

Februar 2019

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

Analiza hibridizacije nukleinske kisline in vitro s pomnoževanjem signala z uporabo kemiluminiscence mikroplošč za kvalitativno odkrivanje 18 vrst DNK humanega papiloma virusa (HPV) z nizkim in visokim tveganjem v vzorcih materničnega vratu

Za uporabo z:

pripomočkom *digene* HC2 DNA Collection Device

transportnim medijem *digene* Specimen Transport Medium

raztopino Hologic PreservCyt[®] Solution

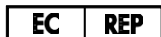
tekočino za konzerviranje BD SurePath[®] Preservative Fluid



5196-1330



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, ZDA



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMČIJA

L2126en, rev. 8

Vsebina

Predvidena uporaba.....	5
Povzetek in obrazložitev	7
Princip postopka.....	8
Vsebina kompleta.....	9
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo.....	11
Opozorila in previdnostni ukrepi.....	14
Varnostni previdnostni ukrepi	14
Avtomatizirano testiranje z RCS.....	15
Izjave o varnosti in tveganju za sestavne dele	15
Previdnostni ukrepi za ravnanje	17
Priprava in shranjevanje reagenta.....	19
Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi.....	23
Vzorci materničnega vratu v STM	23
Biopsije materničnega vratu	23
Vzorci materničnega vratu v raztopini PreservCyt Solution	24
Vzorci materničnega vratu v tekočini SurePath Preservative Fluid	25
Protokol.....	26
Preskušanje prepustnosti vzorca velikega volumna z uporabo sistema Rapid Capture System.....	26
Ročna metoda	27
Denaturacija	30
Vrtinčenje in denaturacija	36
Hibridizacija: Metode koktajla kombinirane sonde (CPC) in dvojne sonde.....	41

Zajem hibridov	45
Zaznavanje hibridov	47
Pranje	48
Pomnoževanje signala	50
Merila za preverjanje umerjanja analize	51
Izračun mejne vrednosti	55
Kontrola kakovosti	57
Interpretacija rezultatov vzorcev	59
Značilnosti učinkovitosti	60
Indikacija podatkov, ki podpirajo HPV z nizkim in visokim tveganjem	60
Podatki, ki podpirajo indikacijo primarnega presejanja HPV z visokim tveganjem	67
Analitična občutljivost	73
Učinkovitost koktajla kombinirane sonde (CPC)	75
Enakovrednost med vzorci STM in PreservCyt Solution	75
Korelacija rezultata vzorca SurePath z vzorci STM v klinični populaciji	76
Obnovljivost	77
Navzkrižna reaktivnost	78
Panel za navzkrižno reaktivnost	78
Navzkrižna hibridizacija	80
Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce STM	80
Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce PreservCyt Solution	81
Ponovljivost testa <i>digene</i> hc2 HPV DNA Test s kliničnimi vzorci, zbranimi v STM	81

Ponovljivost testa <i>digene</i> hc2 HPV DNA Test s kliničnim vzorci, zbranimi v PreservCyt Solution	83
Ponovljivost testa <i>digene</i> hc2 high-risk HPV DNA Test z vzorci, zbranimi v tekočini Surepath Preservative Fluid	85
SurePath zagotavlja ponovljivost pri uporabi sistema Rapid Capture System za obdelavo analize.....	86
Omejitve postopka	88
Reference	90
Navodila za odpravljanje težav.....	94
Preverjanje kontaminacije	100
Povzetek za <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test.....	102
Razlaga simbolov.....	105
Informacije za naročanje	106

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo in vitro.

Test *digene* HC2 HPV DNA Test z uporabo tehnologije Hybrid Capture® 2 (HC2) je hibridizacijska analiza nukleinske kisline s pomnoževanjem signala z uporabo kemiluminiscence mikroplošč za kvalitativno odkrivanje 18 nizko tveganjih in visoko tveganjih tipov DNK HPV v vzorcih materničnega vratu.

Vzorci materničnega vratu, ki jih je mogoče testirati s testom *digene* HC2 HPV DNA Test, vključujejo naslednje:

- vzorce materničnega vratu, odvzete s pripomočkom *digene* HC2 DNA Collection Device
- vzorce, zbrane z napravo za zbiranje v obliki metle ali kombinacijo čopiča/lopatice in dane v raztopino PreservCyt Solution (za popolne podrobnosti glejte navodila za uporabo kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit)
- vzorce, zbrane v tekočini SurePath Preservative Fluid (SAMO za testiranje DNK HPV z visokim tveganjem)
- biopsijske vzorce, zbrane v transportnem mediju *digene* Specimen Transport Medium (STM)

Pri uporabi sond HPV z nizkim in visokim tveganjem je uporaba tega testa indicirana:

- Za pomoč pri diagnosticiranju spolno prenosljivih okužb s HPV s tipi HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68.
- Za razlikovanje med dvema skupinama DNK HPV: tipi HPV z nizkim tveganjem 6, 11, 42, 43 in 44 ter tipi HPV z visokim tveganjem 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68; vendar prisotnega specifičnega tipa HPV ni mogoče določiti.

Pri uporabi sonde za HPV z visokim tveganjem je uporaba testa 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 (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) ali skvamozno intraepitelno lezijo visoke stopnje (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) so rezultati brisa Pap pred kolposkopijo. Pri teh bolnicah bo rezultat testa *digene* HC2 HPV DNA Test pomagal zdravniku pri vodenju bolnice, saj bo pomagal pri oceni tveganja žensk, da se ugotovi odsotnost bolezni visoke stopnje.

Test *digene* HC2 HPV DNA Test je treba uporabljati v povezavi s kliničnimi informacijami, pridobljenimi z drugimi diagnostičnimi in presejalnimi testi, fizičnimi pregledi in popolno zdravstveno anamnezo v skladu z ustreznimi postopki vodenja bolnikov. Rezultati testa *digene* HC2 HPV DNA Test se ne smejo uporabljati kot edina osnova za klinično oceno in zdravljenje bolnikov.

Povzetek in obrazložitev

Prisotnost določenih vrst 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 se ti virusi prenašajo pretežno spolno in da so visokorizični tipi HPV glavni priznani dejavnik tveganja za razvoj raka materničnega vratu.^{4–8}

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 epitelijskih celic se virusna DNK vzpostavi po vsej debelini epitelijskega, 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.

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.

V preteklosti sta HPV 16 in HPV 18 veljala za visokorizični HPV, povezan z rakom, HPV tipa 6 in 11 pa za nizkorizični HPV.^{8–10} Kasneje je bilo dokazano, da so tipi HPV 31, 33 in 35 vmesno povezani z rakom.^{2,11–14} Kljub temu uporabnemu konceptualnemu okviru teh 7 tipov HPV predstavlja le približno 70 % neoplazem materničnega vratu.^{9–11} Dodatni HPV, vključno s tipi 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68, so bili identificirani kot glavni HPV, ki jih je mogoče zaznati v preostalih lezijah^{15–20, 32–36}. Te tipe HPV je mogoče razvrstiti tudi v skupine z nizkim, srednjim in visokim tveganjem glede na njihovo relativno porazdelitev v različnih kategorijah histopatološke diagnoze.^{21, 32–37}

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.^{2,10,21,31} Prospektivne študije so pokazale, da je 15–28 % žensk z DNK HPV-pozitivnim rezultatom razvilo skvamozno intraepitelno neoplazijo (SIL) v 2 letih v primerjavi s samo 1–3 % žensk z DNK HPV-negativnim rezultatom.^{22,23} Zlasti je bilo tveganje za napredovanje tipov HPV 16 in 18 večje (približno 40 %) kot pri drugih tipih HPV.²²

Princip postopka

digene HC2 HPV DNA Test, ki uporablja tehnologijo HC2, je analiza za odvzem hibridizacijskih protiteles s pomnoženim signalom, ki uporablja kemiluminiscenčno detekcijo na mikroplošči. 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 kot relativne svetlobne enote (Relative Light Units, RLU) na luminometru. Intenzivnost oddane svetlobe označuje prisotnost ali odsotnost ciljne DNK v vzorcu.

Meritev RLU, ki je enaka ali višja od mejne vrednosti, kaže na prisotnost sekvenc HPV DNK v vzorcu. Meritev RLU, nižja od mejne vrednosti, kaže na odsotnost specifičnih testiranih zaporedij DNK HPV ali na ravni DNK HPV pod mejo zaznavnosti analize.

Preskušanje prepustnosti vzorca velikega volumna s testom *digene* HC2 HPV DNA Test je mogoče izvesti z uporabo sistema Rapid Capture® System (RCS). Ta instrument obdela do 352 vzorcev v osmih urah. Da bi omogočili testiranje prepustnosti vzorca z velikim volumnom, vse postopkovne korake analize izvede RCS, z izjemo denaturacije vzorca, zaznavanja kemiluminiscenčnega signala in poročanja o rezultatih.

Vsebina kompleta

V enem kompletu digene HC2 HPV DNA Test je 96 testov (kat. št. 5196-1330). Število rezultatov bolnic se bo razlikovalo glede na število uporab na komplet:

- 1 uporaba = 40 rezultatov bolnic (z nizkim in visokim tveganjem)
- 2 uporabi = 32 rezultatov bolnic (z nizkim in visokim tveganjem)

1 × 0,35 ml	Indikator Dye (indikatorsko barvilo) Vsebuje 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 × 50 ml	Denaturacijski reagent raztopina razredčenega natrijevega hidroksida (NaOH).
1 × 5 ml	Redčilo sonde Pufrana raztopina z 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 x 150 µl	Sonda za HPV z nizkim tveganjem Sonda RNK HPV 6/11/42/43/44 v pufrani raztopini (zeleni pokrovček).
1 x 100 µl	High-Risk HPV Probe (Sonda za HPV z visokim tveganjem) HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 sonda RNK v pufrani raztopini (rdeči pokrovček).
1 × 1 ml	Low-Risk HPV Quality Control (Kontrola kakovosti HPV z nizkim tveganjem) 5 pg/ml (500.000 kopij/ml) klonirane DNK HPV 6 in nosilne DNK v STM z 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 × 1 ml	High-Risk HPV Quality Control (Kontrola kakovosti za HPV z visokim tveganjem) 5 pg/ml (500.000 kopij/ml) klonirane DNK HPV 16 in nosilne DNK v STM z 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 × 2,0 ml	Negativen kalibrator Nosilna DNK v mediju za transport vzorca z 0,05 % m/v natrijevega azida.

1 × 1,0 ml	Kalibrator HPV z nizkim tveganjem 1 pg/ml klonirane DNK HPV 11 in nosilne DNK v STM z 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 × 1,0 ml	High-Risk HPV Calibrator (Kalibrator za HPV z visokim tveganjem) 1 pg/ml klonirane DNK HPV 16 in nosilne DNK v STM z 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 × 1	Capture Microplate (Mikroplošča za zajem) Obložena s hibridnimi protitelesi proti RNK:DNK.
1 × 12 ml	Detection Reagent 1 (Reagent za zaznavanje 1) Z alkalno fosfatazo konjugirana protitelesa proti hibridom RNK:DNK v pufrani raztopini z 0,05 % m/v natrijevega azida.
1 × 12 ml	Detection Reagent 2 (Reagent za zaznavanje 2) CDP-Star® z Emerald II (kemiluminiscenčni substrat).
1 × 100 ml	Koncentrat pufra za spiranje Vsebuje 1,5 % m/v natrijevega azida.

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

In vitro diagnostična oprema in dodatki za sistem Hybrid Capture System*	
Sistem <i>digene</i> Hybrid Capture 2 System (»sistem <i>digene</i> HC2«), ki ga sestavljajo luminometer, ki ga je odobrila družba QIAGEN (»instrument DML«), osebni računalnik in periferne naprave (monitor, tipkovnica, miška, tiskalnik in kabel tiskalnika), ki jih je odobrila družba QIAGEN, programska oprema sistema <i>digene</i> HC2 System (»programska oprema za analizo testov <i>digene</i> «), protokoli za analizo sistema <i>digene</i> HC2 System za HPV, programska oprema LumiCheck Plate in uporabniški priročnik za programsko opremo sistema <i>digene</i> HC2 System	Rapid Capture System (izbirno za testiranje prepustnosti vzorca velikega volumna) [†]
Rotacijski stresalnik Hybrid Capture System Rotary Shaker I	Naprava za pranje
Grelec za mikroplošče Hybrid Capture System Microplate Heater I	Mikroplošče Hybridization Microplate
Pralnik plošč Hybrid Capture System Automated Plate Washer	Pokrovi Microplate Lids
Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (izbirno) [‡]	Prazni trakovi za mikroplošče (na voljo pri Costar, model št. 2581); izbirno za uporabo z avtomatiziranim pralnikom plošč
Konverzijsko stojalo on pokrov (izbirno)	Zelo dolge konice za pipete za odvzem vzorca
Stojalo za vzorce in pokrov <i>digene</i> Specimen Rack and Rack lid (izbirno)	Epruvete za odvzem vzorcev
EXPAND-4 Pipettor and Stand (izbirno) [§]	Stojalo za epruvete za odvzem vzorcev
<i>digene</i> HC2 DNA Collection Device**	Navojni zamaški za epruvete za odvzem vzorcev
Tube Sealer Dispenser and cutting device (izbirno, uporablja se z vibracijskim mešalnikom MST Vortexer 2)	Rezervoarji za reagente za enkratno uporabo
DuraSeal™ Tube Sealer Film	Hibridizacijske mikroeprovete
Microtube Rack	Tesnila za plošče

* Pri družbi QIAGEN so na voljo samo oprema in dodatki, potrjeni s testi *digene* HC2 HPV DNA Test.

† Glejte uporabniški priročnik sistema *Rapid Capture System* za navodila, specifična za uporabo tega sistema za testiranje pretoka vzorca velikega volumna s to analizo.

‡ Potrebno tudi za uporabo pri izvajanju polavtomatizirane aplikacije RCS.

§ Izdelek po meri. Uporabite lahko druge razširljive večkanalne pipete po meri, pod pogojem, da je pri razširitvi dosegljiv razmik med konicami 3,2 cm. Namesto tega lahko uporabite enokanalno pipeto, ki lahko pipetira 75 µl.

** Značilnosti učinkovitosti testa *digene* HC2 HPV DNA Test so bile določene samo z navedenimi kompleti za odvzem.

Oprema in dodatki za splošno laboratorijsko uporabo	Dodatna oprema in dodatki za obdelavo vzorcev PreservCyt Solution
Vodna kopel s temperaturo 65 ± 2 °C, ki je dovolj velika, da lahko vanjo namestite eno konverzijsko stojalo (36 x 21 x 9 cm) ali stojala za vzorce	Centrifuga z vrtljivim vedrom, ki lahko doseže 2900 $\pm$ 150 x g in drži 10-ml ali 15-ml konične polipropilenske centrifugalne epruvete
Mikrocentrifuga (izbirno za centrifugiranje vial s sondo za doseganje največjega volumna sonde)	5-ml serološke ali prenosne pipete
Vrtinčni mešalnik z nastavkom za skodelice	<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit*
Enokanalni mikropipetor; spremenljive nastavitve za volumne 20–200 μ l in 200–1000 μ l	Konice za enkratno uporabo za Eppendorf Repeater Pipette (50 in 100 μ l)
Pipetor s ponavljajočim pozitivnim izpodrivom, kot je Eppendorf® Repeater® Pipette ali podoben pipetor	<u>Za postopek ročnega vrtinčenja</u>
8-kanalni pipetor: spremenljive nastavitve za volumne 25–200 μ l	<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml, konične)†, Sarstedt 10-ml konične epruvete s pokrovčki ali 15-ml polipropilenske centrifugalne epruvete s koničnim dnom s pokrovčki znamke VWR® ali Corning®
Časovnik	Stojalo za epruvete za 10-ml ali 15-ml konične epruvete
Raztopina natrijevega hipoklorita, 5 % v/v (ali gospodinjsko belilo)	<u>Za postopek z vrtinčnim mešalnikom Multi-Specimen Tube Vortexer 2</u>
Parafilm® ali enakovreden izdelek	<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml, konične)†
Konice za pipete z aerosolno zaporo za enkratno uporabo za enokanalni pipetor (20 do 200 μ l in 200 do 1000 μ l)	Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
Konice za enkratno uporabo za Eppendorf Repeater Pipette (25 in 500 μ l)	Konverzijsko stojalo in pokrov (specifično za 15-ml konične epruvete)
Konice za enkratno uporabo za 8-kanalni pipetor (25 do 200 μ l)	Razdelilnik tesnil za epruvete in naprava za rezanje
Kimtowels® Wipers ali enakovredne papirnate brisače, ki ne puščajo vlaken	DuraSeal Tube Sealer Film (ki se uporablja z vrtinčnim mešalnikom MST Vortexer 2)
Prevleka za mizo za enkratno uporabo	
Rokavice brez pudra	
5-ml in/ali 15-ml zaskočne polipropilenske epruvete z okroglim dnom (za razredčino sonde)	
2,0-ml polipropilenske mikrocentrifugalne epruvete s pokrovčki	

* Pri družbi QIAGEN so na voljo samo oprema in dodatki, potrjeni s testi *digene* HC2 HPV DNA Test.

† *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (blagovna znamka VWR ali Corning®), ki so na voljo pri družbi QIAGEN, je treba uporabiti za zagotovitev ustrezne učinkovitosti analize pri uporabi postopka z vrtinčnim mešalnikom Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

Dodatna oprema in dodatki za obdelavo vzorcev SurePath Preservative Fluid
Centrifuga z vrtljivim vedrom, ki lahko doseže $800 \pm 15 \times g$ in drži 15-ml konične polipropilenske centrifugalne epruvete
<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml konične epruvete)*
7-ml standardne pipete s konico za prenos ali enakovredne
Transportni medij za vzorce QIAGEN
Konice za enkratno uporabo za Eppendorf Repeater Pipette (100 µl)

* *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (blagovna znamka VWR ali Corning®), ki so na voljo pri družbi QIAGEN, je treba uporabiti za zagotovitev ustrezne učinkovitosti analize pri uporabi postopka z vrtničnim mešalnikom Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

Opozorila in previdnostni ukrepi

PRED UPORABO KOMPLETA NATANČNO PREBERITE VSA NAVODILA.

Varnostni previdnostni ukrepi

Z VSEMI VZORCI morate ravnati kot s potencialno kužnim materialom. 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/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.^{42,43}
- Dekontaminirajte in zavrzite vse vzorce, reagente in druge potencialno kontaminirane materiale v skladu z nacionalnimi in lokalnimi predpisi.

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 in (4) dobro sperite z vodo.

Avtomatizirano testiranje z RCS

Za dodatna opozorila in previdnostne ukrepe, specifične za uporabo tega sistema za testiranje prepustnosti vzorca velikega volumna, glejte *uporabniški priročnik sistema Rapid Capture System*.

Izjave o varnosti in tveganju za sestavne dele

Za sestavne dele kompleta *digene* HC2 HPV DNA Test kit 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.

Kalibrator 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 pufra 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.

Za dodatne informacije si oglejte varnostne liste na spletni strani www.qiagen.com/safety.

Previdnostni ukrepi za ravnanje

- Za diagnostično uporabo in vitro.
- Cervikalna ščetka je samo za uporabo pri ženskah, ki niso noseče.
- Reagentov ne uporabljajte po preteku roka uporabnosti, ki je naveden poleg simbola  na nalepki zunanje škatle.
- Izvajanje analize izven navedenih časovnih in temperaturnih razponov lahko povzroči neveljavne rezultate. Analize, ki ne spadajo v določene časovne in temperaturne razpone, so neveljavne in jih je treba ponoviti.
- Za pridobitev zanesljivih rezultatov testa je treba natančno upoštevati postopek *digene* HC2 HPV DNA Test, merila za preverjanje umerjanja analize, kontrolo kakovosti in interpretacijo rezultatov vzorcev.
- Pomembno je, da s pipeto nanese točno navedeni volumen 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.
- Komponente kompleta so bile testirane kot enota. Ne zamenjajte komponent iz drugih virov ali iz različnih serij.
- 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 analize nosite rokavice brez pudra.
- Prepričajte se, da med izvajanjem analize preprečite kontaminacijo mikroplošče za zajemanje in reagenta za zaznavanje 2 z eksogeno alkalno fosfatazo. Snovi, ki lahko vsebujejo alkalno fosfatazo, vključujejo reagent za zaznavanje 1, bakterije, slino, lase in olja iz kože. To, da mikroploščo za zajemanje pokrijete po koraku pranja in med inkubacijo z reagentom za zaznavanje 2 je še posebej pomembno, saj lahko eksogena alkalna fosfataza reagira z reagentom za zaznavanje 2 in povzroči lažno pozitivne rezultate.
- Zaščitite reagent za zaznavanje 2 pred dolgotrajno izpostavljenostjo neposredni svetlobi. Uporabite reagent za zaznavanje 2 takoj po alikvotiranju in se izogibajte neposredni sončni svetlobi.

