

Upute za uporabu za *digene*[®] HC2 HPV DNA Test



In vitro ispitivanje za hibridizaciju nukleinskih kiselina s amplifikacijom signala primjenom kemiluminiscencije mikrotitar pločica za kvalitativno otkrivanje DNK 18 niskorizičnih i visokorizičnih tipova humanog papilomavirusa (HPV) u cervikalnim ispitcima

Za uporabu uz:

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



5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
SAD



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
NJEMAČKA
L2126en Rev. 6



SADRŽAJ

NAZIV I PREDVIĐENA UPORABA	1
SAŽETAK I OBJAŠNJENJE	2
NAČELO POSTUPKA	3
REAGENSI I ISPORUČENI MATERIJALI	4
MATERIJALI KOJI SU POTREBNI, ALI NISU ISPORUČENI	5
UPOZORENJA I MJERE OPREZA	6
SIGURNOSNE MJERE OPREZA.....	6
MJERE OPREZA ZA RUKOVANJE	8
PRIPREMA I ČUVANJE REAGENSA	9
UZIMANJE ISPITAKA I RUKOVANJE	12
CERVIKALNI ISPITCI U STM.....	12
CERVIKALNI BIOPTATI.....	12
CERVIKALNI ISPITCI U OTOPINI PRESERVCYT SOLUTION	12
CERVIKALNI ISPITCI U TEKUĆINI SUREPATH PRESERVATIVE FLUID	13
POSTUPAK TESTA	14
TESTIRANJE S VELIKIM PROTOKOM UZORAKA S POMOĆU SUSTAVA RAPID CAPTURE SYSTEM	14
RUČNA METODA	14
DENATURACIJA	16
VRTLOŽNO MIJEŠANJE I DENATURACIJA.....	20
HIBRIDIZACIJA: METODE S KOKTELOM KOMBINIRANIH PROBA (COMBINED-PROBE COCKTAIL, CPC) I DVIJE PROBE.....	23
HVATANJE HIBRIDA	25
OTKRIVANJE HIBRIDA	26
PRANJE	26
AMPLIFIKACIJA SIGNALA	28
KRITERIJI PROVJERE KALIBRACIJE ISPITIVANJA	29
IZRAČUN GRANIČNE VRIJEDNOSTI	32
KONTROLA KVALITETE	33
TUMAČENJE REZULTATA ISPITAKA	34
RADNE ZNAČAJKE	35
PODACI KOJI PODRŽAVAJU INDIKACIJU ZA TESTIRANJE NA NISKORIZIČNI I VISOKORIZIČNI TIP HPV-A.....	35
PODACI KOJI PODRŽAVAJU INDIKACIJU ZA PRIMARNI PROBIR ZA VISOKORIZIČNI HPV.....	39
ANALITIČKA OSJETLJIVOST.....	42
RADNE ZNAČAJKE KOKTELA KOMBINIRANIH PROBA (COMBINED-PROBE COCKTAIL, CPC)	43
EKVIVALENCIJA IZMEĐU ISPITAKA U MEDIJU STM I ISPITAKA U OTOPINI PRESERVCYT SOLUTION	43
KORELACIJA REZULTATA ZA ISPITKE U TEKUĆINI SUREPATH I ISPITKE U MEDIJU STM U KLINIČKOJ POPULACIJI.....	44
OBNOVLJIVOST	44
KRIŽNA REAKTIVNOST	46
PANEL ZA UTVRĐIVANJE KRIŽNE REAKTIVNOSTI.....	46
KRIŽNA HIBRIDIZACIJA.....	47
UČINAK KRV I DRUGIH TVARI NA ISPITKE U MEDIJU STM	47
UČINAK KRV I DRUGIH TVARI NA ISPITKE U OTOPINI PRESERVCYT SOLUTION.....	47

OBNOVLJIVOST TESTA <i>digene</i> HC2 HPV DNA TEST S KLINIČKIM ISPITCIMA PRIKUPLJENIMA U STM	47
OBNOVLJIVOST TESTA <i>digene</i> HC2 HPV DNA TEST S KLINIČKIM ISPITCIMA PRIKUPLJENIMA U OTOPINU PRESERVCYT SOLUTION.....	48
OBNOVLJIVOST TESTA <i>digene</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA TEST S ISPITCIMA PRIKUPLJENIMA U TEKUĆINU SUREPATH PRESERVATIVE FLUID	49
OBNOVLJIVOST REZULTATA ISPITAKA U TEKUĆINI SUREPATH KADA SE ZA OBRADU ISPITIVANJA UPOTREBLJAVA RAPID CAPTURE SYSTEM.....	50
OGRANIČENJA POSTUPKA.....	51
LITERATURA	52
VODIČ ZA RJEŠAVANJE PROBLEMA.....	55
PROVJERA KONTAMINACIJE	59
PODACI ZA KONTAKT TVRTKE QIAGEN	61

NAZIV I PREDVIĐENA UPORABA

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

digene HC2 HPV DNA Test s tehnologijom Hybrid Capture® 2 (HC2) ispitivanje je za hibridizaciju nukleinskih kiselina s amplifikacijom signala primjenom kemiluminiscencije mikrotitar pločica za kvalitativno otkrivanje DNK 18 niskorizičnih i visokorizičnih tipova HPV-a u cervikalnim ispitcima.

