Preverjanje kontaminacije DR2«, stran 111. |
| d) Onesnažen pufer za spiranje | Glejte »Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira«, stran 111. |
| e) Kontaminiran avtomatiziran pralnik plošč | Glejte »Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira«, stran 111. |
| f) Neustrezno pranje vdolbinic mikroplošče za zajem po inkubaciji DR1 | Vdolbinice mikroplošče za zajem 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, bodisi tako, da prelijete vdolbinice ali pa uporabite avtomatiziran pralnik plošč. Po izpiranju v vdolbinicah mikroplošče ne sme biti ostankov rožnate tekočine. Za navodila o preverjanju kontaminacije ali okvar glejte <i>Uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč</i> . |
| g) Kontaminacija vdolbinic mikroplošče z DR1 | Prepričajte se, da so vse delovne površine čiste in suhe. Pri uporabi DR1 bodite previdni. Izogibajte se aerosolom. |
| h) Nanos hibridizacijske raztopine na isto površino brisač Kimtowels ali enakovrednih papirnatih brisač z malo vlaken | Raztopine ne nanašajte ponovno na predhodno uporabljene brisače Kimtowels ali enakovredne papirnate brisače z malo vlaken. |

Komentarji in predlogi

- i) Uporabljene napačne brisače Za pivnanje uporabite brisače Kimtowels ali enakovredne papirnate brisače z malo vlaken.

Nizka razmerja PC/NC ali veliko število nizko pozitivnih vzorcev z razmerji $< 2,0$ ($> 20\%$); test morda ne bo opravil validacije testa

- a) Neustrezna priprava vzorca Dodajte ustrezno količino DNR in temeljito premešajte z vrtinčenjem. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, poskrbite, da tekočina opere celotno notranjo površino epruvete.
- Pri vzorcih PreservCyt poskrbite, da se pred denaturacijsko inkubacijo celični pelet ustrezno premeša in ponovno suspendira.
- Videti morate izrazito spremembo barve od prozorne do temno vijolične. Inkubirajte 45 ± 5 minut pri temperaturi $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- b) Mešanica sonde je neustrezno zmešana ali pa je dodana nezadostna mešanica sonde Pripravite mešanico sonde, kot je opisano. Temeljito premešajte z vrtinčenjem in pazite, da nastane viden vrtnec. Mešanico sonde morate dodati v epruvete s pipeto s pozitivnim izpodrivom ali večkanalno pipeto, da zagotovite natančno dovajanje.
- c) Nezadostna količina mešanice sonde, dodane v vsako hibridizacijsko mikroepruveto ali vdolbinico mikroplošče Pred dodajanjem mešanice sonde se prepričajte, da 8-kanalna pipeta pravilno dovaja. Dodajte 25 μl mešanice sonde v vsako mikroepruveto ali vdolbinico mikroplošče, ki vsebuje denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce. Po dodajanju in temeljitnem mešanju se mora barva spremeniti iz temno vijolične v rumeno. Vzorci PreservCyt bi morali postati rožnati namesto rumeni.
- d) Izguba aktivnosti DR1 DR1 shranjujte pri temperaturi $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uporabite ga pred iztekom roka uporabnosti.
- e) Nezadostno zajemanje Korak zajemanja morate izvesti s stresalnikom Rotary Shaker I, nastavljenim na 1100 ± 100 vrt/min. Potrdite hitrost stresalnika z umerjanjem.
- f) Neustrezno pranje Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, bodisi tako, da prelijete vdolbinice ali pa uporabite avtomatiziran pralnik plošč.
- g) Onesnažen pufer za spiranje Glejte »Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira«, stran 111.

Serije pozitivnih vzorcev s približno enakimi vrednostmi RLU

- a) Kontaminacija vdolbinic mikroplošče za zajem med testom Mikroploščo za zajem pokrijte med vsemi inkubacijami. Med izvajanjem analize se izogibajte izpostavljanju epruvet kontaminaciji z aerosoli. Med manipulacijami nosite rokavice brez pudra.