- Ponavljajoči se pipetor je treba pripraviti pred dovajanjem reagenta in redno preverjati, ali obstajajo veliki zračni mehurčki. Prekomerne količine velikih zračnih mehurčkov v ponavljajoči se konici pipetorja lahko povzročijo netočno dovajanje in temu se lahko izognete tako, da napolnite pipetor, odmerite vso tekočino in ponovno napolnite. Za posebna navodila za uporabo si oglejte navodila za uporabo pipetorja.
- Večkanalno pipetiranje je treba izvesti s tehniko obratnega pipetiranja (glejte Zaznavanje hibridov) za odmerjanje reagentov za zaznavanje 1 in 2. Vsako konico pipete na večkanalnem pipetorju preverite glede pravilnega prileganja in polnjenja.
- Prepričajte se, da je vsaka vdolbinica mikroplošče temeljito oprana, kot je navedeno v navodilih za ročno pranje. Neustrezno pranje bo povzročilo povečano ozadje in lahko povzroči lažno pozitivne rezultate. Preostali pufer za spiranje v vdolbinicah lahko povzroči zmanjšan signal ali slabo ponovljivost.
- Počakajte vsaj 60 minut, da se Hybrid Capture System Microplate Heater I uravnoteži na $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ od hladnega zagona. Če ne dovolite tega obdobja ogrevanja, lahko pride do taljenja mikroplošče Hybridization Microplate. Za podrobnosti si oglejte *Uporabniški priročnik za Microplate Heater I*.

Priprava in shranjevanje reagenta

- Po prejemu hranite komplet pri temperaturi 2–8 °C. Koncentrat pufra za spiranje, denaturacijski reagent in indikatorsko barvilo lahko po želji shranite pri temperaturi 2–30 °C.
- Ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti, ki je naveden poleg simbola  na nalepki škatle ali roku uporabnosti pripravljenih reagentov (glejte spodaj).
- Vsi reagenti so pripravljeni za uporabo, razen denaturacijskega reagenta, sond HPV z nizkim in visokim tveganjem ter koncentrata pufra za spiranje.

Za testiranje vzorcev na prisotnost katerega koli od 18 tipov HPV je bila na voljo metoda Koktajl kombinirane sonde (CPC). Za testiranje s to možnostjo je treba pripraviti koktajl kombinirane sonde z mešanjem razredčene mešanice sonde za HPV z nizkim tveganjem in razredčene mešanice sond za HPV z visokim tveganjem pred izvedbo testa *digene* HC2 HPV DNA Test. Metoda dvojne sonde uporablja ločene mešanice sond za HPV z nizkim in visokim tveganjem. Glej navodila spodaj.

Za testiranje prepustnosti vzorca velikega volumna glejte *Uporabniški priročnik sistema Rapid Capture System* za pripravo mešanice sonde HPV, pufra za spiranje, reagenta za zaznavanje 1 in reagenta za zaznavanje 2, saj so ta navodila specifična za uporabo tega sistema za testiranje prepustnosti vzorca velikega volumna.

Reagent	Metoda priprave												
Denaturacijski reagent	Najprej pripravite: 1. V stekleničko denaturacijskega reagenta dodajte 5 kapljic indikatorskega barvila in dobro premešajte. Denaturacijski reagent mora imeti enakomerno temno vijolično barvo. 2. Ko je denaturacijski reagent pripravljen, je stabilen tri mesece, če ga hranite pri temperaturi 2–8 °C. Označite ga z novim rokom uporabnosti. Če barva zbledi, dodajte 3 kapljice indikatorskega barvila in pred uporabo dobro premešajte. Opozorilo: Denaturacijski reagent je jedek. Nositi primerna zaščitna oblačila, zaščitne rokavice in zaščito za oči/obraz. Pri ravnanju bodite previdni.												
Mešanica sonde za HPV z nizkim tveganjem (pripravljena iz reagentov sonde za HPV z nizkim tveganjem in redčila sonde)	Pripravite med inkubacijo denaturacije vzorca: Pomembno: Včasih se sonda ujame v pokrov vial. Opomba: Poskrbite, da preprečite kontaminacijo sonde in mešanice sonde z RNazo. Za pipetiranje sonde uporabite konice za pipete z aerosolno pregrado. Redčilo sonde je viskozno. Pri pripravi HPV sond poskrbite za temeljito mešanje. Med korakom mešanja se mora v tekočini oblikovati viden vrtinec. Nepopolno mešanje lahko povzroči zmanjšan signal. ● Na kratko centrifugirajte vialo sonde za HPV z nizkim tveganjem, da pride tekočina na dno vial. Nežno tapkajte, da premešate. ● Določite potrebno količino mešanice sonde (25 µl/test). Priporočljivo je, da naredite dodatno mešanico sonde, da tako upoštevate volumen, ki se lahko izgubi v konicah za pipete ali na straneh vial. Glejte spodaj navedene predlagane volumne. Najmanjše priporočeno število vdolbinic za vsako uporabo je 24. Če je zaželenih manj kot 24 vdolbinic na analizo, se lahko skupno število testov na komplet zmanjša zaradi omejenih volumnov sonde in redčila sonde. ● Prenesite potrebno količino redčila sonde v novo posodico za enkratno uporabo. Odvisno od števila testov se priporoča bodisi 5-ml ali 15-ml polipropilenska epruveta z zaskočnim pokrovčkom in okroglim dnom. Naredite razredčino 1 : 25 sonde za HPV z nizkim tveganjem v redčilu sonde, da pripravite mešanico sonde. <table><tr><th>Število testnih lističev</th><th>Volumen redčila sonde*</th><th>Volumen sonde*</th></tr><tr><td>48/6</td><td>2,0 ml</td><td>80,0 µl</td></tr><tr><td>24/3</td><td>1,0 ml</td><td>40,0 µl</td></tr><tr><td>Na vdolbinico</td><td>0,045 ml</td><td>1,8 µl</td></tr></table>	Število testnih lističev	Volumen redčila sonde*	Volumen sonde*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Na vdolbinico	0,045 ml	1,8 µl
Število testnih lističev	Volumen redčila sonde*	Volumen sonde*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
Na vdolbinico	0,045 ml	1,8 µl											
	*Te vrednosti vključujejo priporočen dodatni volumen. ● Odpipetirajte sondo za HPV z nizkim tveganjem v redčilo sonde, tako da konico pipete položite na notranjo steno epruvete tik nad meniskusom in iztisnete vsebino. Konice ne potapljajte v redčilo sonde. ● Vsaj 5 sekund mešajte pri najvišji hitrosti, da se dobro premeša. Nastati mora viden vrtinec. Označite kot mešanico sonde za HPV z nizkim tveganjem in jo hranite v čisti, zaprti posodi, dokler ni pripravljena za uporabo. Neuporabljeno mešanico sonde je treba zavreči.												
Mešanica sond za HPV z visokim tveganjem	Pripravite kot zgornjo mešanico sonde za HPV z nizkim tveganjem. Označite kot »Mešanica sond za HPV z visokim tveganjem«. Neuporabljeno mešanico sonde je treba zavreči.												

Reagent	Metoda priprave												
Koktajl kombinirane sonde	Pripravite mešanice sonde za HPV z nizkim tveganjem in sonde za HPV z visokim tveganjem, kot je opisano zgoraj. Dodajte celotno vsebino razredčene mešanice sonde za HPV z nizkim tveganjem v epruveto z mešanico sonde za HPV z visokim tveganjem. Temeljito premešajte z vrtinčenjem vsaj 5 sekund pri največji hitrosti. Nastati mora viden vrtinec. Označite kot »Koktajl kombinirane sonde«. Neuporabljeno mešanico sonde je treba zavreči.												
Pufer za spiranje	Priprava med korakom zajema: Za Hybrid Capture System Automated Plate Washer lahko pufer za spiranje pripravite, kot je opisano spodaj, in ga shranite v pokriti posodi ali pa ga pripravite po 1 l naenkrat in ga postavite v rezervoarje za pranje avtomatiziranega pralnika plošč. Za volumne mešanja glejte spodnjo preglednico: Za navodila glede nege in vzdrževanja glejte <i>uporabniški priročnik avtomatiziranega pralnika plošč</i>. Opozorilo: Koncentrat pufra za spiranje je strupen pri zaužitju. Nositi primerna zaščitna oblačila, zaščitne rokavice in zaščito za oči/obraz. Za zmanjšanje izpostavljenosti koncentratu pufra za spiranje med pripravo dodajte vodo. <table><tr><th>Količina koncentrata pufra za spiranje</th><th>Količina destilirane ali deionizirane vode</th><th>Končni volumen pufra za spiranje</th></tr><tr><td>33,3 ml</td><td>966,7 ml</td><td>1 l</td></tr><tr><td>66,6 ml</td><td>1933,4 ml</td><td>2 l</td></tr><tr><td>100 ml</td><td>2900 ml</td><td>3 l</td></tr></table> Opomba: Zelo pomembno je, da je avtomatiziran pralnik plošč ves čas vključen. To omogoča vzdrževalno spiranje po osmih urah neuporabe. Pred vsako analizo se prepričajte, da je rezervoar za odpadke avtomatiziranega pralnika plošč prazen in da je rezervoar za spiranje napolnjen z destilirano ali deionizirano vodo. Za ročno metodo pranja plošč: ● Koncentrat pufra za spiranje dobro premešajte. ● Razredčite 100 ml koncentrata pufra za spiranje z 2,9 l destilirane ali deionizirane vode v aparatu za pranje in dobro premešajte (končni volumen mora biti 3 l). ● Zaprite posodo, da preprečite kontaminacijo ali izhlapevanje. Ko je pufer za spiranje pripravljen, je stabilen tri mesece pri temperaturi 2–30 °C. Označite ga z novim rokom uporabnosti. Če je bil pufer za spiranje ohlajen, ga pred uporabo uravnajte na temperaturo 20–25 °C. Priporočljivo je, da se pralni aparat in cevje očistijo z 0,5-% raztopino natrijevega hipoklorita in temeljito sperejo z destilirano ali deionizirano vodo enkrat na tri mesece, da se prepreči morebitna kontaminacija z alkalno fosfatazo, ki je prisotna v bakterijah in plesni.	Količina koncentrata pufra za spiranje	Količina destilirane ali deionizirane vode	Končni volumen pufra za spiranje	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1933,4 ml	2 l	100 ml	2900 ml	3 l
Količina koncentrata pufra za spiranje	Količina destilirane ali deionizirane vode	Končni volumen pufra za spiranje											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1933,4 ml	2 l											
100 ml	2900 ml	3 l											

Volumni za reagente, ki so pripravljene za uporabo

Zaznavanje in
reagent 1 ter
zaznavanje in
reagent 2

Neposredno pred uporabo:

Temeljito premešajte reagent, nato previdno izmerite ustrezen volumen reagenta za zaznavanje 1 ali reagenta za zaznavanje 2 v čisti rezervoar za reagent po spodaj prikazanih smernicah. Da bi se izognili kontaminaciji, teh reagentov NE SMETE vrniti v originalne stekleničke: Neuporabljen material po uporabi zavrzite. Če ne uporabljate 8-kanalnega pipetorja, ga lahko nadomestite z ustreznim ponavljajočim se pipetorjem. V tem primeru je treba alikvote reagenta preliti v polipropilensko epruveto, ki je dovolj velika, da vsebuje zahtevan volumen, kot je navedeno spodaj.

št. testov/trakov	Volumen reagenta za zaznavanje 1 ali 2
96/12	Vsebina stekleničke
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 test	0,125 ml

Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi

Vzorci materničnega vratu, zbrani in prepeljani *digene* HC2 DNA Collection Device (sestavljena iz cervikalne ščetke in *digene* Specimen Transport Medium) ali vzorci, zbrani z napravo za odvzem v obliki metle ali kombinacijo ščetke/lopatice in dani v raztopino PreservCyt Solution, ali vzorci materničnega vratu, zbrani v Sure Path Preservative Fluid, so edini vzorci, priporočeni za uporabo s testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Vzorci, vzeti z drugimi napravami za vzorčenje ali prepeljani v drugih transportnih medijih, niso bili kvalificirani za uporabo s to analizo. Značilnosti učinkovitosti tega kompleta so bile ugotovljene samo z navedenimi kompleti za odvzem. Vzorce materničnega vratu je treba odvzeti pred nanosom očetne kisline ali joda, če se izvaja kolposkopski pregled. Za dodatne postopke odvzema in ravnanja z vzorci si oglejte navodila za uporabo *digene* HC2 DNA Collection Device.

Vzorci materničnega vratu v STM

Vzorci STM se lahko hranijo do dva tedna pri sobni temperaturi in se brez hlajenja pošljejo v preskusni laboratorij. Vzorce je treba poslati v izolirani embalaži s pomočjo dobavitelja za dostavo čez noč ali v roku 2 dni. V laboratoriju za testiranje morajo biti vzorci shranjeni pri temperaturi 2–8 °C, če naj bo analiza opravljena v enem tednu. Če boste analizo opravili pozneje kot v roku enega tedna, shranite vzorce pri temperaturi –20 °C do 3 mesece (glejte *opombe* pod *Biopsije materničnega vratu* pred zamrzovanjem). STM je bil dodan konzervans, ki zavira rast bakterij in ohranja celovitost DNK. Ni namenjen ohranjanju sposobnosti preživetja organizmov ali celic. Pripomočka *digene* HC2 DNA Collection Device ne smete uporabljati za odvzem vzorcev pri nosečnicah.

Biopsije materničnega vratu

Sveže odvzete biopsije materničnega vratu do 5 mm v preseku lahko analizirate tudi s testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Biopsijski vzorec je treba takoj dati v 1,0 ml STM in shraniti zamrznjenega pri –20 °C. Biopsijske vzorce lahko pošljete pri temperaturi 2–30 °C z dostavo čez noč v laboratorij za testiranje in jih do obdelave shranite pri –20 °C. Biopsije s premerom manj kot 2 mm se ne smejo uporabljati.

Opombe: Da preprečite, da bi pokrovčki skočili iz epruvet z vzorci, ki so poslani ali shranjene zamrznjene:

- Pred pošiljanjem predhodno zamrznjenih epruvet z vzorci pokrijte pokrovčke s parafilmom. Vzorci se lahko pošiljajo zamrznjeni ali pri temperaturi 20–25 °C.
- Ko jemljete vzorce iz zamrzovalnika za testiranje, pokrovčke takoj zamenjajte z navojnimi pokrovčki za epruvete za odvzem vzorcev.

Vzorci materničnega vratu v raztopini PreservCyt Solution

Vzorci, zbrani z napravo za zbiranje v obliki metle ali kombinacijo čopiča/lopatice in dani v raztopino PreservCyt Solution za uporabo pri izdelavi preparatov ThinPrep® Pap Test, je mogoče uporabiti v testu *digene* HC2 HPV DNA Test. Vzorce je treba odvzeti na rutinski način, pripravate ThinPrep Pap Test pa pripraviti v skladu z navodili družbe Hologic.

Opomba: za test *digene* HC2 HPV DNA Test mora biti na voljo vsaj 4 ml raztopine PreservCyt Solution. Vzorci z manj kot 4 ml po pripravi testa Pap lahko vsebujejo premalo materiala in so lahko lažno negativni pri testu *digene* HC2 HPV DNA Test.

Vzorci v raztopini PreservCyt Solution lahko hranite do tri mesece pri temperaturah med 2 °C in 30 °C, po odvzemu in pred obdelavo za test *digene* HC2 HPV DNA Test. Vzorcev v raztopini PreservCyt Solution ni mogoče zamrzniti. Za obdelavo teh vzorcev glejte *Postopek priprave vzorcev PreservCyt*.

Vzorci materničnega vratu v tekočini SurePath Preservative Fluid

(SAMO za testiranje DNK HPV z visokim tveganjem)

Ročna priprava vzorcev SurePath se izvede z uporabo postgradientnega celičnega peleta, ki izhaja iz priprave preparatov SurePath Pap Test. Pripravite preparate SurePath Pap Test v skladu z veljavnimi navodili za BD PrepStain® Slide Processor.

Pomembno: Takoj po pripravi preparata Pap SurePath je treba 2,0 ml tekočine SurePath Preservative Fluid pipetirati v centrifugirno epruveto, ki vsebuje ostanke celičnega peleta. S tem se ohrani celovitost celičnega peleta po gradientu za izvedbo testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

Celični pelet po gradientu s tekočino SurePath Preservative Fluid lahko pred pripravo vzorca za test *digene* HC2 HPV DNA Test shranjujete do 4 tedne pri 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.

Protokol

Vzorci lahko vsebujejo povzročitelje okužb, zato je treba z njimi ustrezno ravnati. Test *digene* HC2 HPV DNA Test lahko izvedete ročno, kot je opisano v teh navodilih za uporabo, ali z uporabo instrumenta Rapid Capture System za testiranje prepustnosti vzorca velikega volumna.

Preskušanje prepustnosti vzorca velikega volumna z uporabo sistema Rapid Capture System

Rapid Capture System je avtomatiziran sistem za pipetiranje in razredčino za splošno uporabo, ki ga je mogoče uporabiti s testom *digene* HC2 HPV DNA Test za testiranje prepustnosti vzorcev velikega volumna. Ta sistem obdela do 352 vzorcev v osmih urah, vključno s 3,5-urnim obdobjem, v katerem posredovanje uporabnika ni potrebno; v 13 urah je mogoče ustvariti do 704 rezultate vzorcev. Denaturacija vzorcev v pripravi za testiranje se izvaja neodvisno od RCS, preden se vzorci postavijo na platformo RCS. Poleg tega se zaznavanje kemiluminiscenčnega signala in poročanje o rezultatih izvedeta z uporabo instrumenta DML brez povezave, ki je skupen ročni metodi in metodi RCS. Koraki postopka testa *digene* HC2 HPV DNA Test se izvajajo v natančnem zaporedju kot postopek ročnega testiranja. Aplikacija RCS omogoča razporejeno obdelavo do 4 mikroplošč, pri čemer vsaka plošča vsebuje vzorce ter zahtevane kalibratorje in kontrole kakovosti analize.

Ko uporabljate sistem Rapid Capture System, glejte *uporabniški priročnik sistema Rapid Capture System*, ki je priložen instrumentu, poleg teh navodil za uporabo, za potrebne postopkovne in opisne informacije.

Ročna metoda

Namestitev

1. Če uporabljate Microplate Heater I, ga pustite vsaj 60 minut, da se po hladnem zagonu uravnoteži na 65 ± 2 °C. Za podrobnosti glejte *uporabniški priročnik za Microplate Heater I*.
2. Prepričajte se, da je temperatura vodne kopeli 65 °C in da je dovolj vode, da pokrije celoten volumen v epruvetah z vzorci.
3. Odstranite vzorce in vse zahtevane reagente iz hladilnika pred začetkom analize. Pustite jih 15 do 30 minut, da dosežejo temperaturo 20–25 °C.
Opomba: Pripravite vzorce PreservCyt Solution in SurePath, preden uravnotežite vse predhodno denaturirane vzorce in reagent kompleta na sobno temperaturo.
4. Uporabite programsko opremo *digene* za analizo, da ustvarite postavitev plošče analize. Za navodila o ustvarjanju postavitve plošče glejte ustrezni uporabniški priročnik.
5. Kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce, ki jih želite testirati, postavite v stojalo za epruvete v enakem vrstnem redu, kot jih boste testirali. NAJPREJ je treba testirati negativni kalibrator, kalibrator za HPV z nizkim tveganjem in kalibrator za HPV z visokim tveganjem. Negativni kalibrator (NC), kalibrator za HPV z nizkim tveganjem (LRC) ali kalibrator za HPV z visokim tveganjem (HRC), kontrolo kakovosti z nizkim tveganjem (QC1-LR), kontrolo kakovosti z visokim tveganjem (QC2-HR) in vzorce je treba izvajati v konfiguraciji stolpca z vdolbinicami z 8 mikroploščami. Oglejte si spodnji primer postavitve.

Primer postavitve postopka s 24 vdolbinicami mikroplošče			
Vrsta	Stolpec		
	1	2	3
A	NC	Spec. 1	Spec. 9
B	NC	Spec. 2	Spec. 10
C	NC	Spec. 3	Spec. 11
D	LRC ali HRC	Spec. 4	Spec. 12
E	LRC ali HRC	Spec. 5	Spec. 13
F	LRC ali HRC	Spec. 6	Spec. 14
G	QC1-LR	Spec. 7	Spec. 15
H	QC1-LR	Spec. 8	Spec. 16

6. Če uporabljate metodo Koktajl kombinirane sonde (CPC), se NC, LRC in HRC testirajo v treh izvodih s koktajlom kombinirane sonde na isti mikroplošči. Uporabite vdolbinice A1, B1 in C1 za NC ter vdolbinice D1, E1, F1, G1, H1 in A2 za LRC oziroma HRC. Uporabite vdolbinice B2 in C2 za kontrole kakovosti QC1-LR oziroma QC2-HR ter vzorce, ki se začnejo v D2. Postopek CPC ni bil preverjen za uporabo s sistemom Rapid Capture System.
7. Za metodo dvojne sonde izvedite teste mešanice sonde za HPV z nizkim tveganjem na levi strani mikroplošče in teste mešanice sonde za HPV z visokim tveganjem na desni strani mikroplošče.