Cervikalni ispitci koji se mogu ispitivati testom *digene* HC2 HPV DNA Test uključuju sljedeće:

- Ispitci prikupljeni s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device.
- Ispitci prikupljeni priborom za prikupljanje nalik metlici ili kombinacijom četkice/špatule i stavljeni u otopinu PreservCyt Solution (pogledajte upute za uporabu kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit za sve pojedinosti).
- Ispitci prikupljeni u tekućinu SurePath Preservative Fluid (SAMO za testiranje DNK visokorizičnog HPV-a).
- Biopati prikupljeni u *digene* Specimen Transport Medium (STM).

Kada upotrebljavate probe za niskorizične tipove HPV-a i visokorizične tipove HPV-a, ovaj test indiciran je za sljedeće:

- Kao pomoć u dijagnostici spolno prenosivih infekcija tipovima HPV-a HPV-a 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.
- Za razlikovanje između dviju skupna DNK HPV-a: niskorizičnih tipova HPV-a 6, 11, 42, 43, i 44 te visokorizičnih tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68; međutim, ne može se odrediti specifični tip HPV-a.

Kada upotrebljavate probu za visokorizične tipove HPV-a, ovaj test indiciran je za sljedeće:

- Za otkrivanje visokorizičnih tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 za koje se pokazalo da su primarni uzročni čimbenik u razvoju raka vrata maternice.
- Kao inicijalni test probira opće populacije za uporabu u kombinaciji s papa testom ili bez njega, kako bi se otkrile žene s povećanim rizikom od razvoja raka vrata maternice ili prisutnost bolesti vrata maternice visokog stupnja. Dijagnoza HPV-a sve češće ukazuje na bolest vrata maternice kako se povećava dob pacijenata.
- Kao kontrolni test za pacijente nakon neurednih rezultata papa testa ili preboljene bolesti vrata maternice radi utvrđivanja potrebe za upućivanje na kolposkopiju ili druge kontrolne zahvate.
- Kao kontrolni test za pacijente čiji su rezultati papa testa prije kolposkopije ukazivali na skvamoznu intraepitelnu neoplaziju niskog stupnja (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) ili skvamoznu intraepitelnu neoplaziju visokog stupnja (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL). U tih će pacijenata rezultat testa *digene* HC2 HPV DNA Test služiti liječniku kao pomoć u liječenju pacijenta, pomažući u procjeni rizika žena kako bi se utvrdila odsutnost bolesti visokog stupnja.

digene HC2 HPV DNA Test treba se upotrebljavati zajedno s kliničkim informacijama dobivenim iz drugih dijagnostičkih testova i testova probira, sistematskih pregleda i cjelokupne povijesti bolesti u skladu s odgovarajućim postupcima zbrinjavanja pacijenta. Rezultati testa *digene* HC2 HPV DNA Test **ne smiju** se upotrebljavati kao isključiva osnova za kliničku procjenu i liječenje pacijenata.

SAŽETAK I OBJAŠNENJE

Prisutnost određenih tipova HPV-a u ženskom genitalnom traktu povezuje se s nizom bolesti, uključujući kondilom, bowenoidnu papulozu, cervikalnu, vaginalnu i vulvarnu intraepitelnu neoplaziju i karcinom.¹⁻³ Općenito je prihvaćeno da se ti virusi uglavnom prenose spolnim putem i da su visokorizični tipovi HPV-a glavni prepoznati faktor rizika za razvoj raka vrata maternice.⁴⁻⁸

Humani papilomavirusi sastoje se od čestice ikozahedralnog virusa (viriona) koji sadržava dvolančanu kružnu molekulu DNK s 8000 baznih parova okruženu proteinskom kapsidom. Nakon infekcije epitelnih stanica virusni DNK uspostavlja se cijelom debljinom epitela, ali netaknuti virioni mogu se pronaći samo u gornjim slojevima tkiva. Stoga je virusni DNK moguće pronaći u virionima ili kao episomalne ili integrirane sekvence HPV-a, ovisno o tipu i stupnju lezije.

HPV još nije moguće uzgojiti in vitro, a imunološki testovi nisu prikladni za utvrđivanje prisutnosti cervikalne infekcije HPV-om. Neizravni dokazi anogenitalne infekcije HPV-om mogu se dobiti sistematskim pregledom i otkrivanjem prisutnosti karakterističnih staničnih promjena povezanih s replikacijom virusa na papa testu ili biopstatima. Kao alternativa, biopsije se mogu analizirati hibridizacijom nukleinskih kiselina kako bi se izravno otkrila prisutnost DNK HPV-a.

U prošlosti se HPV tipove 16 i 18 smatralo visokorizičnim tipovima HPV-a i povezivalo ih se s rakom, a HPV tipove 6 i 11 smatralo se niskorizičnim tipovima HPV-a.⁸⁻¹⁰ Kasnije se pokazalo da HPV tipovi 31, 33 i 35 imaju srednju povezanost s rakom.^{2,11-14} Unatoč ovom korisnom konceptualnom okviru, tih 7 tipova HPV-a sačinjava samo oko 70 % cervikalnih neoplazmi.⁹⁻¹¹ Dodatni tipovi HPV-a, uključujući tipove 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68, identificirani su kao glavni tipovi HPV-a koje je moguće otkriti u preostalim lezijama^{15-20,32-36}. Ti se tipovi HPV-a također mogu kategorizirati u skupine niskog, srednjeg i visokog rizika na temelju njihove relativne distribucije u različitim kategorijama histopatoloških dijagnoza.^{21, 32-37}