Komentarji in predlogi

- | | |
|---|---|
| b) Kontaminacija DR2 | Pri pipetiranju DR2 v vdolbinice mikroplošče za zajem pazite, da ne kontaminirate materiala. Izogibajte se kontaminaciji DR2 z aerosoli iz DR1 ali iz laboratorijskega prahu itd. |
| c) Okvara avtomatiziranega pralnika plošč | Za navodila o testiranju kontaminacije ali napak glejte »Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira«, stran 111, ali <i>Uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč</i> . |

Širok CV med ponovitvami

- | | |
|---|---|
| a) Nenatančno pipetiranje | Preverite pipeto in se prepričajte, da se dovajajo obnovljive količine. Redno umerjajte pipete. |
| b) Nezadostno mešanje | V vseh korakih temeljito premešajte. Vrtinčite pred in po inkubaciji denaturacije ter po dodajanju mešanice sonde. Prepričajte se, da nastane viden vrtinec. |
| c) Nepopoln prenos tekočine iz hibridizacijskih mikroepruвет ali hibridizacijskih vdolbinic mikroplošče v vdolbinice mikroplošče za zajem | Prepričajte se, da so med korakom prenosa iz hibridizacijske mikroplošče ali hibridizacijskih mikroepruвет v vdolbinice mikroplošče za zajem prenesene obnovljive količine. |
| d) Neustrezni pogoji pranja | Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, bodisi tako, da prelijete vdolbinice ali pa uporabite avtomatiziran pralnik plošč. |
| e) Kontaminacija vdolbinic mikroplošče z DR1 | Prepričajte se, da so vse delovne površine čiste in suhe. Pri uporabi DR1 bodite previdni. Izogibajte se aerosolom. |

Lažno pozitivni rezultati, pridobljeni iz znanih negativnih vzorcev

- | | |
|--|---|
| a) Kontaminiran DR2 | Pazite, da med alikvotiranjem DR2 med vzorci ne pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev. Če uporabljate samo del kompleta, pred polnjenjem pipete alikvotirajte količino, potrebno za ta test, v čisto posodo za reagent za enkratno uporabo. |
| b) Kontaminacija vdolbinic mikroplošče z DR1 | Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, bodisi tako, da prelijete vdolbinice ali pa uporabite avtomatiziran pralnik plošč. Po izpiranju v vdolbinicah mikroplošče ne sme biti ostankov rožnate tekočine. |
| c) Nanos na isto površino brisač Kimtowels ali enakovrednih papirnatih brisač z malo vlaken v več vrstah | Ne nanašajte na predel, ki je bil že uporabljen. |

Komentarji in predlogi

- | | |
|---|--|
| d) Neustrezna priprava vzorca | <p>Dodajte ustrezno količino DNR in temeljito premešajte z vrtinčenjem. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, poskrbite, da tekočina opere celotno notranjo površino epruvete.</p> <p>Pri ročni pripravi vzorcev PreservCyt poskrbite, da se pred denaturacijsko inkubacijo celični pelet ustrezno premeša in ponovno suspendira. Glejte navodila za uporabo kompleta <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.</p> <p>Videti morate izrazito spremembo barve od prozorne do temno vijolične. Inkubirajte 45 ± 5 minut pri temperaturi 65 ± 2 °C. Pri ročni pripravi vzorcev SurePath poskrbite, da bodo vzorci inkubirani 90 ± 5 minut pri temperaturi 65 ± 2 °C.</p> |
| e) Neustrezni pogoji pranja | <p>Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, bodisi tako, da prelijete vdolbinice ali pa uporabite avtomatiziran pralnik plošč.</p> |
| f) Kontaminacija konice pipete z nedenaturiranim materialom med prenosom denaturiranega vzorca v hibridizacijsko mikroepreveto ali vdolbinico hibridizacijske mikroplošče | <p>Korak denaturacije v postopku obdelave vzorca je treba izvesti, kot je navedeno v teh navodilih za uporabo. Nepravilno vrtinčenje vzorca, obračanje epruvete in mešanje lahko povzročijo nepopolno denaturacijo nespecifičnih hibridov RNK-DNK, endogenih za vzorce materničnega vratu. Zlasti pri vzorcih PreservCyt ali SurePath so ti hibridi verjetno prisotni na notranjih stenah epruvete za denaturacijo vzorca. Da preprečite prenos tega nedenaturiranega celičnega materiala, se konica pipete med prenosom denaturiranega vzorca v hibridizacijsko mikroepreveto ali vdolbino hibridizacijske mikroplošče ne sme dotikati stranic epruvete za denaturacijo vzorca.</p> |