NAJPREJ testirajte negativni kalibrator (NC) in kalibrator z nizkim tveganjem (LRC) v treh izvodih z mešanico sonde za HPV z nizkim tveganjem. Nato testirajte kontrole kakovosti (QC1-LR in QC2-HR) in vzorce posamezno, tudi z mešanico sonde za HPV z nizkim tveganjem. NC ponovitve postavite v A1, B1, C1; LRC se podvaja v D1, E1, F1; QC1-LR v G1; QC2-HR v H1; in vzorci, ki se začnejo v A2.

NATO testirajte NC in kalibrator visokega tveganja (HRC) v treh izvodih z mešanico sonde za HPV z visokim tveganjem. Nato testirajte vzorca QC1-LR in QC2-HR posamično, tudi z mešanico sonde za HPV z visokim tveganjem. Postavite NC dvojnike v A7, B7, C7; HRC se ponovi v D7, E7, F7; QC1-LR v G7; QC2-HR v H7; in vzorci, ki se začnejo v A8. Oglejte si zgornji primer postavitve.

Za pravilno nastavitve kalibratorja/kontrole kakovosti/vzorca v programski opremi glejte ustrezni uporabniški priročnik.

-
8. Alternativno lahko uporabite dve ločeni mikroplošči za kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce, testirane s sondo za HPV z nizkim in visokim tveganjem. NC in LRC se testirata v treh izvodih, QC1-LR in QC2-HR pa se testirata posamično z mešanico sond za HPV z nizkim tveganjem v eni mikroplošči, NC in HRC pa se testirata v treh izvodih, QC1-LR in QC2-HR pa se testirata posamično z mešanico sond za HPV z visokim tveganjem v drugi mikroplošči. Uporabite vdolbinice A1, B1 in C1 za NC ter vdolbinice D1, E1 in F1 za LRC oziroma HRC. Uporabite vdolbinice G1 in H1 za kontrole kakovosti QC1-LR oziroma QC2-HR.
 9. Vzorce je mogoče testirati posamezno s koktajlom kombinirane sonde, če uporabljate metodo CPC, ali posamezno z mešanico sonde za HPV z nizkim tveganjem in posamezno z mešanico sonde za HPV z visokim tveganjem, če uporabljate metodo dvojne sonde.

Denaturacija

Opombe:

- Opozorilo: Denaturacijski reagent je jedek. Pri ravnanju z njim bodite previdni in nosite rokavice brez pudra.
- Pomembno: Nekateri vzorci materničnega vratu lahko vsebujejo kri ali drug biološki material, ki lahko prikrije spremembe barve po dodatku denaturacijskega reagenta. Vzorci, ki so temno obarvani pred dodatkom denaturacijskega reagenta, v tem koraku morda ne bodo ustrezno spremenili barve. V teh primerih nezmožnost prikazovanja ustrezne spremembe barve ne bo vplivala na rezultate analize. Pravilno mešanje je mogoče preveriti z opazovanjem spremembe barve kalibratorjev in kontrol kakovosti.
- Med korakoma denaturacije in hibridizacije se prepričajte, da je nivo vode v vodni kopeli ustrezen za potopitev celotnega volumna vzorca v epruveto.
- Kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce je mogoče pripraviti s korakom denaturacije in shraniti 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. Pred uporabo dobro premešajte.
- Po denaturaciji in inkubaciji se vzorci ne štejejo več za kužne.²⁶ Vendar mora laboratorijsko osebje še vedno upoštevati nacionalne/lokalne prevodnostne ukrepe.
- Ne odstranjujte pripomočka za odvzem vzorcev pred denaturacijo.
- Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, je ključnega pomena, da ves material vzorca kalibratorja, kontrole kakovosti in STM pride v stik z denaturacijskim reagentom. Mešanje po dodatku denaturacijskega reagenta je kritičen korak: Prepričajte se, da je Multi-Specimen Tube Vortexer 2 nastavljen na 100 (največja hitrost) in da je med mešanjem opazen viden vrtinec tekočine, tako da tekočina spere celotno notranjo površino epruvete. Če izvajate ročno vrtnčenje, se prepričajte, da so vsak kalibrator, kontrola kakovosti in vzorec posebej premešani tako, da vsakega najmanj 5 sekund mešate pri polni hitrosti, tako da tekoči vrtinec izpere celotno notranjo površino epruvete, nato pa epruveto enkrat obrnite.

Kalibratorji, kontrole kakovosti in postopek priprave vzorcev STM

1. Odstranite in zavržite pokrovčke s kalibratorjev, kontrol kakovosti in epruvet z vzorci STM.

Opomba: Pokrovčki, odstranjeni iz epruvet z vzorci, veljajo za potencialno kužne. Odstranite jih v skladu z nacionalnimi/lokalnimi predpisi.

2. Odpipetirajte denaturacijski reagent z indikatorskim barvilom v vsak vzorec kalibratorja, kontrole kakovosti ali STM s ponavljajočim se ali nastavljivim pipetorjem. Pazite, da se ne dotikate stranic epruvete, sicer lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev. Potreben volumen denaturacijskega reagenta je enak polovici volumna vzorca. Točen volumen za vsako vrsto kalibratorja, kontrole kakovosti in vzorca je navedena v spodnji preglednici.

Razredčite preostali denaturacijski reagent v steklenički preden ga zavržete v skladu z nacionalnimi/lokalnimi laboratorijskimi postopki.

Kalibrator, kontrola kakovosti ali vzorec	Potrebni volumni denaturacijskega reagenta
Negativen kalibrator	1000 µl
Kalibrator za HPV z nizkim ali visokim tveganjem	500 µl
Kontrole kakovosti z nizkim ali visokim tveganjem	500 µl
Vzorec materničnega vratu	500 µl

Vzorke zmešajte na enega od spodnjih dveh načinov.

Metoda z Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Opomba: vzorce *digene* HC2 DNA Collection Device, zmešane z MST Vortexer 2, **je treba** hibridizirati z metodo Hybridization Microplate in Microplate Heater I.

- 2a. Pokrijte epruvete z vzorci kalibratorja, kontrol kakovosti in STM s folijo DuraSeal Tube Sealer Film tako, da povlečete folijo čez epruvete v stojalu.
- 2b. Pokrov stojala postavite na epruvete, prekrte s folijo, in jo pritrdite z dvema stranskima sponkama. Folijo odrežite z napravo za rezanje.
- 2c. Stojalo postavite na Multi-Specimen Tube Vortexer 2 in pritrdite stojalo s sponko. Prepričajte se, da je nastavitev hitrosti 100 (največja hitrost) in obrnite stikalo za vklop vrtničnega mešalnika v položaj ON (VKLOP). Epruvete vrtinčite 10 sekund.

Metoda ročnega vrtničenja posamezne epruvete

- 2a. Ponovno zaprite epruvete z vzorci kalibratorja, kontrol kakovosti in STM s čistimi navojnimi pokrovčki epruvet za odvzem vzorcev.
- 2b. Vsako epruveto posebej temeljito mešajte 5 sekund z vrtničenjem pri visoki hitrosti.
- 2c. Vsako epruveto z vzorcem enkrat obrnite, da operete notranjost epruvete, pokrovček in rob.
- 2d. Epruveto vrnite v stojalo.

Neodvisno od uporabljene metode vrtničenja, mora biti med mešanjem v vsaki epruveti viden vrtinec tekočine, tako da tekočina spere celotno notranjo površino epruvete. Kalibratorji, kontrole kakovosti in vzorci bi morali postati vijolični.

- 3. Epruvete inkubirajte v stojalu v vodni kopeli pri 65 ± 2 °C 45 ± 5 minut (denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce lahko testirate takoj ali shranite, kot je opisano v zgornjih opombah). Med to inkubacijo pripravite mešanico(-e) sonde za HPV. Glejte razdelek Priprava in shranjevanje reagenta.

Postopek za pripravo vzorca z raztopino PreservCyt Solution

Opombe:

- Za vse podrobnosti si oglejte navodila za uporabo kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit.
- Pri obdelavi 4-ml alikvota raztopine PreservCyt Solution nastane dovolj materiala za dva ročna testa. Najmanjši volumen za obdelavo je 4 ml.
- Vzorce raztopine PreservCyt Solution pripravite v serijah po 36 ali manj; sicer se lahko peleti pri pretakanju supernatanta izločijo. To je pomembno za ohranjanje integritete celičnih peletov med korakom pretakanja. Če pripravljate dodatne viale z raztopino PreservCyt Solution, jih začnite pripravljati šele po zaključku priprave prve serije.

Priprava reagenta

Uporabite denaturacijski reagent (DNR), ki je priložen testu *digene* HC2 HPV DNA Test (glejte Priprava in shranjevanje reagenta), ali DNR, ki je priložen kompletu *digene* HC2 Sample Conversion Kit. Za pripravo DNR, ki je priložen kompletu *digene* HC2 Sample Conversion Kit, dodajte 3 kapljice indikatorskega barvila v stekleničko DNR in dobro premešajte. Raztopina mora imeti enakomerno temno vijolično barvo. Za določanje potrebnega volumna glejte Preglednica 1.

Število testov	Volumen raztopine PreservCyt Solution	Volumen pufra Conversion Buffer
1–2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Epruveto *digene* HC2 Sample Conversion Tube, 10-ml konično epruveto znamke Sarstedt ali 15-ml konično epruveto znamke VWR oziroma Corning označite z ustrezno identifikacijsko številko vzorca.
2. Ravnanje z enim vzorcem naenkrat:
 - 2a. Ročno močno pretresite vialo PreservCyt, dokler se ne zdi, da so celice homogeno razpršene.
 - 2b. Ker se celice zelo hitro usedajo, takoj pipetirajte ustrezen volumen vzorca PreservCyt v označeno epruveto. Raztopino PreservCyt Solution dovajajte na dno konične epruvete, da se celični material v čim manjši meri prilepi na notranjost epruvete.
3. V vsako epruveto dodajte ustrezen volumen pufra Sample Conversion Buffer (glejte Preglednica 1).
4. Na epruvete namestite pokrovčke in v vrtničnem mešalniku z nastavkom za skodelice temeljito premešajte vsako epruveto.

Opomba: postopek MST Vortexer 2 ni bil potrjen za vrtničenje vzorcev PreservCyt Solution s pufrom Sample Conversion Buffer pred centrifugiranjem, zato ga ne smete uporabiti za ta korak.
5. Epruvete centrifugirajte 15 ± 2 minuti v rotorju z nihajnimi posodami pri $2.900 \pm 150 \times g$.
6. Med centrifugiranjem pripravite mešanico Specimen Transport Medium/Denaturation Reagent (STM/DNR) v razmerju 2:1, kakor je navedeno v Preglednica 2.

Opomba: Mešanico STM/DNR je treba pripraviti svežo vsak dan izvajanja testa.
- 6a. Za določitev skupnega potrebnega volumna mešanice STM/DNR kot vodilo uporabite začetni volumen vzorca raztopine PreservCyt Solution in nato pomnožite volumen STM in DNR »na epruveto« s številom vzorcem, ki jih želite obdelati (glejte Preglednica 2).

Preglednica 2. Zahteve glede volumna: STM/DNR

Št. testov	Volumen raztopine PreservCyt Solution	Volumen STM na epruveto za končno mešanico STM/DNR*	Volumen DNR na epruveto za končno mešanico STM/DNR*	Volumen mešanice STM/DNR je dodan v epruveto
1–2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

6b. Raztopino temeljito premešajte z vrtnčenjem.

7. Odstranite epruvete iz centrifuge eno za drugo in jih postavite v stojalo ali konverzijsko stojalo. Na dnu vsake epruvete mora biti rožnata/oranžna peleta.

Opomba: Vzorci, ki po centrifugiranju nimajo vidne pelete, niso sprejemljivi za testiranje in jih je treba zavreči.

8. Ravnanje z vsako epruveto posebej:

8a. Odstranite pokrovček in ga postavite na čisto papirnato brisačo, ki ne pušča vlaken.

8b. Previdno odlijte supernatant.

8c. Ohranite obrnjeni položaj epruvete in nežno popivajte (približno 6-krat) z vpojnimi papirnatimi brisačami, ki ne puščajo vlaken, dokler tekočina ne kaplja iz epruvete. Vsakič uporabite čisto površino brisače. Ne dovolite, da bi celična paleta zdrsnila po epruveti med pivnanjem.

Opombe:

- Istega dela vpojne papirnate brisače, ki ne pušča vlaken, ne uporabite več kot enkrat.
- Pomembno je, da na tak način odstranite največjo količino raztopine PreservCyt Solution. Vendar pa je normalno, da po pivnanju vidite ostanke raztopine PreservCyt Solution.

8d. Epruveto postavite v stojalo ali konverzijsko stojalo.

Vrtinčenje in denaturacija

Postopek ročnega vrtinčenja

1. Vsaki peleti dodajte ustrezen volumen STM/DNR (glejte Preglednica 2). Ponovno zaprite vsako epruveto in resuspendirajte pelete tako, da vsako epruveto posamezno vsaj 30 sekund vrtinčite pri najvišji nastavitvi hitrosti. Če je pelet težko resuspendirati, vrtinčite dodatnih 10–30 sekund ali dokler pelet ne odplava z dna epruvete. Če pelet ostane neraztopljen po dodatnem vrtinčenju (skupaj največ 2 minuti), zabeležite identifikacijo vzorca in nadaljujte z naslednjim korakom.
2. Epruvete postavite v stojalo.
3. Stojalo za 15 ± 2 minuti postavite v vodno kopel pri 65 ± 2 °C. Prepričajte se, da je nivo vode zadosten, da pokrije vso tekočino v epruveti.
4. Odstranite stojalo z vzorci iz vodne kopeli in vzorce vrtinčite posamično 15–30 sekund.
Opomba: prepričajte se, da so vsi peleti na tej točki popolnoma resuspendirani. Vzorci, ki imajo še vidne pelete, niso sprejemljivi za testiranje in jih je treba zavreči.
5. Vrnite stojalo v vodno kopel s 65 ± 2 °C in nadaljujte z denaturacijo še 30 ± 3 minute.

Nadaljujte s korakom hibridizacije ali glejte izbirno točko zaustavitve za shranjevanje in obdelavo denaturiranih vzorcev.

Postopek Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Opombe:

- Postopek Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 je validiran za obdelavo vzorcev PreservCyt Solution po centrifugiranju in dekantiranju supernatanta.
 - Samo Only the MST Vortexer 2 je zasnovan za obdelavo vzorcev PreservCyt Solution.
 - Konverzijsko stojalo in pokrov sta zasnovana posebej za namestitve epruvet *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml konične epruvete znamke VWR ali Corning). Uporabnik mora hkrati uporabljati samo eno vrsto epruvete na konverzijskem stojalu. Druge znamke niso potrjene za uporabo.
 - Potrebno je strogo upoštevanje določenih časov vrtnčenja za konverzijsko stojalo in pokrov.
 - Konverzijskega stojala in pokrova ni mogoče uporabiti za vrtnčenje kalibratorjev ali kontrol kakovosti *digene* HC2 DNA Test Kit. Višina epruvet STM preprečuje ustrezno vrtnčenje z uporabo konverzijskega stojala in pokrova.
-
1. Po pivnanju vsake označene 15-ml konične epruvete postavite vsako na ustrezen položaj v konverzijsko stojalo.
 2. Vsakemu peletu dodajte ustrezen volumen mešanice STM/DNR (Preglednica 2).
 3. Pokrijte 15-ml stožčaste epruvete s tesnilno folijo za epruvete DuraSeal, tako da povlečete folijo čez epruvete v stojalu.
 4. Pokrov stojala postavite na epruvete, prekrite s folijo, in pokrov pritrdite na svoje mesto z obema stranskima sponkami. Ko je pokrov varno pritrjen, odrežite folijo z napravo za rezanje.
 5. Premaknite ročico z rdečim ročajem navzgor, tako da je v vodoravnem položaju.
 6. Namestite konverzijsko stojalo in pokrov na MST Vortexer 2 tako, da bo največji zarezan vogal konverzijskega stojala v desnem sprednjem kotu. Postavite stojalo in pokrov na ploščad MST Vortexer 2 tako, da se varno prilega vodilom. Zavarujte stojalo na mestu tako, da ročico z rdečim ročajem premaknete navzdol v navpični položaj. To bo zaklenilo stojalo na mestu.
 7. Prepričajte se, da je nastavek hitrosti 100 (največja hitrost) in da je preklopno stikalo Pulser v položaju OFF (IZKLOP).
 8. Obrnite stikalo za vklop vrtnčnega mešalnika v položaj ON (VKLOP). Epruvete vrtnčite 30 sekund.
 9. Obrnite stikalo za vklop vrtnčnega mešalnika v položaj OFF (IZKLOP).

10. Odstranite konverzijsko stojalo in pokrov z MST Vortexer 2 tako, da dvignete ročico z rdečim ročajem.
11. Stojalo za 15 ± 2 minuti postavite v vodno kopel pri 65 ± 2 °C. Prepričajte se, da nivo vode popolnoma pokriva vso tekočino v vseh epruvetah.
12. Po 15-minutni inkubaciji odstranite stojalo z vzorci iz vodne kopeli.
13. Da preprečite škropljenje, s stojala posušite odvečno vodo, preden ga postavite na MST Vortexer 2.
14. Pritrdite konverzijsko stojalo in pokrov na MST Vortexer 2, kot je opisano v 6. koraku.
15. Prepričajte se, da je nastavitev hitrosti 100 in obrnite stikalo za vklop vrtničnega mešalnika v položaj ON (VKLOP). Epruvete vrtničite 1 minuto.
16. Obrnite stikalo za vklop vrtničnega mešalnika v položaj OFF (IZKLOP).
Opomba: Postopek MST Vortexer 2 standardizira hitrost mešanja, čase in postopek ter odpravlja potrebo po vizualnem preverjanju celičnih peletov, kot je to potrebno pri uporabi postopka ročnega vrtničenja.
17. Vrnite stojalo v vodno kopel s 65 ± 2 °C in nadaljujte z denaturacijo 30 ± 3 minute.
18. Odstranite stojalo iz vodne kopeli, posušite stojalo in ga pritrdite na vrtnični mešalnik.
19. Obrnite stikalo za vklop vrtničnega mešalnika v položaj ON (VKLOP). Vrtničite 10 sekund pri največji nastavitvi.
20. Obrnite stikalo za vklop vrtničnega mešalnika v položaj OFF (IZKLOP). Možnost »Remove« (Odstrani) odstrani poudarjen kanal.
21. Z vzorcev takoj odstranite pokrov stojala in tesnilno folijo za epruvete DuraSeal.
22. Nadaljujte s korakom hibridizacije ali glejte izbirno točko zaustavitve za shranjevanje in obdelavo denaturiranih vzorcev.

Postopek priprave vzorca SurePath (SAMO za testiranje DNK HPV z visokim tveganjem)

Po citološki obdelavi sledite naslednjemu postopku:

1. Prepričajte se, da je opazovani volumen tekočine enak 2,8 ml.
POZOR: Če se zdi, da ostanek celičnega peleta vsebuje manj kot 1 ml tekočine, je možno, da tekočina SurePath Preservative Fluid ni bila dodana po citologiji in vzorec NI primeren za testiranje DNK HPV z visokim tveganjem.
2. Prepričajte se, da so vzorci uravnoteženi na sobno temperaturo.
3. Vzorec centrifugirajte v vrtiljivem rotorju pri $800 \pm 15 \times g$ 10 ± 1 minuto.
4. Odstranite epruvete iz centrifuge.
5. Previdno odlijte supernatant takoj po centrifugiranju in nežno popivnjajte vsako epruveto (~3-krat) z vpojnimi papirnatimi brisačami, da odstranite odvečno tekočino. Opazujte pelete v vsaki epruveti. Ne dovolite, da bi celični paleti zdrsnili po epruveti med pivnanjem.
6. Epruvete postavite v stojalo.
7. Vsakemu peletu dodajte 200 μ l STM s ponavljajočim se ali nastavljivim pipetorjem.
Opomba: Epruvete se lahko mešajo brez zamašitve.
8. Vsak pelet ponovno suspendirajte tako, da vsako epruveto posebej 15 sekund vrtnčite pri visoki hitrosti. Če je pelet težko ponovno suspendirati, vrtnčite dodatnih 5 do 30 sekund ali dokler pelet ne odplava z dna epruvete in se zdi, da se raztopi.
9. Odpipetirajte 100 μ l pripravljenega denaturacijskega reagenta (z indikatorskim barvilom) v vsak vzorec s ponavljajočim ali nastavljivim pipetorjem.
POZOR: Pazite, da se ne dotikate stranic epruvete, sicer lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev.
Če odvržete preostali denaturacijski reagent, upoštevajte veljavne lokalne, državne in zvezne predpise za odlaganje jedkih snovi.
10. Vsako epruveto posebej temeljito premešajte z vrtnčenjem pri visoki hitrosti 5 sekund.
Opomba: Epruvete lahko mešate brez zamašitve.
Označite 15-ml konično epruveto z ustrezno identifikacijo in vrsto vzorca (primer »SP« za vrsto vzorca SurePath) in jo postavite v stojalo.
Opomba: Če uporabljate sistem Rapid Capture System za polavtomatizirano obdelavo analize, morate uporabiti 15-ml stožčaste epruvete znamke VWR ali Corning za pravilno namestitve v stojalo *digene* Conversion Rack (srebrno stojalo).