Pokazalo se da je DNK HPV-a prisutan u približno 10 % žena s normalnim cervikalnim epitelom, ali na stvarnu prevalenciju u specifičnim skupinama žena iznimno utječu dob i druge demografske varijable.^{2,10,21,31} Prospektivna ispitivanja pokazala su da su se u 15 – 28 % žena pozitivnih na DNK HPV-a unutar 2 godine razvile skvamozne intraepitelne neoplazije (SIL) u usporedbi sa svega 1 – 3 % žena negativnih na DNK HPV-a.^{22,23} Točnije, rizik od progresije za tipove HPV-a 16 i 18 bio je veći (približno 40 %) nego za druge tipove HPV-a.²²

NAČELO POSTUPKA

Test *digene* HC2 HPV DNA Test s tehnologijom HC2 ispitivanje je s hvatanjem protutijela koje se temelji na pojačanju signala i hibridizaciji, u kojem se rabi otkrivanje kemiluminiscencijom mikrotitar pločica. Ispitci koji sadržavaju ciljni DNK hibridiziraju se s pomoću specifičnih RNK proba za HPV. Rezultirajući RNK/DNK hibridi hvataju se na površinu jažice mikrotitar pločice obložene protutijelima specifičnima za RNK/DNK hibride. Imobilizirani hibridi zatim reagiraju s protutijelima konjugiranim s alkalnom fosfatazom specifičnima za RNK/DNK hibride te ih se otkriva s pomoću kemiluminiscentnog supstrata. Nekoliko molekula alkalne fosfataze konjugira se na svako protutijelo. Više konjugiranih protutijela veže se na svaki uhvaćeni hibrid, što rezultira znatnom amplifikacijom signala. Kako vezana alkalna fosfataza cijepa supstrat, emitira se svjetlost koja se mjeri kao relativne svjetlosne jedinice (Relative Light Units, RLUs) na luminometru. Intenzitet emitirane svjetlosti označuje prisutnost ili odsutnost ciljnog DNK u ispitku.

Mjerenje RLU-a jednako ili veće od granične vrijednosti naznačuje prisutnost sekvenci DNK HPV-a u ispitku. Mjerenje RLU-a niže od granične vrijednosti ispitivanja naznačuje odsutnost testiranih specifičnih sekvenci DNK HPV-a ili razine DNK HPV-a ispod granice detekcije ispitivanja.

Testiranje s velikim protokom uzoraka s pomoću testa *digene* HC2 HPV DNA Test može se provesti s pomoću sustava Rapid Capture® System (RCS). Ovaj instrument obrađuje do 352 ispitka u osam sati. Kako bi se omogućilo testiranje s velikim protokom uzoraka, svi koraci postupka ispitivanja provode se na sustavu RCS, osim denaturacije ispitka, otkrivanja kemiluminiscentnog signala i izvještavanja o rezultatu.

REAGENSI I ISPORUČENI MATERIJALI

U jednom kompletu *digene* HC2 HPV DNA Test nalazi se 96 testova (kat. br. 5196-1330). Broj rezultata pacijenata varirat će ovisno o broju uporaba po kompletu:

1 uporaba = 40 rezultata pacijenta (niskorizični i visokorizični)

2 uporabe = 32 rezultata pacijenta (niskorizični i visokorizični)

- | | |
|-------------|--|
| 1 x 0,35 ml | Indikatorska boja
Sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 50 ml | Denaturacijski reagens
Razrijeđena otopina natrijeva hidroksida (NaOH). |
| 1 x 5 ml | Diluens za probe
Puferirana otopina s 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 150 µl | Proba za niskorizične tipove HPV-a
RNK proba za tipove HPV-a 6/11/42/43/44 u puferiranoj otopini (zeleni čep). |
| 1 x 100 µl | Proba za visokorizične tipove HPV-a
RNK proba za tipove HPV-a 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 u puferiranoj otopini (crveni čep). |
| 1 x 1 ml | Kontrola kvalitete za niskorizične tipove HPV-a
5 pg/ml (500.000 kopija/ml) kloniranog DNK HPV-a tipa 6 i nosač DNK u mediju STM koji sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 1 ml | Kontrola kvalitete za visokorizične tipove HPV-a
5 pg/ml (500.000 kopija/ml) kloniranog DNK HPV-a tipa 16 i nosač DNK u mediju STM koji sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 2,0 ml | Negativni kalibrator
Nosač DNK u transportnom mediju za ispitke koji sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 1,0 ml | Kalibrator za niskorizične tipove HPV-a
1 pg/ml kloniranog DNK HPV-a tipa 11 i nosač DNK u mediju STM koji sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 1,0 ml | Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a
1 pg/ml kloniranog DNK HPV-a tipa 16 i nosač DNK u mediju STM koji sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 1 | Mikrotitar pločica za hvatanje
Obložena anti-RNK/DNK hibrid protutijelima. |
| 1 x 12 ml | Detekcijski reagens 1
Protutijela konjugirana s alkalnom fosfatazom na RNK/DNK hibride u puferiranoj otopini koja sadržava 0,05 % w/v natrijeva azida. |
| 1 x 12 ml | Detekcijski reagens 2
CDP-Star® with Emerald II (kemiluminiscentni supstrat). |
| 1 x 100 ml | Koncentrat pufera za pranje
Sadržava 1,5 % w/v natrijeva azida. |