Povišane vrednosti NC RLU (> 200 RLU); preostanek testa deluje po pričakovanjih

- | | |
|--|---|
| a) DR2 je bil inkubiran pri temperaturi nad 20–25 °C | <p>Znova zaženite test in se prepričajte, da sta koraka zajema in zaznavanja inkubirana pri temperaturi 20–25 °C.</p> |
| b) DR2 je bil inkubiran dlje kot 30 minut | <p>Mikroploščo odčitajte po 15 minutah inkubacije (in najpozneje po 30 minutah inkubacije) pri temperaturi 20–25 °C.</p> |
| c) DR2 ali pufer za spiranje je bil kontaminiran z alkalno fosfatazo ali DR1 | <p>Glejte »Preverjanje kontaminacije DR2«, stran 111, ali »Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira«, stran 111.</p> |

Test ni uspešen pri validaciji testa; povišan $PC\bar{X}/NC\bar{X}$

- | | |
|----------------------------------|--|
| Obratna postavitev HRC in QC2 HR | <p>Ponovno testirajte vzorce. Pozorno preberite oznake na vialah kalibratorjev in kontrol kakovosti, da preprečite zamenjavo namestitve teh reagentov.</p> |
|----------------------------------|--|

Preverjanje kontaminacije DR2

1. S pipeto odmerite 75 µl alikvotirane, preostale ali izvirne viala DR2 v vdolbinico mikroplošče za slepi zajem.

Opomba: Testiranje DR2 v ponovitvah po 3 zagotavlja optimalno oceno učinkovitosti.

2. Inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi.
3. Izmerite mikroploščo z instrumentom DML.

Kontrola DR2 mora biti < 50 RLU.

Če so vrednosti DR2 < 50 RLU, se lahko DR2 uporabi za ponovitev testa.

Če je DR2 kontaminiran (> 50 RLU), pridobite nov komplet in ponovite test.

Preverjanje kontaminacije naprave za pranje in/ali vodnega vira

1. Označite vdolbinice 1–4. Pipetirajte 75 µl DR2 v 4 ločene vdolbinice mikroplošče za zajem. Vdolbinica 1 služi kot kontrola DR2.
2. V vdolbinico mikroplošče 2 pipetirajte 10 µl pufru za spiranje iz stekleničke za pranje.
3. Dovolite, da pufer za spiranje teče skozi cev za spiranje. V vdolbinico mikroplošče 3 pipetirajte 10 µl pufru za spiranje iz ceve.
4. Pridobite alikvot vode, uporabljene za pripravo pufru za spiranje. V vdolbinico mikroplošče 4 pipetirajte 10 µl vode.
5. Inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi.
6. Izmerite mikroploščo z instrumentom DML.

Kontrola DR2 (vdolbinica 1) mora biti < 50 RLU.

Primerjajte RLU iz vdolbinic 2, 3 in 4 s kontrolno RLU DR2. Posamezna RLU za vdolbinice 2, 3 in 4 ne sme preseči 50 RLU kontrolne RLU DR2.