11. Prenesite celoten volumen epruvete v 15-ml stožčasto epruveto z navojnim pokrovčkom z uporabo 7-ml pipete za enkratno uporabo s standardno konico ali enakovredne*.
12. Zamašite 15-ml konične epruvete.
13. Inkubirajte v vodni kopeli pri 65 ± 2 °C 90 ± 5 minut.
POZOR: Ta čas inkubacije je daljši od zahtevanega za druge odobrene vrste vzorcev.
14. Če bo testiranje HPV končano na isti dan, denaturirajte kalibratorje *digene* HC2 DNA Test v skladu s temi navodili za uporabo.
15. Odstranite stojalo za vzorce iz vodne kopeli.

Izbirna točka zaustavitve

Po denaturaciji lahko vzorce STM in konvertirane vzorce PreservCyt in SurePath shranite pri temperaturi 2–8 °C čez noč ali pri temperaturi –20 °C do 3 mesece. Za hlajenje čez noč lahko vzorce pustite v konverzijskem stojalu z zamenjano folijo DuraSeal in pokrovom stojala. Pred shranjevanjem pri temperaturi –20 °C je treba odstraniti pokrov stojala in folijo DuraSeal ter na epruvete namestiti pokrovčke. V obeh primerih je treba vzorce uravnotežiti pri sobni temperaturi (20–25 °C) in temeljito vrtinčiti, preden nadaljujete s korakom hibridizacije.

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

Izvedete lahko največ 3 cikle zamrzovanja/odmrzovanja z največ 2 urama pri sobni temperaturi med vsakim ciklom odmrzovanja.

* S testi preverjanja QIAGEN so bile uporabljene 15-ml stožčaste epruvete znamke VWR

Hibridizacija: Metode koktajla kombinirane sonde (CPC) in dvojne sonde

Opombe:

- Mešanice sond za HPV so viskozne. Prepričajte se, da je mešanica sonde temeljito premešana in da je zahtevana količina popolnoma odmerjena v vsako vdolbinico mikroplošče. Glejte razdelek Priprava in shranjevanje reagenta.
- Če je bil denaturiran vzorec shranjen pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pustite, da se vzorec odtaja na temperaturi $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, in ga temeljito zvrtničite, preden nadaljujete s hibridizacijo.
- Pred uporabo vsaj 60 minut segrevajte Microplate Heater I na $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za nadaljnja potrebna navodila glejte *Uporabniški priročnik za Microplate Heater I*.

Hibridizacijska metoda z uporabo hibridizacijske plošče in Microplate Heater I

Opomba: Vzorce, zbrane z *digene* HC2 DNA Collection Device v STM in obdelane z metodo MST Vortexer 2, je mogoče hibridizirati samo z uporabo metode Microplate Heater I.

1. Pridobite in označite mikroploščo Hybridization Microplate.
2. Po inkubaciji odstranite kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce iz vodne kopeli. Če uporabljate Multi-Specimen Tube Vortexer 2, vrtinčite celotno stojalo vzorcev STM najmanj 5 sekund pri najvišji nastavitvi hitrosti. Pri vzorcih PreservCyt Solution ali SurePath vrtinčite celotno konverzijsko stojalo najmanj 10 sekund pri najvišji nastavitvi hitrosti. Druga možnost je, da vsako epruveto posebej vrtinčite vsaj 5 sekund.
3. Odpipetirajte 75 μl vsakega kalibratorja, kontrole kakovosti ali vzorca v dno prazne hibridizacijske mikroplošče v skladu s postavitvijo plošče, ustvarjeno v *Setup* (Nastavitev). Izogibajte se dotikanju stranic vdolbinic in omejite nastajanje zračnih mehurčkov. Za vsak prenos uporabite čisto zelo dolgo konico pipete, da se izognete navzkrižni kontaminaciji kalibratorjev, kontrol kakovosti ali vzorcev. Naprave za odvzem vzorcev ne odstranjujte iz transportne epruvete za vzorce. Denaturirane vzorce lahko pokrijete z navojnimi pokrovčki za epruvete za odvzem vzorcev in jih shranite z napravami za odvzem vzorcev, ki ostanejo v epruvetah. Denaturirane vzorce PreservCyt je mogoče ponovno zapreti z originalnimi pokrovčki.

Opomba: Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo, če alikvoti vzorca niso previdno preneseni. Med prenosom vzorca se s konico pipete ne dotikajte notranjosti epruvete, ko odstranjujete 75- μl alikvot.

4. Po prenosu zadnjega vzorca ploščo pokrijte s pokrovom plošče in hibridizacijsko mikroploščo inkubirajte 10 minut pri temperaturi 20–25 °C.
5. Alikvotirajte pripravljeno in temeljito zvrtničeno mešanico sonde v vsebnik za reagent za enkratno uporabo. Previdno odpipetirajte 25 µl mešanice sonde v vsako vdolbinico, ki vsebuje kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce z uporabo 8-kanalnega pipetorja in svežih konic za vsako vrsto. Odmerite volumen sonde v vsako hibridizacijsko vdolbinico, pri čemer se izogibajte brizganju. Izogibajte se dotikanju stranic vdolbinic. Pokrov plošče postavite na mikroploščo za čas denaturacijske inkubacije.
6. Mikroploščo Hybridization Microplate pokrijte s pokrovom plošče in 3 ± 2 minuti stresajte na Hybrid Capture System Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt/min. *Kalibratorji, kontrole kakovosti in vzorci bi morali po stresanju porumeneti.* Vdolbinice, ki ostanejo vijolične, morda niso prejele ustrezne količine mešanice sonde. Vzorcem, ki ostanejo vijolični, dodajte dodatnih 25 µl mešanice sonde in ponovno pretresite. Če vdolbinice po tem postopku ostanejo vijolične, je treba vzorce ponovno testirati.
Opombe:
 - Po stresanju morajo biti vzorci PreservCyt Solution rožnati namesto rumeni.
 - Ko postavljate Hybridization Microplate v Microplate Heater I, pazite, da ne pride do brizganja.
7. Inkubirajte 60 ± 5 minut v predhodno ogretem Microplate Heater I, ki je uravnotežen na 65 ± 2 °C.

Hibridizacijska metoda z uporabo epruvet MicroTubes in vodne kopeli

Opombe:

- Obdelava vzorcev, zbranih z *digene* HC2 DNA Collection Device v STM z uporabo metode MST Vortexer 2 za mešanje in metode vodne kopeli za hibridizacijo ni bila potrjena. Vzorce, zbrane z *digene* HC2 DNA Collection Device v STM in obdelane z metodo MST Vortexer 2, je mogoče hibridizirati samo z uporabo metode Microplate Heater I.
- Če je bil denaturiran vzorec shranjen pri temperaturi -20°C , pustite, da se vzorec odtaja na temperaturi $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$, in ga temeljito zvrtničite, preden nadaljujete s hibridizacijo.

1. Označite in postavite potrebno število čistih hibridizacijskih mikroeprevet v stojalo za mikroeprevete.
2. Po inkubaciji odstranite kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce iz vodne kopeli. Vsako epruveto posebej stresajte vsaj 5 sekund, tik preden odstranite alikvote.
3. Odpipetirajte 75 μl vsakega kalibratorja, kontrole kakovosti ali vzorca v dno prazne hibridizacijske mikroeprevete po postavitvi plošče, ustvarjene v Setup (Nastavitev). Ne dotikajte se stranic mikroeprevet in omejite nastajanje zračnih mehurčkov. Za vsak prenos uporabite čisto zelo dolgo konico pipete, da se izognete navzkrižni kontaminaciji kalibratorjev, kontrol kakovosti ali vzorcev. Naprave za odvzem vzorcev ni treba odstraniti iz transportne epruvete za vzorce. Denaturirane vzorce lahko pokrijete z navojnimi pokrovčki za epruvete za odvzem vzorcev in jih shranite z napravami za odvzem vzorcev, ki ostanejo v epruvetah.

Opomba: Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo, če alikvoti vzorca niso previdno preneseni. Med prenosom vzorca se s konico pipete ne dotikajte notranjosti epruvete, ko odstranjujete 75- μl alikvota.

4. Po prenosu zadnjega vzorca hibridizacijske mikroeprevete inkubirajte 10 minut pri temperaturi $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$.
5. Alikvotirajte pripravljeno in temeljito zvrtničeno mešanico sonde v vsebnik za reagent za enkratno uporabo. Previdno odpipetirajte 25 μl mešanice sonde v vsako mikroepreveto, ki vsebuje kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce z uporabo 8-kanalnega pipetorja in svežih konic za vsako vrsto. Odmerite volumen sonde v vsako hibridizacijsko mikroepreveto, pri čemer se izogibajte brizganju. Izogibajte se dotikanju stranic epruvet. Preglejte stojalo od spodaj in se prepričajte, da so vse epruvete prejele ustrezno količino mešanice sonde.

-
6. Pokrijte mikroepruvete s tesnilom za plošče. Namestite pokrov stojala na vrh stojala. Stresite stojalo za mikroepruvete na Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt./min., 3 ± 2 minuti. *Kalibratorji, kontrole kakovosti in vzorci bi morali po stresanju porumeneti.* Epruvete, ki ostanejo vijolične, morda niso prejele ustrezne količine mešanice sonde. Vzorcem, ki ostanejo vijolični, dodajte dodatnih 25 μ l mešanice sonde in ponovno pretresite. Če epruvete po tem postopku ostanejo vijolične, je treba vzorce ponovno testirati.

Opomba: Po stresanju morajo biti vzorci PreservCyt Solution rožnati namesto rumeni.

7. Inkubirajte v vodni kopeli pri 65 ± 2 °C 60 ± 5 minut. Prepričajte se, da je nivo vode v vodni kopeli zadosten, da pokrije celotni volumen hibridizacijske mešanice. Stojalo za mikroepruvete bo plavalo v vodni kopeli.

Opomba: Ustvarite datoteko postavitve plošče s programsko opremo za analizo *digene*, če tega niste dokončali prej.

Zajem hibridov

1. Z okvirja plošče odstranite vse vdolbinice mikroplošče za zajemanje, razen zahtevanih. Neuporabljene vdolbinice mikroplošče vrnite v originalno vrečko in ponovno zaprite. Z markerjem oštevilčite vsak stolpec z 1, 2, 3. . . . Označite mikroploščo z ustreznim identifikatorjem. Vzorci bodo dodani v vdolbinice v skladu z vzorčno postavitvijo, pripravljeno v Setup (Nastavitev).
2. Hybridization Microplate, ki vsebuje kalibratorje, kontrole in vzorce, previdno odstranite iz Microplate Heater I. Takoj odstranite pokrov plošče in ga položite na čisto površino. Druga možnost je, da stojalo za mikroepruvete odstranite iz vodne kopeli. Takoj odstranite pokrov stojala in počasi povlecite tesnilo plošč navzgor in čez stojalo.
3. Z 8-kanalnim pipetorjem prenesite celotno vsebino (približno 100 μ l) kalibratorjev, kontrol kakovosti in vzorcev iz vdolbinic Hybridization Microplate ali mikroepruвет na dno ustrezne vdolbinice mikroplošče za zajemanje. Za vsak prenesen stolpec uporabite nove konice za pipete na 8-kanalnem pipetorju in pustite, da se vsaka konica za pipete dobro odcedi, da zagotovite popoln prenos vzorca. Če želite, lahko pipetor umirite tako, da položite sredino konic za pipete na zgornji rob vdolbinic mikroplošče za zajemanje (glejte *Diagram 1*).

DIAGRAM 1: Pravilno pipetiranje



4. Mikroploščo za zajemanje pokrijte s pokrovom plošče ali tesnilom plošče in stresajte na Rotary Shaker I pri 1100 ± 100 obratih na minuto pri $20\text{--}25^\circ\text{C}$ za 60 ± 5 minut.
5. Pripravite pufer za izpiranje in med to inkubacijo preverite rezervoarje za izpiranje rezervoarje za odpadke avtomatiziranega pralnika plošč. Glejte razdelek Priprava in shranjevanje reagenta.

-
6. Ko je korak odvzema končan, odstranite mikroploščo za zajemanje iz Rotary Shaker I in previdno odstranite pokrov plošče ali tesnilo plošče. Odstranite tekočino iz vdolbinic tako, da jo zavržete v umivalnik; do konca obrnite krožnik nad umivalnik in ga močno stresite z gibom navzdol, pri tem pa pazite, da ne povzročite brizganja z odlivanjem preblizu dna umivalnika. Ne obračajte plošče nazaj; popivnajte tako, da 2–3-krat močno potapkate po čistih brisačah Kimtowels Wipers ali enakovrednih papirnatih brisačah, ki ne puščajo vlaken. Prepričajte se, da je iz vdolbinic odstranjena vsa tekočina in da je vrh plošče suh.

Zaznavanje hibridov

Opombe:

- Dodajte dodatke po plošči v smeri od leve proti desni z uporabo 8-kanalnega pipetorja.
- Priporočljivo je, da se za izboljšanje doslednosti dovajanja reagenta uporabi tehnika obratnega pipetiranja. Pri tej tehniki se konice za pipete na začetku prenapolnijo z uporabo drugega omejevalnika na kontroli za aspiracijo/odmerjanje pipetorja (bat). Glej postopek spodaj. Obrišite konice na rezervoarju za reagent za enkratno uporabo, da odstranite odvečni reagent pred prenosom na ploščo.
- Če želite, lahko pipetor umirite tako, da položite sredino konic za pipete na zgornji rob vdolbinic mikroplošče. Pazite, da se ne dotikate stranic vdolbinic mikroplošče, sicer lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev. Glejte Diagram 1, prikazan zgoraj.

1. Alikvotirajte ustrezen volumen reagenta za zaznavanje 1 v rezervoar za reagent za enkratno uporabo (za navodila glejte razdelek o Priprava in shranjevanje reagenta). Previdno odpipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 1 v vsako vdolbinico mikroplošče za zajemanje z uporabo 8-kanalnega pipetorja in tehnike obratnega pipetiranja.

Postopek obratnega pipetiranja:

- 1a. Konice pritrdite na 8-kanalni pipetor; prepričajte se, da so vse konice trdno nameščene.
 - 1b. Potisnite bat pipetorja prek prvega omejevalnika do drugega omejevalnika.
 - 1c. Konice potopite v raztopino reagenta za zaznavanje 1.
 - 1d. Počasi sprostite bat in pustite, da raztopina napolni konice.
 - 1e. Raztopino odmerite v vdolbinice mikroplošče (75 µl), tako da bat pritisnete do konca. Ne izpustite bata, dokler konice za pipete niso ponovno potopljene v raztopino reagenta za zaznavanje 1.
 - 1f. Ponovno napolnite konice in ponavljajte, dokler niso napolnjene vse vdolbinice. Vdolbinice mikroplošče polnite od leve proti desni. Z opazovanjem intenzivnosti rožnate barve se prepričajte, da so vse vdolbinice napolnjene. Vse vdolbinice morajo imeti podobno intenzivnost.
2. Plošče pokrijte s pokrovom ali čistim parafilmom (ali enakovrednim) in inkubirajte 30–45 minut pri 20–25 °C.

Pranje

Operite ploščo za odvzem z eno od spodnjih dveh metod.

Metoda avtomatiziranega pralnika plošč

Opomba: 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 nadaljnja navodila po potrebi glejte *uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč*.

PRED VSAKO UPORABO:

- Prepričajte se, da je rezervoar za spiranje napolnjen vsaj do oznake 1 L z raztopino pufra za spiranje. Če ni, pripravite raztopino pufra za spiranje. Glejte razdelek Priprava in shranjevanje reagenta.
- Prepričajte se, da je rezervoar za spiranje 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.

1. Odstranite pokrov krožnika in postavite krožnik na platformo avtomatiziranega pralnika plošč.
2. Prepričajte se, da je napajanje vklopljeno in da je na zaslonu prikazano »Digene Wash Ready« ali »P1«.

Opomba: Če uporabljate samo delni trak vdolbinic za odvzem, bo treba prazne vdolbinice mikroplošče postaviti v ploščo za odvzem, da se stolpec pred spiranjem dokonča.

3. Izberite število lističev za spiranje, tako da pritisnete tipko »Rows« (Vrstice) in nato »+« ali »-«, da jih prilagodite. Pritisnite tipko »Rows« (Vrstice), da se vrnete na »Digene Wash Ready« ali »P1«.
4. Za začetek pritisnite »Start/Stop« (Začetek/zaustavitev).
5. Pralnik bo izvedel šest ciklov polnjenja in aspiracije, ki bodo trajali približno 10 minut. Med programom bo kratek premor, zato pazite, da plošče ne odstranite predčasno. Ko avtomatiziran pralnik plošč konča s pranjem, se na njem izpiše »Digene Wash Ready« ali »P1«.

6. Ko je program končan, odstranite mikroploščo iz pralnika. Plošča mora biti videti bela in v vdolbinicah mikroplošče ne sme ostati ostankov rožnate tekočine.

Ročna metoda spiranja

1. Odstranite reagent za zaznavanje 1 iz vdolbinic tako, da na ploščo položite čiste brisače Kimtowels Wipers ali enakovredne papirnate brisače, ki ne puščajo vlaken, in jih previdno obrnete. Pred obračanjem se prepričajte, da je papir v stiku s celotno površino plošče. Pustite, da se plošča odcedi 1–2 minuti. Dobro popivnajite s čistimi brisačami Kimtowels Wipers ali enakovrednimi papirnatimi brisačami, ki ne puščajo vlaken. Previdno zavrzite uporabljene papirnate brisače, da preprečite kontaminacijo z alkalno fosfatazo v kasnejših korakih.
2. Z aparatom za spiranje ploščo ročno operite 6-krat. Vsako vdolbinico speremo do preliwa, da odstranimo reagent za zaznavanje 1 z vrhov vdolbinic. Spiranje se začne pri vdolbinici A1 in se serpentinasto nadaljuje v desno in navzdol. Ko so vse vdolbinice napolnjene, pretočite tekočino v korito z močnim gibom navzdol. Drugo spiranje se začne pri vdolbinici H12, ki se premika v serpentinastem gibanju v levo in navzgor. To zaporedje 2 spiranj se ponovi še 2-krat za skupno 6 izpiranj na vdolbinico.
3. Po spiranju popivnajite ploščo tako, da jo obrnete na čiste brisače Kimtowels Wipers ali enakovredne papirnate brisače, ki ne puščajo vlaken, in 3–4-krat močno potapkate. Zamenjajte papirnate brisače in ponovno popivnajite. Ploščo pustite obrnjeno in pustite, da se odcedi 5 minut. Ploščo še enkrat popivnajite.
4. Plošča mora biti videti bela in v vdolbinicah mikroplošče ne sme ostati rožnate ostanke tekočine.

Pomnoževanje signala

Opombe:

- Za ravnanje z reagentom za zaznavanje 2 uporabite nov par rokavic.
 - Alikvotirajte samo količino reagenta, potrebno za izvedbo analize, v rezervoar za reagent za enkratno uporabo, da se izognete kontaminaciji reagenta za zaznavanje 2. Glejte razdelek Priprava reagenta. Reagenta za zaznavanje 2 ne vračajte v originalno stekleničko. Neuporabljen material po uporabi zavrzite.
 - Reagent za zaznavanje 2 dodajajte brez prekinitve. Inkubacijski čas vseh vdolbinic mora biti čim bližji.
 - Pazite, da se ne dotaknete strani vdolbinice mikroplošče ali da reagenta ne poškrupite nazaj na konice, ker lahko pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev (glejte *Diagram 1*).
1. Previdno pipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 2 v vsako vdolbino mikroplošče za zajemanje z uporabo 8-kanalnega pipetorja, kot je opisano prej. *Vse vdolbinice mikroplošč se morajo obarvati rumeno.* Z opazovanjem intenzivnosti barve se prepričajte, da so vse vdolbinice napolnjene. Vse vdolbinice morajo imeti podobno intenzivnost.
 2. Pokrijte mikroplošče s pokrovom plošče ali čistim parafilmom (ali enakovrednim) in inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi.
 3. Odčitajte mikroploščo na instrumentu DML po 15 minutah inkubacije (in najpozneje po 30 minutah inkubacije).
Programski protokol, specifičen za analizo, bo omogočil vnos ustreznih informacij o analizi neposredno v programsko opremo.
 4. Če niste uporabili celotne mikroplošče, odstranite uporabljene vdolbinice mikroplošče iz držala za mikroploščo, držalo temeljito sperite z destilirano ali deionizirano vodo, posušite in rezervirajte za naslednjo analizo.

Merila za preverjanje umerjanja analize

Preverjanje umerjanja analize se izvede za zagotovitev, da reagenti in priloženi materiali za kalibrator in kontrolo kakovosti delujejo pravilno, kar omogoča natančno določitev mejne vrednosti analize. *digene* HC2 HPV DNA Test zahteva umerjanje z vsako analizo, zato je treba vsako analizo preveriti z uporabo naslednjih meril. Ta postopek preverjanja ni mišljen kot nadomestilo za testiranje notranje kontrole kakovosti. Testni protokoli programske opreme za analizo *digene* samodejno preverijo spodnje kriterije.