MATERIJALI KOJI SU POTREBNI, ALI NISU ISPORUČENI

In vitro dijagnostička oprema i pribor^A sustava Hybrid Capture System

Sustav <i>digene</i> Hybrid Capture 2 System („ <i>digene</i> HC2 System“), koji se sastoji od luminometra koji je odobrila tvrtka QIAGEN („instrument DML“), osobnog računala i perifernih uređaja za računalo koje je odobrila tvrtka QIAGEN (monitor, tipkovnica, miš, pisač i kabel pisača), softvera <i>digene</i> HC2 System Software („softver za analizu ispitivanja <i>digene</i> “), protokola <i>digene</i> HC2 System Assay Protocols za HPV, softvera LumiCheck Plate Software i <i>Korisničkog priručnika za softver sustava digene HC2 System</i>	Rapid Capture System (opcionalno za testiranje s velikim protokom uzoraka) ^E
Hybrid Capture System Rotary Shaker I	Uređaj za pranje
Hybrid Capture System Microplate Heater I	Hybridization Microplates
Hybrid Capture System Automated Plate Washer	Microplate Lids
Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (opcionalno) ^B	Prazne trake mikrotitar pločice (marke Costar, model br. 2581); opcionalne za uporabu s automatiziranim uređajem za pranje pločica
Stalak za konverziju i poklopac stalka (opcionalno)	Ekstra dugi vršci pipete za vađenje ispitka
<i>digene</i> Specimen Rack and Rack lid (opcionalno)	Epruvete za uzimanje ispitaka
EXPAND-4 Pipettor i stalak (opcionalno) ^C	Stalak za epruvete za uzimanje ispitaka
<i>digene</i> HC2 DNA Collection Device ^D	Navojni čepovi za epruvete za uzimanje ispitaka
Dozator folije za prekrivanje epruveta i uređaj za rezanje (opcionalno, upotrebljava se s vrtložnom miješalicom MST Vortexer 2)	Jednokratni spremnici za reagense
	DuraSeal™ Tube Sealer Film
	Mikroepuvete za hibridizaciju
	Stalak za mikroepuvete
	Folije za prekrivanje pločica

Oprema i pribor za opću laboratorijsku uporabu

Vodena kupelj na temperaturi od 65 ± 2 °C dovoljne veličine da drži ili 1 stalak za konverziju (36 x 21 x 9 cm) ili stanke za ispitke
Mikrocentrifuga (opcionalna za centrifugiranje bočica s probom za dobivanje maksimalnog volumena probe)
Vrtložna miješalica s elementom za pričvršćivanje čašice
Jednokanalni mikropipetor; varijabilne postavke za volumene od 20 – 200 µl i 200 – 1000 µl
Pipetor s ponavljajućim pozitivnim pomakom, kao što je pipeta Eppendorf® Repeater® ili slična
8-kanalni pipetor: promjenjive postavke za volumene od 25 – 200 µl
Mjerač vremena
Otopina natrijeva hipoklorita, 5 % v/v (ili izbjeljivač za uporabu u kućanstvu)
Folija Parafilm® ili slična
Jednokratni vršci pipeta s pregradom za aerosol za jednokanalni pipetor (20 – 200 µl i 200 – 1000 µl)
Jednokratni vršci za pipetu Eppendorf Repeater (25 i 500 µl)
Jednokratni vršci za 8-kanalni pipetor (od 25 do 200 µl)
Papirnati ručnici Kimtowels® Wipers ili slični papirnati ručnici koji ne otpuštaju vlakna
Jednokratna navlaka za radnu površinu
Rukavice bez pudera
Polipropilenske epruvete sa zaobljenim dnom i čepom snap-cap od 5 ml i/ili 15 ml (za razrjeđivanje probe)
Polipropilenske epruvete za mikrocentrifugu s čepovima od 2,0 ml

Dotatna oprema i pribor za obradu ispitaka u tekućini SurePath Preservative Fluid

Centrifuga s njišućim vjedrima koja može postići 800 ± 15 x g i držati konusne polipropilenske epruvete za centrifugiranje od 15 ml <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Tubes (konusne epruvete od 15 ml) ^F
Pipete za prijenos sa standardnim vrškom od 7 ml ili slične
QIAGEN Specimen Transport Media
Jednokratni vršci za pipetu Eppendorf Repeater (100 µl)

Dotatna oprema i pribor za obradu ispitaka u otopini PreservCyt Solution

Centrifuga s njišućim vjedrima koja može postići 2900 ± 150 x g i držati konusne polipropilenske epruvete za centrifugiranje od 10 ml ili 15 ml
Serološke pipete ili pipete za prijenos od 5 ml <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit ^A
Jednokratni vršci za pipetu Eppendorf Repeater (50 i 100 µl)
<u>Za postupak ručnog vrtložnog miješanja:</u>
<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Tubes (15 ml, konusne) ^F , konusne epruvete s čepovima od 10 ml Sarstedt ili polipropilenske epruvete za centrifugiranje s konusnim dnom i s čepovima od 15 ml marke VWR® ili Corning®
Stalak za epruvete za držanje konusnih epruveta od 10 ml ili 15 ml
<u>Za postupak s vrtložnom miješalicom Multi-Specimen Tube Vortexer 2</u>
<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Tubes (15 ml, konusne) ^F
Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
Stalak za konverziju i poklopac (posebno za konusne epruvete od 15 ml)
Dozator folije za prekrivanje epruveta i uređaj za rezanje DuraSeal Tube Sealer Film (upotrebljava se s vrtložnom miješalicom MST Vortexer 2)

^A Kod proizvođača QIAGEN dostupni su samo oprema i pribor odobreni za uporabu s testovima *digene* HC2 HPV DNA Tests.