Vrednosti, ki presegajo 50 RLU kontrolne RLU DR2, kažejo na kontaminacijo. Za navodila o čiščenju in vzdrževanju naprave za pranje glejte »Ročna metoda spiranja«, stran 46.

Preverjanje kontaminacije avtomatiziranega pralnika plošč

1. Označite vdolbinice 1–5. Pipetirajte 75 µl DR2 v 5 ločenih vdolbinic mikroplošče za zajem. Vdolbinica 1 služi kot kontrola DR2.
2. V vdolbinico mikroplošče 2 pipetirajte 10 µl pufru za spiranje iz stekleničke pralnika plošč za pranje.
3. V vdolbinico mikroplošče 3 pipetirajte 10 µl tekočine za izpiranje iz stekleničke pralnika plošč za izpiranje.
4. Pritisnite gumb Prime (Napolni) na tipkovnici pralnika plošč, da pufer za spiranje začne teči skozi cevke. V vdolbinico mikroplošče 4 pipetirajte 10 µl pufru za spiranje.
5. Pritisnite gumb Rinse (Izperi) na tipkovnici pralnika plošč, da tekočina za izpiranje začne teči skozi cevke. V vdolbinico mikroplošče 5 pipetirajte 10 µl pufru za spiranje.
6. Pokrijte in inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi.
7. Izmerite mikroploščo z instrumentom DML.

Kontrola DR2 (vdolbinica 1) mora biti < 50 RLU.

Primerjajte RLU iz vdolbinic 2, 3, 4 in 5 s kontrolno RLU DR2. Posamezna RLU za vdolbinice 2, 3, 4 in 5 ne sme preseči 50 RLU kontrolne RLU DR2.

Vrednosti, ki presegajo 50 RLU kontrolnega DR2, kažejo na kontaminacijo pralnika plošč.

Za postopek dekontaminacije glejte *Uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč*.

Kontaktne podatke

Če želite stopiti v stik z lokalnim predstavnikom družbe QIAGEN, uporabite list s kontaktnimi podatki družbe QIAGEN, ki je priložen testnemu kompletu.

Večje spremembe

Pomembne spremembe v tej reviziji navodil za uporabo testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test so povzete v spodnji preglednici:

Poglavje	Stran	Sprememba/e
Opozorila in previdnostni ukrepi	22	Nove informacije GHS
Biopsije materničnega vratu	25	Biopsije do 5 mm
Blagovne znamke	127	Odstranjeni patenti

Ta stran je namenoma prazna

Blagovne znamke: 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.).

V tem dokumentu uporabljena registrirana imena, blagovne znamke itd. se ne smejo šteti kot nezaščitene z zakonom, čeprav niso izrecno označene kot takšne.

Omejena licenčna pogodba za test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test

Kupec ali uporabnik izdelka z njegovo uporabo soglaša z naslednjimi pogoji:

1. Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so zagotovljeni z izdelkom, in s temi navodili za uporabo ter skupaj s sestavnimi deli v kompletu. Družba QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo priloženih sestavnih delov tega kompleta s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu kompletu, razen kot je opisano v protokolih, ki so zagotovljeni z izdelkom, in v teh navodilih za uporabo.
2. Razen izrecno navedenih licenc, družba QIAGEN ne jamči, da ta komplet in/ali njegova uporaba ne kršita pravic drugih strank.
3. Ta komplet in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno znova uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej, razen če družba QIAGEN določi drugače.
4. Družba QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik kompleta se strinja, da ne bosta izvajala ali komu drugemu dovolila izvajati kakršnih koli ukrepov, ki bi lahko privedli do zgoraj prepovedanih dejstev ali jih omogočili. Družba QIAGEN lahko prepovedi iz tega sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem kompletom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje si oglejte spletno stran www.qiagen.com.

© 2012–2018 QIAGEN. Vse pravice pridržane.