- Negativen kalibrator

Negativni kalibrator je treba testirati v treh izvodih z vsako analizo. Srednja vrednost negativnega kalibratorja mora biti ≥ 10 in ≤ 250 RLU za nadaljevanje. Negativni rezultati kalibratorja bi morali pokazati koeficient variacije (% CV). ≤ 25 %. Če je % CV > 25 , zavržite vrednost z vrednostjo RLU, ki je najbolj oddaljena od povprečja, kot izstopajočo vrednost in znova izračunajte povprečje z uporabo preostalih dveh vrednosti. Če je razlika med povprečjem in vsako od obeh vrednosti ≤ 25 %, pojdite na 2. korak. V nasprotnem primeru je preverjanje umerjanja analize neveljavno in test je treba ponoviti za vse vzorce bolnic. V skladu s tem se ne sme poročati o rezultatih bolnikovih vzorcev.

- Kalibratorji

Kalibratorje je treba testirati v treh izvodih z vsako analizo. Za CPC je treba oba kalibratorja testirati v treh izvodih. Rezultati kalibratorja bi morali pokazati koeficient variacije (% CV) ≤ 15 %. Za CPC mora % CV LRC, HRC in LRC-HRC skupaj prikazati % CV ≤ 15 %. Če je % CV > 15 , zavržite vrednost kalibratorja z vrednostjo RLU, ki je najbolj oddaljena od povprečja, kot izstopajočo vrednost in znova izračunajte povprečje z uporabo preostalih vrednosti kalibratorja. Samo 1 LRC in 1 HRC dvojniki se lahko izbriše. Če je % CV kalibratorjev ≤ 15 %, nadaljujte s 3. korakom. V nasprotnem primeru je preverjanje umerjanja analize neveljavno in test je treba ponoviti za vse vzorce bolnic. V skladu s tem se ne sme poročati o rezultatih bolnikovih vzorcev.

Zgoraj opisano preverjanje umerjanja testa za kalibratorje samodejno izvede programska oprema za analizo *digene* in se natisne v poročilo o analizi podatkov. Protokoli analize *digene* za HPV samodejno preverijo, ali je % CV kalibratorjev za HPV z nizkim in visokim tveganjem ≤ 15 %. Vendar pa različici v1.0.2 in v1.0.3 programske opreme za analizo *digene* NE bosta razveljavili analize, razen če je % CV > 25 % za kalibratorje. Zato mora uporabnik ročno preveriti, ali je % CV, izračunan s programsko opremo za analizo *digene*, ≤ 15 %, in nadaljevati, kot je navedeno za situacijo 1 v spodnji preglednici. Če % CV ponovitev kalibratorja pade med 15 in 25, glejte navodila v situaciji 2 ali 3 v spodnji preglednici in nadaljujte z navedenim »Dejanje uporabnika«.

Situacija	Poročilo % CV za ponovitve LRC in/ali HRC	Ukrep, ki ga je izvedla programska oprema za analizo <i>digene</i>	Dejanje uporabnika
1	$\leq 15 \%$	Analiza je prijavljena kot »Valid« (Veljavno)	O rezultatih se lahko poroča; nadaljnje ukrepanje ni potrebno.
2	Med 15 % in 25 %	Odstranjena niso nobena odstopanja in analiza je prijavljena kot »Valid« (Veljavno)	Odstranite vrednost RLU kalibratorja, ki je najbolj oddaljena od povprečja. Ponovno izračunajte % CV kalibratorja z dvema preostalima vrednostma. Če je % CV preostalih vrednosti RLU $> 15 \%$, je analiza neveljavna. Rezultati se ne smejo poročati. Če je % CV preostalih vrednosti RLU $\leq 15 \%$, ponovno izračunajte mejno vrednost analize, nato znova izračunajte razmerje RLU/mejno vrednost vsakega vzorca z uporabo te mejne vrednosti. Te preračunane vrednosti se lahko poročajo.
3	Med 15 % in 25 %	Odstranjeno je bilo eno odstopanje na kalibrator in analiza je prijavljena kot »Valid« (Veljavno)	Analiza je neveljavna. O rezultatih se ne sme poročati. Analizo je treba ponoviti.
4	$> 25 \%$	Eno odstopanje je bilo odstranjeno, analiza pa prijavljena kot »Invalid« (Neveljavno)	Analiza je neveljavna. O rezultatih se ne sme poročati. Analizo je treba ponoviti.

Za ročni izračun % CV, kot je zahtevano v 2. situaciji zgoraj, mora uporabnik standardni odklon (STDEV) (n-1) preostalih ponovitvenih vrednosti RLU deliti s povprečjem preostalih ponovitvenih vrednosti RLU (LRC ali HRC ali oboje) in ta rezultat pomnožiti s 100.

Za izračun % CV z uporabo programa Microsoft® Excel® (priložen prejšnji različici programske opreme za analizo *digene*) lahko uporabnik izračuna standardni odklon ponovitev kalibratorja s formulo *STDEV* in določi povprečno RLU kalibratorja s formulo *AVERAGE*. Ko dobite ti dve vrednosti, delite *STDEV* s *POVPREČJEM* in rezultat pomnožite s 100, da dobite % CV.

$$(STDEV/POVPREČJE) * 100 = \% CV$$

Če imate kakršna koli vprašanja v zvezi z izračunom % CV, ponovnim izračunom mejne vrednosti analize ali ponovnim izračunom RLU/mejne vrednosti vzorcev, pokličite svojega lokalnega predstavnika družbe QIAGEN.

Za določitev ponovljivosti kalibratorja in oceno pogostosti, pri kateri so morda potrebni ročni ponovni izračuni, so bili zbrani rezultati treh kliničnih vrednotenj, ki so vključevala 152 postopkov analize, izvedenih s *digene* HC2 HPV DNA Test. Rezultati so pokazali, da je bil povprečni % CV za teh 152 postopkov 8,1. Če upoštevamo vse tri ponovitve kalibratorja na testni postopek, je bila ponovljivost kalibratorja > 15 % CV opažena le pri 17 od 152 ponovitev (11,2 %), pri čemer je 10 od teh 17 preskusnih postopkov povzročilo % CV med 15–25 (2. situacija). Za 17 testnih postopkov, ki so prinesli % CV > 15, je bil odstranjen en odstotek in ponovno izračunan % CV. Po dejanju uporabnika za 2. situacijo je samo en % CV testnega postopka ostal > 15, kar je razveljavilo testni postopek. % CV preostalih 151 testnih postopkov je bil izračunan za povprečni % CV, ki je znašal 6,0.

- Rezultati povprečja kalibratorja (LRC ali HRC) in negativnega povprečja kalibratorja (NC) se uporabljajo za izračun razmerja LRC/NC ali HRC/NC za vsako sondo. Prejšnje različice (V1.0.2 in V1.0.3) protokolov programske opreme za analizo *digene* ne izračunajo pravilno sprejemljivih razponov. Ta razmerja morajo izpolnjevati naslednja merila za preverjanje kalibracije analize, preden je mogoče interpretirati rezultate vzorca:

Metoda CPC	Metoda dvojne sonde
Preverjanje kalibracije analize	Preverjanje kalibracije analize
Sprejemljivi razponi	Sprejemljivi razponi
$2,0 \leq \text{LRC}\bar{X}/\text{NC}\bar{X} \leq 15$	$2,0 \leq \text{LRC}\bar{X}/\text{NCLR}\bar{X} \leq 15$ (stran LR)
$2,0 \leq \text{HRC}\bar{X}/\text{NC}\bar{X} \leq 15$	$2,0 \leq \text{HRC}\bar{X}/\text{NCHR}\bar{X} \leq 15$ (HR stran)
$2,0 \leq (\text{LRC in HRC}) \bar{X}/\text{NC}\bar{X} \leq 15$	

- Izračunajte ustrezno $\text{LRC}\bar{X}/\text{NC}\bar{X}$ ali $\text{HRC}\bar{X}/\text{NC}\bar{X}$ razmerja za vsak niz sond. Če sta razmerji $\geq 2,0$ in ≤ 15 , nadaljujte z naslednjim korakom. Če je katero od razmerij $< 2,0$ ali > 15 , je analiza neveljavna za to specifično sondo in jo je treba ponoviti. Ponovite vse vzorce bolnic v postopku.

Opomba: Sprejemljiva območja za negativni kalibrator in pozitivne kalibratorje so bila določena samo za instrument DML.

Izračun mejne vrednosti

Ko je analiza validirana v skladu z zgoraj navedenimi merili, so mejne vrednosti za določanje pozitivnih vzorcev naslednje:

- Metoda koktajla kombinirane sonde:
$$\frac{(\text{LRC ponovitve} + \text{HRC ponovitve})}{\text{Št. ponovitev}}$$
- Metoda dvojne sonde:
$$\text{Mejna vrednost sonde za HPV z nizkim tveganjem} = \text{LRC}\bar{x}$$
$$\text{Mejna vrednost sonde za HPV z visokim tveganjem} = \text{HRC}\bar{x}$$

Primer izračunov mejne vrednosti					
Za:		Dvojna sonda za HPV z nizkim ali visokim tveganjem	Metoda CPC sonde za HPV z nizkim tveganjem	Metoda CPC sonde za HPV z visokim tveganjem	Metoda CPC sonde za HPV z visokim tveganjem
	Vrednosti NC RLU	Vrednosti LRC ali HRC RLU	Vrednosti LRC RLU	Vrednosti HRC RLU	Vrednosti LRC in HRC RLU
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Srednja vrednost RLU	96	318	340	287*	318,8*
% CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$LRC\bar{X}/NC\bar{X}$	N/A	3,31	3,54	3,00	3,32

* Povprečni % CV vseh 6 ponovitev je bil 16,8. Ponovitev z vrednostjo 235 je bila izbrisana kot odstopanje. % CV preostalih ponovitev je bil 13,0 s povprečjem 318,8. Začetni % CV HRC je bil 11,5.

Srednja vrednost RLU za pozitivni kalibrator določa mejno vrednost analize. Zato je pozitivna mejna vrednost (LRC%) = 318.

Vse vrednosti RLU vzorca je treba pretvoriti v razmerje do ustrezne mejne vrednosti. Na primer, vse analize, preizkušene s sondo za HPV z nizkim tveganjem, je treba izraziti kot mejno vrednost RLU vzorca/nizkega tveganja. Enako lahko storite z vzorci, testiranimi s sondo za HPV visokega tveganja ali sondo CPC.

Opombe: vrednosti RLU/CO in pozitivni/negativni rezultati za vse vzorce so navedeni v *poročilu o analizi podatkov* instrumenta DML.

Za aplikacijo instrumenta Rapid Capture System je bil programski protokol RCS HPV programiran za uporabo faktorja prilagoditve umerjanja (Calibration Adjustment Factor, CAF) 0,8 za srednjo vrednost RLU veljavnih ponovitev pozitivnega kalibratorja. Ta CAF je potreben, da ostanejo značilnosti učinkovitosti analize enakovredne ročnemu preskusnemu postopku. Ta sprememba velja le za analize, ki se izvajajo z uporabo aplikacije instrumenta Rapid Capture System. Zato je ključnega pomena, da izberete pravi programski protokol za uporabo z vsako specifično testno metodo, da ustvarite natančne rezultate testa. Vse vrednosti RLU vzorca je treba pretvoriti v razmerje do ustrezne mejne vrednosti (Cutoff, CO). Na primer, vse analize morajo biti izražene kot vrednost RLU/CO vzorca.

Kontrola kakovosti

Vzorci za kontrolo kakovosti so priloženi *digene* HC2 HPV DNA Test. Oglejte si ustrezen uporabniški priročnik za navodila o tem, kako vnesti številke serij in datume poteka uporabe kontrol kakovosti. Te kontrole kakovosti morajo biti vključene v vsak testni postopek, RLU/CO vsake kontrole kakovosti pa mora biti znotraj naslednjih sprejemljivih razponov, da se postopek šteje za veljavnega. Če kontrole kakovosti ne spadajo v te razpone, je analiza neveljavna in jo je treba ponoviti. V skladu s tem ne bi smeli poročati o rezultatih bolnic za neveljaven postopek.

Kontrola kakovosti	Tip HPV	Pričakovani rezultat (RLU/mejna vrednost) sonde za HPV z nizkim tveganjem			
		NAJMANJŠA VREDNOST	NAJVIŠJA VREDNOST	POVPREČNA VREDNOST	% CV
QC1-LR	NIZKO TVEGANJE (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	VISOKO TVEGANJE (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Kontrola kakovosti	Tip HPV	Pričakovani rezultat (RLU/mejna vrednost) sonde za HPV z visokim tveganjem			
		NAJMANJŠA VREDNOST	NAJVIŠJA VREDNOST	POVPREČNA VREDNOST	% CV
QC1-LR	NIZKO TVEGANJE (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	VISOKO TVEGANJE (HPV 16)	2	8	5,0	25

Kontrola kakovosti	Tip HPV	Pričakovani rezultat (RLU/mejna vrednost) sonde CPC HPV			
		NAJMANJŠA VREDNOST	NAJVIŠJA VREDNOST	POVPREČNA VREDNOST	% CV
QC1-LR	NIZKO TVEGANJE (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	VISOKO TVEGANJE (HPV 16)	2	8	5,0	25

-
- Materiali za kontrolo kakovosti, ki so v kompletu, so klonirane tarče DNK HPV in niso pridobljeni iz divjega tipa HPV. To je ista vrsta materiala, ki se uporablja za kalibratorje, ki so priloženi testu *digene* HC2 HPV DNA Test.
 - Ta material za kontrolo kakovosti ne bo deloval kot ustrezen nadzor za obdelavo PreservCyt Solution ali SurePath Preservative Fluid.
 - Kontrole kakovosti, ki so priložene temu testnemu kompletu, je treba uporabiti za notranjo kontrolo kakovosti. Dodatne kontrole kakovosti se lahko testirajo v skladu s smernicami ali zahtevami lokalnih in/ali državnih predpisov ali akreditacijskih organizacij.

Interpretacija rezultatov vzorcev

Opomba: Mejna vrednost testa *digene* HC2 HPV DNA Test, mi znaša 1 pg/ml, je enakovredna 100.000 kopijam HPV/ml ali 5.000 kopijam HPV na analizo.

- Vzorci STM z razmerjem RLU/mejna vrednost $\geq 1,0$ samo s sondo za HPV z nizkim tveganjem veljajo za »Positive« (Pozitivno) za enega ali več tipov HPV 6, 11, 42, 43 ali 44.
- Vzorci STM z razmerjem RLU/mejna vrednost $\geq 1,0$ samo s sondo za HPV z visokim tveganjem veljajo za »Positive« (Pozitivno) za enega ali več tipov HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68.
- Pri testiranju vzorcev PreservCyt, če je razmerje RLU/CO vzorca $\geq 1,0$ in $< 2,5$, družba QIAGEN priporoča ponovno testiranje vzorca. Če je začetni rezultat ponovnega testiranja pozitiven ($\geq 1,0$ RLU/CO), se lahko vzorec prijavi kot pozitiven in nadaljnjega ponovnega testiranja ni treba opraviti. Če pa je rezultat prvega ponovnega testa negativen ($< 1,0$), je treba opraviti drugi ponovni test (tretji rezultat), da se ustvari končni rezultat. Rezultat drugega ponovnega testa se šteje za končni rezultat in ga je treba sporočiti.
- Če je razmerje RLU/mejne vrednosti vzorca blizu, vendar manj kot 1,0 in obstaja sum na visoko tvegano okužbo s HPV, razmislite o alternativnih metodah testiranja in/ali ponovnem odvzemu vzorca.
- Vzorci STM z razmerjem RLU/mejne vrednosti $\geq 1,0$ tako za sondo za HPV z nizkim tveganjem kot za sondo za HPV z visokim tveganjem veljajo za »Positive« (Pozitivno) za 1 ali več tipov HPV iz vsake skupine sond.
- Vzorci STM z razmerjem RLU/mejne vrednosti $\geq 1,0$ s koktajlom kombinirane sonde veljajo za pozitivne na 1 ali več tipov HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68.
- Vzorci z razmerjem RLU/mejne vrednosti $< 1,0$ za koktajl kombinirane sonde ali sondo za HPV z nizkim tveganjem in sondo za HPV z visokim tveganjem veljajo za »Negative« (Negativno) ali »No HPV DNA detected« (HPV DNK ni zaznana) za 18 testiranih tipov HPV. Zaporedij HPV DNK ni ali pa so ravni HPV DNK pod mejo zaznavnosti analize.

Značilnosti učinkovitosti

Indikacija podatkov, ki podpirajo HPV z nizkim in visokim tveganjem

Klinični presejalni pregled bolnikov 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 *digene* HC2 HPV DNA Test so pridobili od žensk, ki so obiskovale več klinik Kaiser. Začetni bris Pap je bil ovrednoten po Bethesdini klasifikaciji. Za enakovredno terminologijo presejalnih testov za raka materničnega vratu v Evropski skupnosti si oglejte Evropske smernice za zagotavljanje kakovosti presejalnih testov za raka materničnega vratu⁴⁰. Ženske (15 let ali več) z rezultati brisa Pap ASC-US (atipične celice nedoločenega pomena) so bile ponovno poslane 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.

Testiranje DNK HPV je bilo opravljeno na začetnem vzorcu in uporabljena je bila samo sonda za HPV z visokim tveganjem. Testiranje DNK HPV je bilo izvedeno s prototipom testa *digene* HC2 HPV DNA Test, ki je vseboval sonde za 11 od 13 tipov HPV, vključenih v sondo za HPV z visokim tveganjem, ni pa vseboval sond za HPV tipa 59 in 68. Ni pričakovati, da bo ta razlika povzročila bistveno različne profile učinkovitosti za obe analizi.

Rezultati testa HPV 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 učinkovitosti testa *digene* HC2 HPV DNA Test za STM in medija PreservCyt je učinkovitost analize predstavljena samo za PreservCyt Solution.

Preglednica 3 kaže, da je negativna napovedna vrednost testa *digene* HC2 HPV DNA Test za prisotnost HSIL ali večje bolezni pri kolposkopiji 99 % pri tistih, ki so prejele napotnico bris Pap ASC-US.

Preglednica 3. Primerjava testa *digene* HC2 HPV DNA Test v primerjavi s konsenzno histologijo. Populacija napotena na bris Pap ASC-US. Kaiserjeva študija, vzorci raztopine PreservCyt Solution

HSIL ali več v času kolposkopije				
		+	-	Skupaj
HPV z visokim tveganjem	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Skupaj	71	814	885

Občutljivost [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 95 % IZ = 84,3 do 97,7
 Specifičnost [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 95 % IZ = 57,7 do 64,4
 Razširjenost bolezni = 8,0 % (71/885)
 Pozitivna napovedna vrednost analize = 17,2 % (66/383)
 Negativna napovedna vrednost analize = 99,0 % (497/502)

Preglednica 4 prikazuje teoretične pozitivne in negativne napovedne vrednosti na podlagi različnih razširjenosti za prvotno ASC-US, za katero je bilo ugotovljeno, da je HSIL ali višja na podlagi rezultatov sonde za HPV z visokim tveganjem.

Preglednica 4. Teoretična pozitivna in negativna napovedna vrednost. Sonda za HPV z visokim tveganjem. Rezultati brisa Pap ASC-US

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

Preglednica 5 prikazuje razlike med različnimi starostnimi skupinami v tej študiji:

Preglednica 5. Podatki študije Kaiser. Učinkovitost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test v primerjavi s soglasnimi histološkimi rezultati (HSIL). Starostno specifične značilnosti

	Starost < 30	Starost 30–39	Starost > 39
n	287	233	365
Razširjenost bolezni (%)	12,2	11,2	2,7
Občutljivost (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95-% interval zaupanja	90,0–100	69,9–97,6	44,4–97,5
Specifičnost (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95-% interval zaupanja	25,7–37,5	59,3–72,6	74,6–83,3
Negativna napovedna vrednost (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Pozitivna napovedna vrednost (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (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 HPV DNA Test je bila izvedena z uporabo vzorcev, zbranih iz več velikih kolposkopskih klinik v bolnišnicah z visoko razširjenostjo bolezni materničnega vratu in HPV (3 lokacije) v zahodnih in južnih ZDA. 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. Vzorce odluščenih celic materničnega vratu smo pridobili bodisi z *digene* HC2 DNA Collection Device in jih dali v STM ali z napravo v obliki metle in jih sprali v PreservCyt Solution. Vzorci so bili zbrani med kolposkopijo. Vzorce smo testirali s testom *digene* HC2 HPV DNA Test in rezultate primerjali s stanjem bolezni, določenim za vsako bolnico. Stanje bolezni je temeljilo na rezultatih histološkega vrednotenja, če pa je bila histologija negativna ali v odsotnosti histološkega rezultata, je bilo stanje bolezni določeno s citologijo v času kolposkopskega pregleda (glejte *Preglednica 6*). *Digene* HC2 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 HPV DNA Test za STM in medija PreservCyt je učinkovitost analize predstavljena samo za PreservCyt.