^B Također potrebno za uporabu kada se izvodi poliautomatizirani postupak s aplikacijom RCS.

^C Prilagođena stavka. Mogu se upotrebljavati i druge prilagođene, proširive, višekanalne pipete pod uvjetom da je moguće postaviti razmak između vršaka od 3,2 cm kada se prošire. Alternativno, može se upotrebljavati jednokanalna pipeta kojom se može pipetirati 75 µl.

^D Radne značajke testa *digene* HC2 HPV DNA Test utvrđene su isključivo s naznačenim kompletima za uzimanje uzoraka.

^E Pogledajte *Korisnički priručnik za sustav Rapid Capture System* za upute specifične za uporabu tog sustava za testiranje s velikim protokom uzoraka uz primjenu ovog ispitivanja.

^F *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (marke VWR ili Corning®) koje se mogu nabaviti od tvrtke QIAGEN moraju se upotrebljavati kako bi se osiguralo ispravne radne značajke ispitivanja kada se upotrebljava postupak s vrtložnom miješalicom Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

UPOZORENJA I MJERE OPREZA

PAŽLJIVO PROČITAJTE SVE UPUTE PRIJE UPORABE TESTA.

SIGURNOSNE MJERE OPREZA

SVI ISPITCI trebali bi se smatrati potencijalno infektivnima. Nijedna poznata metoda testa ne može pružiti potpunu sigurnost da ispiti neće prenijeti infekciju. Preporučuje se da se ljudskim ispiticima rukuje u skladu s odgovarajućim nacionalnim ili lokalnim praksama za biološku sigurnost. Primjenjujte te prakse za biološku sigurnost s materijalima koji sadržavaju ili za koje se sumnja da sadržavaju infektivne agense. Te mjere opreza, među ostalim, uključuju sljedeće:

1. Nemojte pipetirati ustima.
2. Nemojte pušiti, jesti ili piti u prostorijama u kojima se rukuje reagensima ili ispiticima.
3. Prilikom rukovanja reagensima ili ispiticima nosite jednokratne rukavice bez pudera. Temeljito operite ruke nakon provedbe testa.
4. Očistite i dezinficirajte sve prolivene ispitke tuberkulocidnim dezinficijensom kao što je natrijev hipoklorit koncentracije 0,5 % v/v ili drugim odgovarajućim dezinficijensom.^{42,43}
5. Dekontaminirajte i bacite sve ispitke, reagense i druge potencijalno kontaminirane materijale u skladu s nacionalnim i lokalnim propisima.

Neki reagensi sadržavaju natrijev azid. Zabilježeni su slučajevi kada je natrijev azid uzrokovao nastanak olovnog ili bakrova azida u laboratorijskim cijevima. Ti azidi mogu eksplodirati prilikom udara, kao što je lupanje čekićem. Kako biste spriječili nastanak olovnog ili bakrova azida, temeljito vodom isperite odvođe nakon zbrinjavanja otopina koje sadržavaju natrijev azid. Kako biste uklonili kontaminaciju iz starih odvođa za koje se sumnja da sadržavaju nakupine azida, US Occupational Safety and Health Administration (Uprava za zaštitu na radu SAD-a) preporučuje sljedeće: (1) odvedite tekućinu iz sifona gumenim ili plastičnim crijevom, (2) napunite otopinom natrijeva hidroksida koncentracije 10 % v/v, (3) ostavite da odstoji 16 sati i (4) dobro isperite vodom.

Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS

Pogledajte *Korisnički priručnik za sustav Rapid Capture System* za dodatna upozorenja i mjere opreza specifične za uporabu tog sustava za testiranje s velikim protokom uzoraka.

Izjave o sigurnosti i rizicima za komponente

Sljedeće se izjave o rizicima i sigurnosti primjenjuju na komponente kompleta *digene* HC2 HPV DNA Test:

Koncentrat pufera za pranje



Sadržava: natrijev azid. Upozorenje! Štetno ako se proguta. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Izbjegavati ispuštanje u okoliš. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada.

Denaturacijski reagens



Sadržava: natrijev hidroksid. Opasnost! Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Može nagrizati metale. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM (ili kosom): Odmah skinuti svu zagađenu odjeću. Isprati kožu vodom ili tuširanjem. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA/liječnika. Skladištiti pod ključem. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

Diluens za probe



Sadržava: octenu kiselinu, poliakrilnu kiselinu. Opasnost! Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Odložiti sadržaj/spremnik u odobreno postrojenje za odlaganje otpada. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM (ili kosom): Odmah skinuti svu zagađenu odjeću. Isprati kožu vodom ili tuširanjem. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA/liječnika. Skladištiti pod ključem. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. U slučaju nadražaja kože: zatražiti savjet/pomoć liječnika.

Kontrola kvalitete za visokorizične tipove HPV-a

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. U slučaju nadražaja kože: zatražiti savjet/pomoć liječnika.