Pri rezultatih sonde za HPV z visokim tveganjem pri vzorcih STM in vzorcih PreservCyt Solution niso opazili nobene razlike. Naslednja preglednica prikazuje rezultate sonde za HPV z visokim tveganjem pri tej populaciji:

Preglednica 6. Algoritem stanja bolnikove bolezni

Rezultat citologije	Histološki rezultat	Stanje bolezni
NEG.	NEG. ali Ni dokončano*	NEG.
LSIL	NEG.	LSIL
HSIL	NEG.	HSIL
Rak	NEG.	HSIL+
NEG.	LSIL	LSIL
LSIL	Ni dokončano*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Rak	LSIL	LSIL
NEG.	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ni dokončano*	HSIL
Rak	HSIL	HSIL
NEG.	Rak	HSIL+
LSIL	Rak	HSIL+
HSIL	Rak	HSIL+

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

Preglednici 7 in 8 predstavljata učinkovitost testa *digene* HC2 HPV DNA Test, določenega z uporabo 327 vzorcev PreservCyt, od katerih je bilo 96 zbranih pri ženskah z diagnozo bolezni materničnega vratu visoke stopnje. Primerjave so bile opravljene z uporabo vseh bolnic študije z nenormalnimi rezultati napotnega brisa Pap. Primerjave so prikazane za vzorce PreservCyt, testirane s sondo za HPV visokega tveganja.

Preglednica 7. Rezultati sonde za HPV z visokim tveganjem

Končno stanje bolezni							
Rezultat napotnega brisa Pap	HSIL	LSIL	Negative (Negativno)	Rezultat napotnega brisa Pap	HSIL	LSIL	Skupaj
Rezultati za HPV z visokim tveganjem	POZ.	NEG.	POZ.	NEG.	POZ.	NEG.	
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Skupaj	89	7	107	47	33	44	327
		96		154		77	

Preglednica 8 kaže, da je test *digene* HC2 HPV DNA Test z uporabo sonde za HPV z visokim tveganjem 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. Test je tudi pokazal skoraj 93-% negativno napovedno vrednost v tej populaciji.

Preglednica 8. Značilnosti učinkovitosti. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test med bolnicami, ki imajo napotni bris Pap LSIL ali višji in končno stanje bolezni HSIL

Napotni bris Pap LSIL ali HSIL → Bolezen HSIL				
		+	-	Skupaj
Rezultat sonde za HPV z visokim tveganjem	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Skupaj	96	231	327

Občutljivost $[TP/(TP+FN)] = 92,7\% (89/96)$
95 % IZ = 85,6 do 97,0
Specifičnost $[TN/(TN+FP)] = 39,4\% (91/231)$
95 % IZ = 33,1 do 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 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 s polimerazno verižno reakcijo (PCR) HPV (analiza samo za raziskovalno uporabo) na vzorcih s pozitivnimi rezultati HPV, katerih ustrezen stanje bolezni je bilo nižje od neoplazije nizke stopnje, skoraj 75 % vzorcev pozitivnih.

Preglednica 9 prikazuje teoretične pozitivne in negativne napovedne vrednosti sonde za HPV z visokim tveganjem za začetni LSIL ali HSIL, ki se pri kolposkopiji ugotovi kot HSIL ali hujša bolezen.

Preglednica 9. Teoretična pozitivna in negativna napovedna vrednost. Sonda za HPV z visokim tveganjem. Začetni rezultati brisa Pap za LSIL ali HSIL

Teoretična razširjenost za HSIL	Začetni rezultat brisa Pap za LSIL ali HSIL	
	Analiza pozitivna	Analiza negativna
	Napovedna vrednost	Napovedna vrednost
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

Podatki, ki podpirajo indikacijo primarnega presejanja HPV z visokim tveganjem

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

Spodaj so opisani rezultati osmih 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. 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 30–35 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. Kot je navedeno, sta bili 2 od 8 presejalnih študij izvedeni v Združenih državah; 2 v Evropi, 2 v Latinski Ameriki, 1 v Afriki in 1 v Aziji.

Učinkovitost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, opaženega v šestih presečnih študijah, je povzeta v Preglednicah 10 in 11 za ženske, stare 30 let in več, s histološko potrjeno cervikalno neoplazijo visoke stopnje (opredeljeno kot CIN3 ali hujšo).

Preglednica 10. Ocene učinkovitosti občutljivost in specifičnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test

Populacija	n		Občutljivost (%)			Specifičnost (%)		
			Samo PAP	Samo HPV	HPV + PAP	Samo PAP	Samo HPV	HPV + PAP
Zahodna Evropa 1	7592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	<u>100</u> <u>(27/27)</u>	98,5 (7453/7565)	96,2 (275/7565)	<u>95,1</u> <u>(7193/7565)</u>
		95 % IZ	32,0–71,3	81,0–99,9	<u>87,2–100</u>	98,2–98,8	95,7–96,6	<u>94,6–95,6</u>
Latinska Amerika 1	6115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	<u>97,4</u> <u>(75/77)</u>	98,7 (5962/6038)	93,9 (5669/6038)	<u>93,4</u> <u>(5637/6038)</u>
		95 % IZ	46,68–69,6	87,2–98,6	<u>90,9–99,7</u>	98,4–99,0	93,3–94,5	<u>92,7–94,0</u>
Latinska Amerika 2†	6176		77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	<u>94,1</u> <u>(64/68)</u>	94,1 (5745/6108)	94,0 (5742/6108)	<u>89,9</u> <u>(5490/6108)</u>
		95 % IZ	66,2–87,1	79,9–95,8	<u>85,6–98,4</u>	93,4–94,6	93,4–94,6	<u>89,1–90,6</u>
Afrika	2925		84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	<u>92,5</u> <u>(99/107)</u>	86,4 (2436/2818)	80,0 (2253/2818)	<u>76,4</u> <u>(2152/2818)</u>
		95 % IZ	75,8–90,5	82,4–94,8	<u>85,8–96,7</u>	85,1–87,7	78,4–81,4	<u>74,8–77,9</u>
Azija	1936		97,6 (41/42)	100 (42/42)	<u>100</u> <u>(42/42)</u>	76,3 (1445/1894)	83,0 (1572/1894)	<u>68,0</u> <u>(1287/1894)</u>
		95 % IZ	87,4–99,9	91,6–100,0	<u>91,6–100,0</u>	74,3–78,2	81,2–85,0	<u>65,8–70,1</u>
ZDA 1	1040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	<u>100</u> <u>(2/2)</u>	97,6 (1013/1038)	96,2 (999/1038)	<u>95,5</u> <u>(991/1038)</u>
		95 % IZ	1,26–98,7	15,8–100,0	<u>15,8–100,0</u>	96,5–98,4	94,9–97,3	<u>94,0–96,7</u>

† Podatki HC2, kjer so na voljo, podatki HCS uporabljeni drugače; združeni podatki.

Preglednica 11. Ocene učinkovitosti za pozitivno in negativno napovedno vrednost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test

Populacija		n	Občutljivost %		Pozitivna napovedna vrednost (%)				Negativna napovedna vrednost (%)	
			CIN 3	Samo PAP	Samo HPV	HPV + PAP	Samo PAP	Samo HPV	HPV + PAP	
Zahodna Evropa 1	7592		0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)	
		95 % IZ	0,23–0,52	6,21–17,9	5,45–11,8	4,51–9,69	99,70–99,91	99,92–100,0	99,95–100,0	
Latinska Amerika I	6115		1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)	
		95 % IZ	0,99–1,57	28,6–46,4	13,2–20,3	12,6–19,4	99,25–99,63	99,82–99,98	99,87–100,0	
Latinska Amerika 2†	6176		1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)	
		95 % IZ	0,86–1,39	9,69–16,3	11,1–18,0	7,30–11,8	99,57–99,85	99,75–99,95	99,81–99,98	
Afrika	2925		3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)	
		95 % IZ	3,01–4,40	15,6–22,9	11,9–17,4	10,6–15,5	98,89–99,60	99,13–99,76	99,27–99,84	
Azija	1936		2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)	
		95 % IZ	1,57–2,92	6,07–11,2	8,44–15,3	4,70–8,65	99,62–100,0	99,77–100,0	99,71–100,0	
ZDA 1	1040		0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)	
		95 % IZ	0,02–0,69	0,10–19,6	0,60–16,5	0,50–14,0	99,45–100,0	99,63–100,0	99,63–100,0	

† Podatki HC2, 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 (Negative Predictive Value, NPV) HPV v vseh primerih presega vrednost samo Pap in se približuje 100 %. Ta NPV dokazuje visoko verjetnost odsotnosti hude bolezni materničnega vratu ali raka pri citološko normalnih ženskah, 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 odločitve 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 nenormalne brise Pap, starost ob prvem spolnem odnosu, število spolnih partnerjev in sočasne spolno prenosljive bolezni.^{27,28}

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 s starostjo dramatično zmanjšuje.^{28, 30–37, 41} Pozitivne napovedne vrednosti se zmanjšajo pri testiranju populacij z nizko razširjenostjo ali posameznic z majhnim tveganjem za okužbo.

Longitudinalne analize so bile izvedene z uporabo rezultatov dveh študij; enega je v Združenih državah izvedel Nacionalni inštitut za raka (National Cancer Institute, NCI) v Portlandu v Oregonu, drugega pa v Franciji v Laboratoire Pol Bouin CHU de Reims. Te longitudinalne analize so bile opravljene, 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.

Rezultati teh longitudinalnih analiz so predstavljeni v Preglednicah 12 in 13 spodaj.

Preglednica 12. Povzetek rezultatov: Študije NCI in Francije o relativnem tveganju bolezni 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*	9.429	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	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Zaporedni normalni brisi Pap*	2.026	4	0,099	1,000
	Vse	Bris Pap normalen, HPV negativen	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Zaporedni normalni brisi Pap*	2.650	7	0,136	1,000

* Tri normalni letni brisi Pap v približno 2 letih

Preglednica 13. Povzetek rezultatov: Študije NCI in Francije o stopnjah bolezni, stratificiranih glede na stanje HPV na izhodišču

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	1.078	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	2.561	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.

Analitična občutljivost

Neklinični panel klonirane plazmidne DNK HPV je bil testiran, da bi ugotovili, ali je vsakega od 18 tipov HPV mogoče zaznati s testom *digene* HC2 HPV DNA Test, in da bi določili analitično občutljivost analize za vsakega od tipov HPV. Vsaka ciljna koncentracija HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml in 0,2 pg/ml) vsakega od 18 tipov DNK HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 in 68) so izvedli v treh izvodih s sondo za HPV z nizkim tveganjem ali sondo za HPV z visokim tveganjem, kot je ustrezno. Srednji signal v RLU za vsako koncentracijo vsakega tipa HPV je bil izračunan in primerjan s pozitivnim kalibratorjem za ustrezno stran analize.

Meja zaznavnosti vsakega tipa HPV v STM je prikazana v Preglednica 14. Meje zaznavnosti so se gibale od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml, odvisno od testiranega tipa HPV. Vsi tipi HPV so bili zaznavni pri ocenjeni ravni 1,09 pg ciljne DNA HPV na 1 ml vzorca STM. Povprečna meja zaznavnosti vseh 18 tipov DNK HPV je bila 1,09 pg/ml s standardnim odklonom 0,05.

Preglednica 14. Povzetek meje zaznavnosti občutljivosti za vsak tip DNK HPV v STM za *digene* HC2 HPV DNA Test

Tip DNK HPV	Koncentracija zaznavnosti DNK HPV (pg/ml)	Standardni odklon	95-% območje zaupanja
6	1,33	0,03	1,22–1,46
11	1,13	0,05	1,00–1,29
16	1,09	0,06	0,94–1,29
18	1,05	0,05	0,88–1,29
31	1,01	0,05	0,91–1,15
33	1,35	0,02	1,26–1,45
35	1,11	0,05	0,95–1,31
39	1,39	0,09	1,16–1,71
42	1,20	0,05	1,02–1,44
43	0,85	0,03	0,86–1,07
44	1,17	0,04	1,02–1,36
45	1,14	0,04	0,99–1,35
51	0,78	0,10	0,70–0,88
52	1,37	0,06	1,21–1,58
56	0,62	0,04	0,58–0,67
58	0,82	0,04	0,73–0,94
59	1,10	0,06	1,00–1,21
68	1,19	0,04	1,03–1,39
Povprečje (vsi tipi)	1,09	0,05	0,97–1,27

Učinkovitost koktajla kombinirane sonde (CPC)

Isti neklinični panel plazmidne DNK HPV, opisan zgoraj, je bil testiran za določitev analitične občutljivosti vsakega od 18 tipov HPV v testu *digene* HC2 HPV DNA Test po protokolu koktajla kombinirane sonde (Combined-Probe Cocktail, CPC), kot je opisano v teh navodilih. Analitična občutljivost protokola CPC je variirala od 0,58 pg/ml do 1,39 pg/ml in vsi tipi HPV so bili zaznavni pri ocenjeni ravni 0,95 pg/ml tarče DNK HPV na 1 ml vzorca. Povprečna meja zaznavnosti za vseh 18 tipov HPV je bila 0,95 pg/ml s standardnim odklonom 0,07. Ta občutljivost je enakovredna analitični občutljivosti, ugotovljeni za metodo dvojne sonde testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

Enakovrednost med vzorci STM in PreservCyt Solution

Enakovrednost med vzorci STM in raztopino PreservCyt Solution je bila preučena glede enakega obnavljanja DNK HPV 18 iz približno 10^6 pozitivnih celic HeLa, ki vsebujejo integrirane genome HPV 18, dodanih v STM in v skupino negativnih celic v PreservCyt Solution. Vsaka vrsta vzorca je bila obdelana v skladu z ustreznimi postopki obdelave/denaturacije, opisanimi v teh navodilih za uporabo, in testirana s testom *digene* HC2 HPV DNA Test s sondo za HPV z visokim tveganjem. Rezultati so pokazali, da je pridobitev DNK HPV 18 iz celic človeškega karcinoma enakovredna za ta dva medija in da postopek priprave PreservCyt Solution ne vpliva na analitično občutljivost *digene* HC2 HPV DNA Test.

Korelacija rezultata vzorca SurePath z vzorci STM v klinični populaciji

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 ustrezne mejne vrednosti analize *digene* HC2 High-Risk HPV DNA za uporabo z vzorci SurePath, je vključevala približno 400 bolnic. Faza klinične validacije, v katero je bilo vključenih približno 1500 bolnic za validacijo izbrane mejne vrednosti analize, se je začela po tem, ko je vmesna analiza izvedljivosti pokazala, da je mejna vrednost analize 1,0 RLU/CO z uporabo vzorcev SurePath dosegla 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 sta bila preostali vzorec SurePath in ustrezen vzorec STM testirana s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test z mejno vrednostjo analize 1,0 RLU/CO.

Preglednica 15 prikazuje korelacijo rezultata SurePath s parom vzorcev STM, opaženih v končnih rezultatih, primernih za analizo podatkov, pridobljenih iz celotne vključene populacije.

Preglednica 15. Ujemanje rezultatov SurePath s STM (vse starosti in citološka klasifikacija) (n = 1490)

% pozitivnega ujemanja		% negativnega ujemanja	
95 % IZ		95 % IZ	
(n/n)		(n/n)	
Vsi pozitivni	Visoko pozitivna podmnožica (RLU/CO ≥ 2,5)	Vsi negativni	Nizka negativna podmnožica RLU/CO (< 0,80)
93,5	96,4	95,3	96,0
90,7, 95,6	94,1, 98,0	93,8, 96,5	94,6, 97,1
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)

Ti rezultati predvidevajo, da bosta relativna občutljivost in specifičnost analize z uporabo vzorcev SurePath močno korelirali s tistimi, pridobljenimi z uporabo vrste vzorca STM, kar dokazuje spodnja meja 95-% intervala zaupanja za pozitivno in negativno ujemanje.

Obnovljivost

Izvedena je bila multicentrična študija ponovljivosti za določitev med dnevi, med lokacijami in splošno ponovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test z uporabo panela tarč DNK HPV ter HPV-pozitivnih in HPV-negativnih kliničnih vzorcev.

Trije zunanji laboratoriji so izvedli testiranje z isto serijo testnih kompletov *digene* HC2 HPV DNA Test v treh različnih dneh z identičnim panelom za ponovljivost. Panel za ponovljivost je vključeval naslednje vzorce: 12 zbirk denaturiranih kliničnih vzorcev STM; 3 bazeni nedenaturiranih kliničnih vzorcev PreservCyt Solution; negativen kalibrator; in pozitivne kalibratorje z nizkim in visokim tveganjem pri koncentracijah 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml in 10 pg/ml. Vsi člani panela so bili testirani vsak dan v treh izvodih z uporabo sonde za HPV z visokim tveganjem in metode CPC. Rezultati so prikazani v Preglednica 16.

Preglednica 16. Povzetek splošne statistike za multicentrično ponovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test

Statistična mera	High-Risk HPV Probe (Sonda za HPV z visokim tveganjem)	Koktajl kombinirane sonde (CPC)	Kombiniran rezultati sonde za HPV z visokim tveganjem in CPC ^a
Delež pričakovanih pozitivnih rezultatov z opaženim pozitivnim rezultatom	100 % (99,0–100,0)	99,8 % (98,92–100,0)	99,9 % (99,38–100,0)
Delež pričakovanih negativnih rezultatov z opaženim negativnim rezultatom	99,0 % (97,49–99,73)	98,9 % (96,79–99,77)	99,0 % (97,88–99,58)
Ujemanje	99,5 % (98,70–99,86)	99,5 % (98,70–99,86)	99,5 % (99,0–99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^a Številke v oklepajih označujejo 95-% intervale zaupanja. Skupni podatki so kombinacija vseh postopkov na vseh lokacijah.

To kaže, da je ponovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test s kliničnimi vzorci, zbranimi v STM, zelo dobra.

Navzkrižna reaktivnost

Panel za navzkrižno reaktivnost

Baterijo bakterij, virusov in plazmidov, ki jih običajno najdemo v ženskem anogenitalnem traktu, ter zbirko kožnotropnih tipov HPV, za katere so bili na voljo kloni, so testirali, da bi ugotovili, ali bi prišlo do navzkrižne reaktivnosti s sondami za HPV, uporabljenimi v testu *digene* HC2 HPV DNA Test. 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, smo testirali pri koncentraciji 4 ng/ml.

Spodaj je seznam testiranih bakterij. Vse bakterije so bile pri testu *digene* HC2 HPV DNA Test negativne.

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

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

Spodaj je seznam testirane virusne ali plazmidne DNK ali človeškega seruma:

Adenovirus 2	Humani papiloma virus tipa 1
Citomegalovirus	Humani papiloma virus tipa 2
Virus Epstein-Barr	Humani papiloma virus tipa 3
Serum, pozitiven na površinski antigen hepatitisa B	Humani papiloma virus tipa 4
Herpes Simplex I	Humani papiloma virus tipa 5
Herpes Simplex II	Humani papiloma virus tipa 8
Virus humane imunске pomanjkljivosti (HIV, RT DNK)	Humani papiloma virus tipa 13
Opičji virus tipa 40 (SV40)	Humani papiloma virus tipa 30
pBR322	

Edini virusi ali plazmidi, ki so pokazali navzkrižno reaktivnost v testu *digene* HC2 HPV DNA Test, so bili HPV tipa 13 in plazmid pBR322. DNK HPV 13 je reagirala samo s sondo za HPV z nizkim tveganjem. HPV 13 se običajno odkrije v lezijah ustnic nekaterih etničnih skupin, vendar ga niso odkrili v anogenitalnem traktu.²⁹ Tako ni pričakovati, da bi navzkrižna reaktivnost, ki so jo opazili med HPV 13 in sondo za HPV z nizkim tveganjem testa *digene* HC2 HPV DNA Test, povzročila klinično nejasen rezultat za anogenitalne vzorce. Navzkrižna reaktivnost med pBR322 in sondami za HPV z nizkim in visokim tveganjem testa *digene* HC2 HPV DNA Test ni nepričakovana, ker je pri izolaciji vložka HPV težko odstraniti celotno vektorsko DNK 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. Vendar pa je 298 kliničnih vzorcev, ki so bili pozitivni s sondami za HPV z nizkim in visokim tveganjem testa *digene* HC2 HPV DNA Test, pokazalo, da pri testiranju s sondo pBR322 ni pozitivnih rezultatov zaradi pBR322. Tako se zdi, da je verjetnost lažno pozitivnega rezultata testa *digene* HC2 HPV DNA Test zaradi homolognih zaporedij pBR322 v kliničnih vzorcih majhna.

Navzkrižna hibridizacija

Vsak od 18 tipov HPV je bil testiran s sondami za HPV z nizkim in visokim tveganjem pri koncentracijah 4 ng/ml HPV DNA. Pričakovano je bilo, da bodo vse tarče HPV pozitivne z ustrezno skupino sond, medtem ko ni bilo pričakovano, da bo noben vzorec pozitiven z nasprotno skupino sond. Ta študija je pokazala, da obstaja majhna količina navzkrižne hibridizacije med tipoma HPV 6 in 42 (tipi HPV z nizkim tveganjem) in skupino sonde z visokim tveganjem (sonda HPV z visokim tveganjem). Vzorci z visokimi vrednostmi (4 ng/ml ali več DNK HPV 6 ali HPV 42) so lahko pozitivni za obe skupini sond. Klinični pomen tega je, da se bolnice s 4 ng/ml ali več DNK HPV 6 ali HPV 42 lahko napotijo na kolposkopijo.