Kontrola kvalitete za niskorizične tipove HPV-a

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. U slučaju nadražaja kože: zatražiti savjet/pomoć liječnika.


Negativni kalibrator

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. U slučaju nadražaja kože: zatražiti savjet/pomoć liječnika.


Dodatne informacije

Sigurnosno-tehnički listovi: www.qiagen.com/safety

MJERE OPREZA ZA RUKOVANJE

1. Za in vitro dijagnostičku uporabu.
2. Cervikalna četkica namijenjena je samo za uporabu na ženama koje nisu trudne.
3. Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka trajanja naznačenog pokraj simbola  na naljepnici vanjske kutije.
4. Ako se ispitivanje ne izvodi u skladu s utvrđenim vremenskim i temperaturnim rasponima, mogu se dobiti nevažeći rezultati. Ispitivanja koja premaše utvrđene vremenske i temperaturne raspone nisu važeća i potrebno ih je ponoviti.
5. Potrebno je točno slijediti postupak testa *digene* HC2 HPV DNA Test, kriterije provjere kalibracije ispitivanja, kontrolu kvalitete i tumačenje rezultata ispitaka kako bi se dobili pouzdani rezultati testa.
6. Važno je da pipetirate točno naznačen volumen reagensa i dobro pomiješate nakon svakog dodavanja reagensa. Ako to ne učinite, rezultati testa mogli bi biti pogrešni. Vođenjem računa o tome da se dogode zabilježene promjene boja potvrdit ćete da su navedeni uvjeti zadovoljeni.
7. Komponente kompleta testirane su kao cjelina. **Nemojte** mijenjati komponente onima iz drugih izvora ili drugih serija.
8. Nukleinske su kiseline vrlo osjetljive na degradaciju nukleaza u okolini. Nukleaze su prisutne na ljudskoj koži te na površinama ili materijalima kojima ljudi rukuju. Očistite i prekrijte radne površine jednokratnom navlakom za radnu površinu i **nosite rukavice bez pudera tijekom izvođenja svih koraka ispitivanja**.
9. Pripazite da biste spriječili kontaminaciju mikrotitar pločice za hvatanje i detekcijskog reagensa 2 vanjskom alkalnom fosfatazom tijekom izvođenja ispitivanja. Tvari koje mogu sadržavati alkalnu fosfatazu uključuju detekcijski reagens 1, bakterije, slinu, kosu i ulja s kože. **Prekrivanje mikrotitar pločice za hvatanje nakon koraka pranja i za vrijeme inkubacije detekcijskog reagensa 2 osobito je važno jer vanjska alkalna fosfataza može reagirati s detekcijskim reagensom 2, što može rezultirati lažno pozitivnim rezultatima.**
10. Zaštitite detekcijski reagens 2 od produljenog izlaganja izravnoj svjetlosti. Upotrijebite detekcijski reagens 2 odmah nakon alikvotiranja i izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
11. Ponavljajući pipetor treba pripremiti prije pipetiranja reagensa i periodično provjeravati da nema velikih mjehurića zraka. Prekomjerne količine velikih mjehurića zraka u vršku ponavljajućeg pipetora mogu uzrokovati netočno pipetiranje, a može ih se izbjeći punjenjem pipetora, pipetiranjem sve tekućine te ponovnim punjenjem. Pogledajte priručnik s uputama dobavljača pipetora za specifične upute za uporabu.
12. Višekanalno pipetiranje treba izvesti tehnikom obrnutog pipetiranja (pogledajte *Otkrivanje hibrida*) za pipetiranje detekcijskih reagensa 1 i 2. Provjerite svaki vršak pipete na višekanalnom pipetoru kako biste se uvjerali da je dobro pričvršćen i napunjen.
13. Potvrdite da je svaka jažica mikrotitar pločice temeljito isprana kako je navedeno u uputama za ručno pranje. Neodgovarajuće pranje rezultirat će povećanom pozadinom i može uzrokovati lažno pozitivne rezultate. Ostatak pufera za pranje u jažicama može dovesti do smanjenog signala ili slabe obnovljivosti.
14. Pustite Hybrid Capture System Microplate Heater I barem 60 minuta da se iz hladnog pokretanja zagrije na temperaturu od $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ako ne omogućite ovo razdoblje zagrijavanja, moglo bi doći do topljenja pločice Hybridization Microplate. Za pojedinosti pogledajte *Korisnički priručnik za Microplate Heater I*.

PRIPREMA I ČUVANJE REAGENSA

1. Nakon primitka čuvajte komplet na temperaturi od 2 – 8 °C. Koncentrat pufera za pranje, denaturacijski reagens i indikatorska boja mogu se čuvati na temperaturi od 2 – 30 °C, prema želji.
2. Nemojte upotrebljavati nakon isteka roka trajanja naznačenog pokraj simbola  na naljepnici kutije ili roka trajanja pripremljenih reagensa (pogledajte u nastavku).
3. Svi su reagensi spremni za uporabu, osim denaturacijskog reagensa, probe za niskorizične tipove HPV-a, probe za visokorizične tipove HPV-a i koncentrata pufera za pranje.

Za testiranje ispitaka kako bi se utvrdila prisutnost nekog od 18 tipova HPV-a omogućena je metoda koktela kombiniranih proba (Combined-Probe Cocktail, CPC). Za testiranje primjenom te opcije koktel kombiniranih proba mora se pripremiti tako da se pomiješa razrijeđena mješavina probe za niskorizične tipove HPV-a i razrijeđena mješavina probe za visokorizične tipove HPV-a prije izvođenja testa *digene* HC2 HPV DNA Test. U metodi s dvije probe upotrebljavaju se zasebna mješavina probe za niskorizične tipove HPV-a i mješavina probe za visokorizične tipove HPV-a. Pogledajte upute u nastavku.

Za testiranje s velikim protokom uzoraka pogledajte *Korisnički priručnik za sustav Rapid Capture System* za pripremu mješavine/a proba za HPV, pufera za pranje, detekcijskog reagensa 1 i detekcijskog reagensa 2 jer su to upute specifične za uporabu sustava za testiranje s velikim protokom uzoraka.

REAGENS	METODA PRIPREME												
Denaturacijski reagens	<p>Priprema na početku:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dodajte 5 kapi indikatorske boje u bočicu denaturacijskog reagensa i dobro pomiješajte. Denaturacijski reagens bi trebao biti ujednačene tamnoljubičaste boje. • Nakon pripreme denaturacijski reagens stabilan je tri mjeseca kada se čuva na temperaturi od 2 – 8 °C. Označite ga novim rokom trajanja. Ako boja izbledi, dodajte 3 kapi indikatorske boje i temeljito pomiješajte prije uporabe. <p>Upozorenje: Denaturacijski reagens je nagrizajući. Nosite odgovarajuću zaštitnu odjeću, rukavice i zaštitu za oči/lice. Budite pažljivi pri rukovanju.</p>												
Mješavina probe za niskorizične tipove HPV-a (pripremljena miješanjem reagensa probe za niskorizične tipove HPV-a i diluensa za probe)	<p>Priprema tijekom inkubacije u sklopu denaturacije ispitka:</p> <p>Važno: Ponekad proba zaglavi u poklopcu bočice.</p> <p>Napomena: Obavezno spriječite kontaminaciju probe i mješavine probe RNazom. Za pipetiranje probe upotrebljavajte vrške pipeta s pregradama za aerosole. Diluens za probe je viskoznan.</p> <p>Kada pripremate probe za HPV, obavezno dobro pomiješajte. Tijekom koraka miješanja u tekućini mora nastati vidljivi vrtlog. Nepotpuno miješanje može dovesti do smanjenog signala.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kratko centrifugirajte bočicu s probom za niskorizične tipove HPV-a kako bi se tekućina skupila na dnu bočice. Nježno tapkajte kako biste pomiješali. • Odredite potrebnu količinu mješavine probe (25 µl/test). Preporučuje se pripremiti dodatnu količinu mješavine probe kako biste nadoknadili volumen koji bi se mogao izgubiti u vršcima pipete ili na stijenci bočice. Pogledajte preporučene volumene navedene u nastavku. Preporučeni najmanji broj jažica za svaku uporabu je 24. Ako želite iskoristiti manje od 24 jažice po ispitivanju, ukupan broj testova po kompletu može se smanjiti zbog ograničenih volumena probe i diluensa za probe. • Prenesite potrebnu količinu diluensa za probe u novi jednokratni spremnik. Ovisno o broju testova preporučuju se polipropilenske epruvete sa zaobljenim dnom i čepom snap-cap od 5 ml ili 15 ml. Razrijedite probu za niskorizične tipove HPV-a u diluensu za probe u omjeru 1:25 kako biste pripremili mješavinu probe. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Br. testova/traka</th> <th>Volumen diluensa za probe*</th> <th>Volumen probe*</th> </tr> </thead> <tbody> <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>po jažici</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Te vrijednosti uključuju preporučeni dodatni volumen.</p>	Br. testova/traka	Volumen diluensa za probe*	Volumen probe*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	po jažici	0,045 ml	1,8 µl
Br. testova/traka	Volumen diluensa za probe*	Volumen probe*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
po jažici	0,045 ml	1,8 µl											