Poleg tega se je izkazalo, da sonda za HPV z visokim tveganjem 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 38. Bolnice, katerih vzorci vsebujejo visoke ravni teh vrst DNK HPV, so lahko nepravilno napotene na kolposkopijo. 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 MM9.³⁹ Čeprav je več teh vrst HPV redkih ali novih vrst, ki se ne pojavljajo pogosto pri hudi bolezni, so lahko bolnice, katerih vzorci vsebujejo visoke ravni teh vrst DNK HPV, nepravilno napotene na kolposkopijo.

Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce STM

Učinek krvi in drugih potencialno motečih opredeljenih ali nedefiniranih snovi je bil ovrednoten s testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Polna kri, tuš, krema proti glivicam in kontracepcijski žele (sredstva, ki jih lahko običajno najdemo v vzorcih materničnega vratu) so bili dodani STM-negativnim in pozitivnim vzorcem (zbirke 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 lahko poročajo o lažno negativnem rezultatu v kliničnih vzorcih z ravnmi DNK HPV, ki so blizu ravni pozitivne mejne vrednosti za analizo (1 pg/ml), če so bile prisotne visoke ravni protiglivične kreme ali kontracepcijskega želeja.

Vendar pa je zelo malo verjetno, da bo klinični vzorec skoraj v celoti sestavljen iz ene od teh snovi, saj se maternični vrat rutinsko očisti pred pridobitvijo vzorcev za bris Pap in za testiranje HPV.

Vpliv krvi in drugih snovi na vzorce PreservCyt Solution

Učinek krvi in drugih potencialno motečih opredeljenih ali nedefiniranih snovi, ki so potencialno prisotne v kliničnih vzorcih PreservCyt Solution, so ocenili s testom *digene* HC2 HPV DNA Test. 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 Solution 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 HPV DNA Test.

Ponovljivost testa *digene* hc2 HPV DNA Test s kliničnimi vzorci, zbranimi v STM

Ponovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test s kliničnimi vzorci, zbranimi v STM, je bila določena v študiji z uporabo 20 kliničnih skupin (10 pozitivnih in 10 negativnih), pripravljenih s kombiniranjem predhodno denaturiranih in testiranih vzorcev cervikalne ščetke, zbranih v STM. Vzorci so bili testirani v ponovitvah po 4 vsakih 5 dni za skupno 20 ponovitev na vzorec. Testiranje je bilo izvedeno z metodo koktajla kombinirane sode. Povprečne vrednosti, standardni odklon in 95-% intervali zaupanja o povprečju (IZ) so bili izračunani za vsak vzorec znotraj dneva in v 5 dneh in so prikazani v Preglednica 17.

Preglednica 17. Povprečni RLU/CO z intervali zaupanja in odstotki pozitivnih (padajoči vrstni red po povprečnem RLU/CO)

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

Za 5 vzorcev s povprečnim RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo (št. 1–5) je bilo 100 od 100 ponovitev (100,0 %) pozitivnih. Za 5 vzorcev s povprečnim RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo analize (št. 6–10) je bilo 60 od 100 (60 %) ponovitev pozitivnih in 40 od 100 (40 %) negativnih. Za 10 vzorcev s povprečnim RLU/CO več kot 20 % pod mejno vrednostjo analize je bilo 200 od 200 ponovitev (100 %) negativnih.

Tako so bili vzorci s povprečnim RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo pozitivni 100 % časa, medtem ko so bili vzorci s povprečno vrednostjo RLU/CO 20 % ali več pod mejno vrednostjo negativni 100 % časa, kar kaže, da se lahko pričakuje, da bodo vzorci, ki so 20 % ali več stran od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da vzorci STM dajejo ponovljive rezultate z uporabo testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

Ponovljivost testa *digene* hc2 HPV DNA Test s kliničnim vzorci, zbranimi v PreservCyt Solution

Ponovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test s kliničnimi vzorci, zbranimi v PreservCyt Solution, je bila določena v študiji z uporabo 24 lažnih vzorcev pri koncentraciji, ki zajema razpon koncentracij 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. Vsakega od 5 dni študije je bil alikvot 8 ml iz vsakega vzorca obdelan in testiran v skladu z navodili za uporabo kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit za uporabo samo s sondo za HPV z visokim tveganjem. Povprečne vrednosti, standardni odkloni in 95-% intervali zaupanja (IZ) so bili izračunani za vsak vzorec v vsakem dnevu ter v vseh 5 dneh in ponovitvah. Povprečni RLU/CO, interval zaupanja o povprečju in odstotek pozitivnih ponovitev so prikazani v Preglednica 18 za vsak vzorec v padajočem vrstnem redu na podlagi povprečnega RLU/CO.

Preglednica 18. Povprečni RLU/CO z intervali zaupanja in odstotki pozitivnih (padajoči vrstni red po povprečnem RLU/CO)

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

Za 6 vzorcev s povprečnim RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo (št. 1–6) je bilo 114 od 120 ponovitev (95,0 %) pozitivnih. Za 7 vzorcev s povprečnim RLU/CO znotraj 20 % nad ali pod mejno vrednostjo analize (št. 7–13) je bilo 88 od 139 (63,3 %) ponovitev pozitivnih in 51 od 139 (36,7 %) negativnih. Pri 4 vzorcih znotraj 10 % nad ali pod mejo (št. 10–13) je bilo 41 od 79 (51,9 %) ponovitev pozitivnih in 38 (48,1 %) negativnih. Za 11 vzorcev s povprečnim RLU/CO več kot 20 % pod mejno vrednostjo analize je bilo 220 od 220 ponovitev (100 %) negativnih.

Tako so bili vzorci s povprečnim RLU/CO 20 % ali več nad mejno vrednostjo pozitivni več kot 95 % časa, medtem ko so bili vzorci s povprečno RLU/CO 20 % ali več pod mejno vrednostjo negativni 100 % časa, kar kaže, da se lahko pričakuje, da bodo vzorci, ki so 20 % ali več stran od mejne vrednosti, dali dosledne rezultate. Vzorci blizu mejne vrednosti so dali približno enako število pozitivnih in negativnih rezultatov. Ti podatki kažejo, da vzorci PreservCyt Solution dajejo ponovljive rezultate z uporabo testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

Ponovljivost testa *digene* hc2 high-risk HPV DNA Test z vzorci, zbranimi v tekočini Surepath Preservative Fluid

Ocene ponovljivosti so bile izvedene za karakterizacijo zmožnosti 3 različnih laboratorijev, da dobijo podoben diagnostični rezultat ob različnih dnevih in z različnimi poteki iz identičnega nabora vzorcev z znanim pozitivnim/negativnim statusom HPV pri uporabi mejne vrednosti analize 1,0 RLU/CO. Panel vzorcev ponovljivosti je sestavljalo 5 HPV-pozitivnih vzorcev, 2 vzorca s koncentracijo DNK HPV blizu mejne vrednosti analize in 5 HPV-negativnih vzorcev.

Člani panela so bili pripravljeni s kombiniranjem edinstvenih vzorcev SurePath bolnic z znanim negativnim in pozitivnim stanjem HPV, da so dobili želene ciljne vrednosti RLU/CO. Vsak član panela je bil testiran v dvojniku, dvakrat vsak dan v obdobju petih dni v vsakem od treh sodelujočih laboratorijev.

Preglednica 19. Študija ponovljivosti vzorcev SurePath – Kvalitativni rezultati članov panela

Član panela	Povprečni RLU/CO	Pričakovan rezultat	n HPV-pozitivnih (%)	n HPV-negativnih (%)
1	0,20	negativen	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativen	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativen	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativen	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativen	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativen	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	pozitiven	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	pozitiven	60 (100)	0 (0)
9	25,65	pozitiven	60 (100)	0 (0)
10	81,52	pozitiven	60 (100)	0 (0)
11	154,18	pozitiven	60 (100)	0 (0)
12	765,29	pozitiven	60 (100)	0 (0)

SurePath zagotavlja ponovljivost pri uporabi sistema Rapid Capture System za obdelavo analize

Ponovljivost rezultatov vzorca SurePath pri uporabi sistema Rapid Capture System za obdelavo analize je bila primerjana z rezultati, pridobljenimi pri uporabi ročne obdelave analize. Izvedena sta bila dva primerjalna testa na ločenih alikvotih istega obdelanega vzorca.

Preglednica 20. Ujemanje rezultatov SurePath med vzorci z RCS (RCS v primerjavi z ročno analizo)

% pozitivnega ujemanja		% negativnega ujemanja	
95 % IZ		95 % IZ	
(n/n)		(n/n)	
Vsi pozitivni	Visoko pozitivna podmnožica (RLU/CO ≥ 2,5)	Vsi negativni	Nizka negativna podmnožica RLU/CO (< 0,80)
99,0	100	97,7	98,7
417/421	375/375	1057/1079	1050/1064
97,6, 99,7	99,0, 100	96,9, 98,7	97,8, 99,28

Omejitve postopka

Za diagnostično uporabo *in vitro*

Za dodatne omejitve postopka, specifične za uporabo tega sistema za testiranje z velikim volumnom vzorcev, glejte Uporabniški priročnik za sistem *Rapid Capture System*.

- *digene* HC2 HPV DNA Test za humane papiloma viruse tipov 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 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 ne izključuje možnosti okužbe s HPV, ker lahko zelo nizke stopnje okužbe ali napaka pri vzorčenju povzročijo lažno negativen rezultat.
- *digene* HC2 HPV DNA Test razlikuje med dvema skupinama tipov HPV: HPV 6/11/42/43/44 in 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Ne bo razlikoval med virusnimi tipi znotraj teh skupin.
- *digene* HC2 HPV DNA Test se lahko uporablja samo z vzorci materničnega vratu, zbranimi z *digene* HC2 DNA Collection Device, ali z biopsijami, zbranimi v STM, ali vzorci materničnega vratu, zbranimi z napravo za zbiranje v obliki metle ali kombinacijo čopiča/lopatice in vstavljeni v raztopino PreservCyt Solution, ali vzorci materničnega vratu, zbrani v SurePath Preservative Fluid. Biopsijske vzorce je dovoljeno testirati le, če so takoj vstavljeni v STM in do analize shranjeni pri temperaturi -20°C .
- Pripomočka *digene* HC2 DNA Collection Device ne smete uporabljati za odvzem vzorcev pri nosečnicah.
- Okužba s HPV ni dokončen pokazatelj prisotnosti bolezni materničnega vratu visoke stopnje, niti ne pomeni, da se bo v vseh primerih razvila bolezen visoke stopnje ali rak.
- Obstaja majhna količina navzkrižne hibridizacije med tipi HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 56, MM4, MM7, MM8 in MM9 ter sondo za HPV z visokim tveganjem. Bolnice, katerih vzorci vsebujejo visoke ravni teh tipov HPV, so lahko nepravilno napotene na kolposkopijo³⁸.

- *digene* HC2 HPV DNA Test je zasnovan za odkrivanje tipov HPV z nizkim in 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 ta analiza zazna te tipe pri ravneh od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml. To je enakovredno značilnostim zaznavanja drugih tipov HPV, ki jih cilja *digene* HC2 HPV DNA Test. Družba QIAGEN je lahko potrdil odkrivanje teh tipov HPV le v omejenem številu kliničnih vzorcev. Zaradi nizke razširjenosti teh tipov v splošni populaciji (kot so pokazali Bosch et. Al³⁶), značilnosti učinkovitosti testa *digene* HC2 HPV DNA Test za zaznavanje tipov HPV 39, 58, 59 in 68 niso bile statistično potrjene.
- Če so v času odvzema vzorca za testiranje na HPV prisotne visoke koncentracije kreme proti glivicam, kontracepcijskega želeja ali tuša, obstaja verjetnost, da dobite lažno negativen rezultat, če ti vzorci vsebujejo ravni DNK HPV, ki dajejo vrednosti RLU/CO blizu mejne vrednosti analize.
- Možna je navzkrižna reaktivnost med sondo *digene* HC2 HPV DNA Test 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.

Reference

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. V: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17–36. S konference 1985 Cancer Cells Conference v Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123–132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. V: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951–968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389–396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784–788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313–324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560–563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212–222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41–45; 1988.

11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671–677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225–229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246–249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187–190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073–3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452–1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925–2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099–3104; 1989.
19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829–2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374–384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328–337; 1992.

22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272–1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. V: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Sehulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762–767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899–901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400–403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytological abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645–651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6–13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363–366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61–65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27–40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419–423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833–836; 1990.

34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158–161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738–744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796–802; 1995.
37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79–88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252–255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.; and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, p. 651–655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. The European Journal of Cancer, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333–341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S–18S.
43. Sehulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.

Navodila za odpravljanje težav

Komentarji in predlogi

Nepravilna sprememba barve ali brez spremembe barve med denaturacijo.

- | | |
|---|---|
| a) Denaturacijski reagent ni pravilno pripravljen | Prepričajte se, da denaturacijski reagent vsebuje indikatorsko barvilo in je temno vijolične barve. |
| b) Denaturacijski reagent ni dodan | Prepričajte se, da ste vzorcu dodali denaturacijski reagent, tako da izmerite volumen vzorca (pričakovano je 1,5 ml). Če volumen kaže, da denaturacijski reagent ni bil dodan, dodajte ustrezen dodatek, premešajte in nadaljujte z analizo, če opazite ustrezno spremembo barve. |
| c) Vzorec vsebuje kri ali druge snovi, ki prikrijejo spremembo barve. | Natančne opisane spremembe barve pri teh vrstah vzorcev ni pričakovati; rezultati testa <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test ne smejo negativno vplivati. |
| d) pH vzorca je lahko neobičajno kisel. | Če ni nobenega od drugih vzrokov, je lahko vzorec nenavadno kisel in pričakovana sprememba barve se ne bo zgodila. Preden nanesete očetno kislino na maternični vrat, odvzemite nov vzorec, saj bo neustrezen pH vzorca negativno vplival na rezultate testa. |

Kontrole kakovosti dajejo napačne rezultate

- | | |
|---|---|
| a) Za test je bil izbran nepravilen protokol programske opreme (tj. uporabljen protokol CPC za dvojno metodo) | Če je protokol programske opreme nepravilen za izvajani test, je treba ploščo ponovno prebrati v 30 minutah po dodatku reagenta za zaznavanje 2 s pravilnim protokolom. |
| b) Obratna postavitev QC1-LR in QC2-HR | Ponovno testirajte vzorce. |
| c) Obratna postavitev LRC in QC1-LR in/ali HRC in QC1-HR | Ponovno testirajte vzorce. |

Med hibridizacijo je opažena napačna sprememba barve.

- | | |
|---|--|
| a) Neustrezno mešanje mešanice sonde z denaturiranimi kalibratorji, kontrolami in/ali vzorci; ali mešanica sonde ni dodana; ali nepravilen volumen dodanega reagenta. | Hibridizacijsko mikroploščo ali stojalo za mikroepruvete stresajte dodatni 2 minuti. Če so vdolbinice še vedno vijolične, dodajte dodatnih 25 µl ustrezne mešanice sonde in dobro premešajte. Če po dodajanju sonde in ponovnem mešanju ne pride do ustrezne spremembe barve in vzorec ne vsebuje krvi ali drugih materialov, ponovno testirajte vzorec. |
| b) Vzorec vsebuje kri ali druge snovi, ki prikrijejo spremembo barve. | Natančne opisane spremembe barve pri teh vrstah vzorcev ni pričakovati; rezultati testa <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test ne smejo negativno vplivati. |
| c) Vzorec je imel < 1000 µl STM. | Preverite količino prvotnega vzorca. Volumen naj bo 1350 µl ±20 µl (po odstranitvi 75 µl za sonde za HPV z nizkim in visokim tveganjem). Če je volumen < 1350 µl, je prvotni vzorec vseboval < 1000 µl STM. Pridobite nov vzorec. |

Komentarji in predlogi

Analiza ne izpolnjuje kriterijev validacije. V kalibratorju, kontrolah kakovosti ali v vzorcih ni bilo opaziti nobenega signala.

- | | |
|---|---|
| a) Redčilo sonde ni bila dodana sonda. | Pripravite mešanice sond, kot je opisano v teh navodilih za uporabo. Previdno označite epruvete. |
| b) Sonda, kontaminirana z RNazo med pripravo | Pri pipetiranju sonde uporabite konice za pipete z aerosolno zaporo in nosite rokavice. Uporabljajte samo čiste, nove posode za reagente za enkratno uporabo. |
| c) Neustrezno mešanje sonde in redčila sonde | Po dodajanju sonde v redčilo Probe Diluent zelo temeljito mešajte z vrtnčenjem pri visoki hitrosti vsaj 5 sekund. Nastati mora viden vrtnec. |
| d) Neustrezno mešanje razredčene sonde in denaturiranega vzorca | Po dodajanju mešanice sonde in vzorca v vsako vdolbinico Hybridization Microplate ali mikroeprevete stresajte na Rotary Shaker I, nastavljenem na 1100 ± 100 vrt./min. za 3 ± 2 minuti. Preverite spremembo barve iz vijolične v rumeno v vsaki vdolbinici epruvete/mikroplošče. |
| 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 Microplate Heater I ali vodna kopel nastavljena na segrevanje vzorcev na pravilno temperaturo in da je pred uporabo predhodno ogrevana 60 minut. Prepričajte se, da je nivo vode zadosten za segrevanje vzorcev na pravilno temperaturo. Vodne kopeli je treba občasno umeriti. |
| f) Preklopne sonde/mešanice sond/hibridizacijske epruvete | Pazljivo pripravite mešanice sonde in ustrezno označite epruvete mešanice sonde. Pazite, da pravilnemu nizu hibridizacijskih epruvet dodate pravilno sondo. Označite epruvete za mešanje sonde, hibridizacijske epruvete in/ali stojala, da zmanjšate možnost zamenjav. |
| g) Neuspešno dodajanje pravilne količine reagenta za zaznavanje 1 ali inkubacija za določen čas | Odpipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 1 v vsako vdolbinico z 8-kanalnim pipetorjem. Inkubirajte 30–45 minut pri temperaturi 20–25 °C. |
| h) Neuspešno dodajanje pravilne količine reagenta za zaznavanje 2 ali inkubacija za določen čas | Odpipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 2 v vsako vdolbinico z 8-kanalnim pipetorjem. Inkubirajte 20–25 °C 15 do 30 minut. |
| i) Okvara luminometra ali nepravilno programiranje | Za nadaljnja navodila glejte ustrezen uporabniški priročnik ali pokličite svojega lokalnega zastopnika družbe QIAGEN. |

Povišane vrednosti RLU v kalibratorju, kontrolah kakovosti in/ali vzorcih (≥ 200 RLU v številnih ali vseh vdolbinicah). Analiza morda ne bo ustrezala kriterijem za validacijo.

- | | |
|---|---|
| a) Denaturacijski reagent ni dodan; ali nepravilen volumen dodanega reagenta; ali neustrezno mešanje denaturacijskega reagenta z vzorci ali kalibratorji. | Pred dodajanjem denaturacijskega reagenta se prepričajte, da ponavljajoči se pipetor pravilno dovaja. Umerjeni pipetorji so bistvenega pomena. V vsako epruveto dodajte polovico volumna denaturacijskega reagenta 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 denaturacijskega reagenta obarvati vijolično. |
|---|---|

Komentarji in predlogi

- | | | |
|----|--|---|
| b) | Puščanje svetlobe v luminometru. Vrata niso zatesnjena. Tesnilo okoli vrat je zlomljeno | Preverite odčitek ozadja luminometra z odčitavanjem prazne mikroplošče. Odčitek, večji od 50 RLU, pomeni, da obstaja puščanje svetlobe. Za nadaljnja navodila glejte ustrezen uporabniški priročnik ali pokličite svojega lokalnega zastopnika družbe QIAGEN. |
| c) | Kontaminacija reagenta za zaznavanje 2 ali vdolbinic mikroplošče za zajemanje z reagentom za zaznavanje 1 ali eksogeno alkalno fosfatazo | Glejte Preverjanje kontaminacije v tem razdelku Odpravljanje težav. |
| d) | Onesnažen pufer za spiranje | Glejte Preverjanje kontaminacije v tem razdelku Odpravljanje težav. |
| e) | Kontaminiran avtomatiziran pralnik plošč | Glejte Preverjanje kontaminacije v tem razdelku Odpravljanje težav. |
| f) | Neustrezno pranje vdolbinic mikroplošče za zajemanje po inkubaciji z reagentom za zaznavanje 1 | Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, pri čemer vdolbinice vsakič napolnite do preliva ali uporabite avtomatiziran pralnik plošč. V vdolbinicah po spiranju ne sme biti vidnih ostankov rožnate tekočine. Za navodila o testiranju kontaminacije ali okvar glejte uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč. |
| g) | Kontaminacija reagenta za zaznavanje 1 v vdolbinicah mikroplošče | Prepričajte se, da so vse delovne površine čiste in suhe. Pri uporabi reagenta za zaznavanje 1 bodite previdni. Izogibajte se aerosolom. |
| h) | Hibridizacijska raztopina za pivnanje na nekaterih delih Kimtowels Wipers ali enakovrednih papirnatih brisač, ki ne puščajo vlaken | Ne nanašajte ponovno na predhodno uporabljene brisače Kimtowels Wipers ali enakovredne površine papirnatih brisač, ki ne puščajo vlaken. |
| i) | Uporabljene nepravilne brisače za pivnanje | Za pivnanje uporabite Kimtowels Wipers ali enakovredne papirnat brisače, ki ne puščajo vlaken. |

Nizka razmerja PC/NC ali veliko število nizko pozitivnih vzorcev z razmerji <2,0 (>20 %). Analiza morda ne bo ustrezala kriterijem za validacijo.

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Neustrezna priprava vzorca. | Dodajte ustrezen volumen denaturacijskega reagenta in temeljito premešajte z vrtinčenjem. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, poskrbite, da tekočina opere celotno notranjo površino epruvete. Pri vzorcih PreservCyt Solution se prepričajte, da je pravilno mešanje in resuspendiranje celičnega peleta končano pred denaturacijsko inkubacijo. Za podrobnosti o protokolu glejte navodila za uporabo kompleta digene HC2 Sample Conversion Kit. Videti morate izrazito spremembo barve od prozorne do temno vijolične. Inkubirajte 45 ± 5 minut pri temperaturi 65 ± 2 °C. |
| b) | Sonda je neustrezno premešana ali pa je v analize dodana nezadostna sonda | Pripravite mešanice sond, kot je opisano. Temeljito premešajte z vrtinčenjem, da zagotovite vidno vrtinčenje. Mešanice sonde je treba dodati v epruvete s pipetorjem s pozitivnim izpodrivom ali večkanalnim pipetorjem, da zagotovite natančno dovajanje. |

Komentarji in predlogi

- | | | |
|----|---|--|
| c) | V vsako hibridizacijsko mikroeppraveto je dodan neustrezen volumen razredčene sonde | Prepričajte se, da 8-kanalni pipetor pravilno dovaja, preden mešanico sonde dodate na hibridizacijsko mikroploščo ali mikroeppraveto. Dodajte 25 µl mešanice sonde v vsako vdolbinico mikroplošče ali mikroeppraveto, ki vsebuje denaturirane kalibratorje, kontrole kakovosti in klinične vzorce. Prepričajte se, da 8-kanalni pipetor pravilno dovaja, preden dodate mešanico sonde v vdolbinice mikroplošče Hybridization Microplate. Po dodajanju in temeljitnem mešanju mešanice sonde se mora barva spremeniti iz temno vijolične v rumeno. Vzorci PreservCyt Solution bi morali postati rožnati namesto rumeni. |
| d) | Izguba aktivnosti reagenta za zaznavanje 1 | Reagent za zaznavanje 1 shranjujte pri temperaturi od 2 do 8 °C. Porabite pred datumom izteka roka uporabnosti, navedenim na zunanji škatlji kompleta. |
| e) | Nezadosten odvzem | Korak odvzema je treba izvesti z 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, pri čemer vdolbinice vsakič napolnite do preliva ali uporabite avtomatiziran pralnik plošč. |
| g) | Onesnažen pufer za spiranje | Glejte Preverjanje kontaminacije v tem razdelku Odpravljanje težav. |

Serie pozitivnih vzorcev s približno enakimi vrednostmi RLU.

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Kontaminacija vdolbinic mikroplošče za zajemanje med manipulacijo analize. | Med vsemi inkubacijami pokrijte mikroploščo za zajemanje. Med izvajanjem analize se izogibajte izpostavljanju epruvet kontaminaciji z aerosoli. Med manipulacijami nosite rokavice brez pudra. |
| b) | Kontaminacija reagenta za zaznavanje 2 | Pri pipetiranju reagenta za zaznavanje 2 v vdolbinice mikroplošče za zajemanje bodite previdni, da ne kontaminirate surovine. Izogibajte se kontaminaciji reagenta za zaznavanje 2 z aerosoli iz reagenta za zaznavanje 1 ali iz laboratorijskega prahu itd. |
| c) | Okvara avtomatiziranega pralnika plošč | Glejte Preverjanje kontaminacije v tem razdelku Odpravljanje težav ali si oglejte <i>uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč</i> za navodila o testiranju za kontaminacije ali okvare. |

Širok % CV med ponovitvami.

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Nepravilno pipetiranje. | Preverite pipetor in se prepričajte, da se dovajajo ponovljivi volumni. Redno umerjajte pipetorje. |
| b) | Nezadostno mešanje | V vseh korakih temeljito premešajte. Pred denaturacijsko inkubacijo in po dodajanju mešanice sonde premešajte. Prepričajte se, da nastane viden vrtinec. |
| c) | Nepopoln prenos tekočine iz hibridizacijskih mikroeppravet v vdolbinice mikroplošče za zajemanje | Bodite previdni med korakom prenosa iz vdolbinic Hybridization Microplate ali mikroeppravet v vdolbinice mikroplošče za zajemanje, da zagotovite prenos ponovljivih volumnov. |

Komentarji in predlogi

- | | |
|---|---|
| d) Neustrezni pogoji pranja | Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, vsakič napolnite do preliva ali uporabite avtomatski pralnik plošč in ustrezne protokole za avtomatski pralnik plošč. |
| e) Kontaminacija reagenta za zaznavanje 1 v vdolbinicah mikroplošče | Prepričajte se, da so vse delovne površine čiste in suhe. Pri uporabi reagenta za zaznavanje 1 bodite previdni. Izogibajte se aerosolom. |

Lažno pozitivni rezultati, pridobljeni iz znanih negativnih vzorcev.

- | | |
|---|--|
| a) Kontaminiran reagent za zaznavanje 2. | Pazite, da ne pride do navzkrižne kontaminacije vzorcev, ko alikvotirate reagent za zaznavanje 2 med vzorci. Če uporabljate le del kompleta, pred polnjenjem pipetorja alikvotirajte volumen, potreben za to analizo, v čisto posodo za reagent za enkratno uporabo. |
| b) Kontaminacija reagenta za zaznavanje 1 v vdolbinicah mikroplošče | Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, pri čemer jih vsakič napolnite do preliva ali uporabite avtomatiziran pralnik plošč. V vdolbinicah mikroplošče po spiranju ne sme biti vidnih ostankov rožnate tekočine. |
| c) Pivnanje na isti površini brisač Kimtowels ali enakovrednih papirnatih brisač z malo vlaken v več vrstah | Ne pivnajte po predelih, ki ste jih že uporabljali, ker lahko pride do kontaminacije. |
| d) Neustrezna priprava vzorca | Dodajte ustrezen volumen denaturacijskega reagenta in temeljito premešajte z vrtinčenjem. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, zagotovite, da tekočina spere celotno notranjo površino epruvete z ročno metodo ali metodo MST Vortexer 2 (pri metodi ročnega vrtinca epruveto enkrat obrnite). Pri vzorcih PreservCyt Solution se prepričajte, da je pravilno mešanje in resuspendiranje celičnega peleta končano pred denaturacijsko inkubacijo. Za podrobnosti o protokolu glejte navodila za uporabo kompleta <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit. Pri vseh vzorcih je treba opaziti izrazito spremembo barve v temno vijolično. Inkubirajte 45 ± 5 minut pri 65 ± 2 °C. Pri vzorcih SurePath se prepričajte, da so vzorci inkubirani 90 ± 5 minut pri 65 ± 2 °C. |
| e) Neustrezni pogoji pranja | Vdolbinice mikroplošče 6-krat temeljito sperite s pufrom za spiranje, pri čemer vdolbinice vsakič napolnite do preliva ali uporabite avtomatski pralnik plošč in ustrezne protokole avtomatskega pralnika plošč. |
| f) Kontaminacija konice pipete z nedenaturiranim materialom med prenosom denaturiranega vzorca v mikroepreveto ali mikroploščo, ki se uporablja za hibridizacijo sonde za HPV | 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 uporabi vzorcev PreservCyt Solution ali SurePath Preservative Fluid so ti hibridi verjetno prisotni na notranjih stenah epruvete za denaturacijo vzorca. Da bi preprečili morebiten prenos tega nedenaturiranega celičnega materiala, se konica mikropipete ne sme dotikati stranic epruvete za denaturacijo vzorca med prenosom denaturiranega vzorca v mikroepreveto ali mikroploščo, ki se uporablja za hibridizacijo sonde za HPV. |

Komentarji in predlogi

Povišane vrednosti RLU negativnega kalibratorja (> 200 RLU). Preostanek analize deluje po pričakovanjih.

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Reagent za zaznavanje 2 je bil inkubiran pri temperaturi nad 20–25 °C. | Znova zaženite test in se prepričajte, da sta koraka odvzema in zaznavanja inkubirana pri temperaturi 20–25 °C. |
| b) | Reagent za zaznavanje 2 je bil inkubiran dlje kot 30 minut | Odčitajte ploščo po 15 minutah inkubacije (in najkasneje 30 minutah inkubacije) pri temperaturi 20–25 °C. |
| c) | Reagent za zaznavanje 2 ali pufer za spiranje je bil kontaminiran z alkalno fosfatazo ali reagentom za zaznavanje 1 | Glejte Preverjanje kontaminacije v tem razdelku Odpravljanje težav. |

Analiza ne izpolnjuje kriterijev validacije. Povišano razmerje PC/NC

Obratna postavitev HRC in QC2-HR in/ali LRC in QC1-LR	Znova zaženite test in se prepričajte, da sta koraka odvzema in zaznavanja inkubirana pri temperaturi 20–25 °C.
---	---

Preverjanje kontaminacije

Ocenjen reagent	Postopek preverjanja kontaminacije	Interpretacija rezultatov
Opomba: Pri pipetiranju reagenta za zaznavanje 2 bodite previdni, da preprečite kontaminacijo. Nosite rokavice in se izogibajte dotikanju konic za pipete na vseh delovnih površinah.		
Detection Reagent 2 (Reagent za zaznavanje 2)	1. S pipeto odmerite 75 µl alikvotov, preostale in/ali originalne vial reagenta za zaznavanje 2 v slepo vdolbinico mikroplošče za zajemanje. 2. Inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi. 3. Odčitajte v vdolbinicah mikroplošče v luminometru. Opomba: Testiranje reagenta za zaznavanje 2 v ponovitvah 3 zagotavlja optimalno oceno učinkovitosti.	• Kontrola reagenta za zaznavanje 2 mora biti < 50 RLU. • Če so vrednosti reagenta za zaznavanje 2 < 50 RLU, se lahko za ponovitev analize uporabi reagent za zaznavanje 2. • Če je kontaminiran (> 50 RLU), pridobite nov komplet in ponovite analizo.
Naprava za pufer za spiranje in/ali vodni vir	1. Odpipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 2 v 4 ločene vdolbinice mikroplošče za zajemanje. 2. Označite vdolbinice 1–4. 3. Vdolbinica 1 služi kot kontrola reagenta za zaznavanje 2. 4. Odpipetirajte 10 µl pufra za spiranje iz stekleničke za spiranje v vdolbinico 2. 5. Dovolite, da pufer za spiranje teče skozi cev za spiranje. 6. Odpipetirajte 10 µl pufra za spiranje iz cevi v vdolbinico 3. 7. Pridobite alikvot vode, uporabljene za pripravo pufra za spiranje. Odpipetirajte 10 µl vode v vdolbinico 4. 8. Inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi. Odčitajte vdolbinice mikroplošče v luminometru.	• Kontrola reagenta za zaznavanje 2 (vdolbinica 1) mora biti < 50 RLU. • Primerjajte vrednost RLU iz vdolbinic 2, 3 in 4 z vrednostjo kontrolne RLU reagenta za zaznavanje 2 (vdolbinica 1). Posamezne vrednosti RLU za vdolbinice 2, 3 in 4 ne smejo preseči 50 RLU vrednosti kontrolne RLU reagenta za zaznavanje 2 (vdolbinica 1). Vrednosti, ki presegajo 50 RLU kontrole reagenta za zaznavanje 2, kažejo na kontaminacijo. Za navodila o čiščenju in vzdrževanju pralnega aparata glejte Priprava in shranjevanje reagenta.

Ocenjen reagent	Postopek preverjanja kontaminacije	Interpretacija rezultatov
Avtomatiziran pralnik plošč	- Odpipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 2 v 5 ločenih vdolbinic mikroplošče za zajemanje. - Označite vdolbinice 1–5. - Vdolbinica 1 služi kot kontrola reagenta za zaznavanje 2. - Odpipetirajte 10 µl pufra za spiranje iz stekleničke pralnika plošč, označene z »Wash« (Pranje) v vdolbinico 2. - Odpipetirajte 10 µl tekočine za spiranje iz stekleničke pralnika plošč, označene z »Rinse« (Spiranje), v vdolbinico 3. - Pritisnite tipko Prime (Napolni) na tipkovnici pralnika plošč, da omogočite pretok pufra za spiranje skozi napeljave. - Odpipetirajte 10 µl pufra za spiranje iz korita v vdolbinico 4. - Izpustite gumb Rinse (Spiranje) na tipkovnici pralnika plošč, da tekočina za spiranje začne teči skozi napeljave. - Odpipetirajte 10 µl pufra za spiranje iz korita v vdolbinico 5. - Pokrijte in inkubirajte 15 minut pri temperaturi 20–25 °C. Izogibajte se neposredni sončni svetlobi. Odčitajte vdolbinice mikroplošče v luminometru.	- Kontrola reagenta za zaznavanje 2 (vdolbinica 1) mora biti < 50 RLU. - Primerjajte vrednost RLU iz vdolbinic 2, 3, 4 in 5 z vrednostjo kontrolne RLU reagenta za zaznavanje 2 (vdolbinica 1). Posamezne vrednosti RLU za vdolbinice 2, 3, 4 in 5 ne smejo preseči 50 RLU vrednosti kontrolne RLU reagenta za zaznavanje 2 (vdolbinica 1). - Vrednosti, ki presegajo 50 RLU kontrole DR2, kažejo na kontaminacijo pralnika plošč. Glejte <i>Uporabniški priročnik za avtomatiziran pralnik plošč</i>, postopek dekontaminacije.

Povzetek za *digene* HC2 HPV DNA Test

POMEMBNO: Pred uporabo tega povzetka je pomembno, da se natančno seznanimate s podrobnim postopkom.

	Postopek	
	Ročna metoda vrtnčenja	Metoda z Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
DENATURACIJA (Za vzorce PreservCyt Solution glejte navodila za uporabo kompleta <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit)	Označite hibridizacijske mikroeprovete. Pripravite denaturacijski reagent. ↓ Odpipetirajte denaturacijski reagent (volumen je enak polovici volumna vzorca) v kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce. Vsak vzorec, kalibrator in kontrolo kakovosti posamično vrtnčite 5 sekund pri visoki hitrosti (za podrobnosti glejte ta navodila za uporabo). Preverite, ali so vse epruvete vijolične barve. ↓ Inkubirajte pri 65 ±2 °C 45 ±5 minut. ↓ Pripravite mešanico sonde za HPV. ↓	Označite hibridizacijsko ploščo. Pripravite denaturacijski reagent. ↓ Odpipetirajte denaturacijski reagent (volumen je enak polovici volumna vzorca) v kalibratorje, kontrole kakovosti in vzorce. Preverite, ali so vse epruvete vijolične barve. ↓ Pokrijte stojalo s folijo in pokrovom. ↓ Vrtnčite 10 sekund. ↓ Inkubirajte pri 65 ±2 °C 45 ±5 minut. ↓ Pripravite mešanico sonde za HPV ↓
HIBRIDIZACIJA Metoda koktajla kombinirane sonde	Metoda vodne kopeli Denaturiran vzorec dobro premešajte in odpipetirajte 75 µl v epruvete. ↓ Inkubirajte 10 minut pri temperaturi 20–25 °C ↓	Metoda z Microplate Heater I Denaturiran vzorec dobro premešajte in s pipeto odmerite 75 µl v vdolbinice mikroplošče. ↓ Inkubirajte 10 minut pri temperaturi 20–25 °C ↓
Metoda dvojne sonde		
ZAJEM HIBRIDOV	Prenesite vsebino iz vsake vdolbinice hibridizacijske plošče ali mikroeprovete v ustrezno vdolbinico v mikroplošči za zajemanje z uporabo 8-kanalnega pipetorja. Pokrijte s pokrovom plošče ali tesnilom za plošče. Stresajte pri 1100 ±100 obratih na minuto pri 20–25 °C 60 ±5 minut. Pripravite pufer za spiranje. ↓ Dekantirajte in popivnajte mikroploščo za zajemanje (za podrobnosti glejte ta navodila za uporabo). ↓	
ZAZNAVANJE HIBRIDOV	Odpipetirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 1 v vsako vdolbinico mikroplošče za zajemanje. Pokrijte mikroploščo za zajemanje s pokrovom plošče, parafilmom ali podobnim. Inkubirajte 30–45 minut pri temperaturi 20–25 °C. Operite ploščo z zeleno metodo. ↓	

Postopek		
	Ročna metoda vrtnčenja	Metoda z Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
PRANJE	Ročna metoda spiranja Dekantirajte in popivajte mikroploščo za zajemanje (za podrobnosti glejte ta navodila za uporabo). ↓ Operite 6-krat. ↓ Popivajte s papirnatimi brisačami, ki ne puščajo vlaken ↓	Metoda avtomatiziranega pralnika plošč Ploščo postavite na pralnik in za začetek pritisnite »START/STOP« (ZAGON/ZAUSTAVITEV). ↓ Pojdite na naslednji korak. ↓ ↓ ↓ ↓
POMNOŽEVANJE SIGNALA	OdpiPETirajte 75 µl reagenta za zaznavanje 2 v vsako vdolbinico mikroplošče za zajemanje. Inkubirajte 15–30 minut pri temperaturi 20–25 °C. ↓	
ODČITAVANJE	Odčitajte mikroploščo za zajemanje na instrumentu DML. ↓ Potrdite analizo in interpretirajte rezultate vzorca.	

Razlaga simbolov



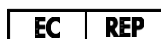
Uporabno do



Koda serije



Proizvajalec



Evropski pooblaščen zastopnik



Kataloška številka



In vitro diagnostični medicinski pripomoček



Simbol z oznako CE-IVD



Globalna trgovinska identifikacijska številka



Vsebuje dovolj za 96 testov



Omejitev temperature



Glejte navodila za uporabo

Informacije za naročanje

Izdelek	Vsebina	Kat. št.
<i>digene</i> ® HC2 HPV DNA Test	Za 96 reakcij	5196-1330
<i>digene</i> ® HC2 DNA Collection Device	50 vzorčevalnikov materničnega vratu	Glejte QIAGEN.com
<i>digene</i> ® Sample Conversion Kit	Komponente za pretvorbo, potrebne za obdelavo PreservCyt	Glejte QIAGEN.com
<i>digene</i> ® Specimen Transport Medium	1 × 30 ml	Glejte QIAGEN.com
<i>digene</i> ® Wash Buffer Concentrate	2 × 100 ml	Glejte QIAGEN.com

Posodobljene informacije o licenciranju in zavrnitve odgovornosti za izdelek so na voljo v priročniku ali navodilih za uporabo zadevnega kompleta znamke QIAGEN. Priročniki in navodila za uporabo kompletov znamke QIAGEN so na voljo na spletni strani www.qiagen.com, lahko pa jih tudi naročite pri oddelku za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnem distributerju.

Zgodovina revizij dokumenta

Rev. 8 02/2019

Nove informacije GHS v Opozorilih in previdnostnih ukrepih na straneh 16–17. Lahko uporablja biopsije materničnega vratu do 5 mm v prerezu na strani 24. Dodani novi simboli na 108. Dodani podatki za naročanje na strani 110. Spremenjen razdelek o blagovnih znamkah za odstranitve patentov na strani 111.

Omejena licenčna pogodba za *navodila za uporabo digene® HC2 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 priloženi izdelku, in s to knjižico ter skupaj s sestavnimi deli v kompletu. Družba QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo ali vključitev priloženih sestavnih delov tega kompleta s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu kompletu, kot je opisano v protokolih, ki so priloženi izdelku, temu priročniku in dodatnimi protokoli, ki so na voljo na www.qiagen.com. Nekatere od teh dodatnih protokolov so zagotovili uporabniki QIAGEN za uporabnike QIAGEN. Družba QIAGEN teh protokolov ni temeljito testirala ali optimizirala. Družba QIAGEN ne ponuja garancije ali jamstva, da ti ne kršijo pravic drugih strank.
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 ponovno uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej.
4. Družba QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik tega kompleta se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katero od zgoraj prepovedanih dejanj. 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.

Blagovne znamke: QIAGEN®, Sample to Insight®, *digene®*, Hybrid Capture®, QIASymphony®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CDP-Star® (Life Technologies Corporation); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kintowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); pGEM® (Promega Corp); PrepMate®, PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyte®, 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. © 2019 QIAGEN. Vse pravice pridržane.