	<ul style="list-style-type: none"> Pipetirajte probu za niskorizične tipove HPV-a u diluens za probe tako da naslonite vršak pipete uz unutarnju stijenku epruvete odmah iznad meniskusa i izbacite njezin sadržaj. Nemojte uranjati vršak u diluens za probe. Miješajte na vrtložnoj miješalici najmanje 5 sekundi pri maksimalnoj brzini kako biste temeljito pomiješali. Mora nastati vidljivi vrtlog. Označite kao mješavinu probe za niskorizične tipove HPV-a i čuvajte u čistom, zatvorenom spremniku dok ne budete spremni za uporabu. Neiskorištenu mješavinu probe treba baciti. 												
Mješavina probe za visokorizične tipove HPV-a	Pripremite na isti način kao mješavinu probe za niskorizične tipove HPV-a kao što je gore opisano. Označite kao „Mješavina probe za visokorizične tipove HPV-a”. Neiskorištenu mješavinu probe treba baciti.												
Koktel kombiniranih proba	Pripremite mješavinu probe za niskorizične tipove HPV-a i mješavinu probe za visokorizične tipove HPV-a kao što je gore opisano. Dodajte cijeli sadržaj razrijeđene mješavine probe za niskorizične tipove HPV-a u epruvete s razrijeđenom mješavinom probe za visokorizične tipove HPV-a. Dobro pomiješajte vrtložnim miješanjem barem 5 sekundi na maksimalnoj brzini. Mora nastati vidljivi vrtlog. Označite kao „koktel kombiniranih proba”. Neiskorištenu mješavinu probe treba baciti.												
Pufer za pranje	<p>Priprema tijekom koraka hvatanja:</p> <p>Za Hybrid Capture System Automated Plate Washer pufer za pranje može se pripremiti na način opisan u nastavku i spremiti u prekrivenom spremniku ili se može pripremiti po 1 l i staviti u spremnike za pranje automatiziranog uređaja za pranje pločica. Volumene za miješanje potražite u tablici u nastavku:</p> <p>Pogledajte Korisnički priručnik automatiziranog uređaja za pranje pločica za upute o čišćenju i održavanju.</p> <p>Upozorenje: Koncentrat pufera za pranje otrovan je ako se proguta. Nosite odgovarajuću zaštitnu odjeću, rukavice i zaštitu za oči/lice. Kako biste maksimalno smanjili izlaganje, dodajte vodu koncentratu pufera za pranje tijekom pripreme.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Količina koncentrata pufera za pranje</th> <th>Količina destilirane ili deionizirane vode</th> <th>Konačni volumen pufera za pranje</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 l</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1933,4 ml</td> <td>2 l</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2900 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>Napomena: Vrlo je važno uvijek ostaviti uključeno napajanje automatiziranog uređaja za pranje pločica. Time se omogućuje izvođenje ispiranja u svrhu održavanja nakon osam sati neaktivnosti.</p> <p>Prije svakog ispitivanja provjerite je li spremnik za otpad automatiziranog uređaja za pranje pločica prazan i je li spremnik za ispiranje napunjen destiliranom ili deioniziranom vodom.</p> <p>Za metodu ručnog pranja pločica:</p> <ul style="list-style-type: none"> Dobro pomiješajte koncentrat pufera za pranje. Razrijedite 100 ml koncentrata pufera za pranje s 2,9 l destilirane ili deionizirane vode u uređaju za pranje i dobro pomiješajte (konačni volumen trebao bi biti 3 l). Zatvorite spremnik kako biste spriječili kontaminaciju ili isparavanje. <p>Nakon pripreme pufer za pranje stabilan je tri mjeseca na temperaturi od 2 – 30 °C. Označite ga novim rokom trajanja. Ako ste čuvali pufer za pranje u hladnjaku, prije uporabe dovedite ga na temperaturu od 20 – 25 °C.</p> <p>Preporučuje se očistiti uređaj za pranje i cijevi 0,5-postotnom otopinom natrijeva hipoklorita i temeljito isprati destiliranom ili deioniziranom vodom jednom svaka tri mjeseca kako biste spriječili moguću kontaminaciju alkalnom fosfatazom prisutnom u bakterijama i plijesni.</p>	Količina koncentrata pufera za pranje	Količina destilirane ili deionizirane vode	Konačni volumen pufera za pranje	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1933,4 ml	2 l	100 ml	2900 ml	3 l
Količina koncentrata pufera za pranje	Količina destilirane ili deionizirane vode	Konačni volumen pufera za pranje											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1933,4 ml	2 l											
100 ml	2900 ml	3 l											

VOLUMENI ZA REAGENSE SPREMNE ZA UPORABU**Detekcijski reagens 1 i detekcijski reagens 2****Neposredno prije uporabe:**

Dobro pomiješajte reagens, a zatim pažljivo izmjerite odgovarajući volumen detekcijskog reagensa 1 ili detekcijskog reagensa 2 u čisti spremnik za reagense u skladu sa smjernicama u nastavku. Kako biste spriječili kontaminaciju, te reagense **NE SMIJETE** vratiti u originalne bočice: **Bacite neiskorišteni materijal nakon uporabe**. Ako ne upotrebljavate 8-kanalni pipetor, moguće ga je zamijeniti odgovarajućim ponavljajućim pipetorom. U tom slučaju, reagens treba podijeliti u alikvote u polipropilenske epruvete veličine dovoljne da drže potrebne volumene navedene u nastavku.

Br. testova/traka	Volumen detekcijskog reagensa 1 ili 2
96/12	sadržaj boce
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 test	0,125 ml

UZIMANJE ISPITAKA I RUKOVANJE

Cervikalni ispitci uzeti i transportirani s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device (koji se sastoji od cervikalne četkice i *digene* Specimen Transport Medium) ili ispitci uzeti priborom za prikupljanje nalik metlici ili kombinacijom četkice/špatule te stavljeni u otopinu PreservCyt Solution ili cervikalni ispitci prikupljeni u tekućinu Sure Path Preservative Fluid jedinici su ispitci preporučeni za uporabu s testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Ispitci uzeti drugim priborom za uzimanje uzoraka ili transportirani u drugim transportnim medijima nisu odobreni za uporabu s ovim ispitivanjem. Radne značajke ovog kompleta utvrđene su isključivo s naznačenim kompletima za uzimanje uzoraka. Cervikalni ispitci moraju se uzeti prije primjene octene kiseline ili joda ako se provodi kolposkopija. Pogledajte upute za uporabu za *digene* HC2 DNA Collection Device za dodatne postupke za uzimanje ispitaka i rukovanje ispitcima.

CERVIKALNI ISPITCI U STM

Ispitci u mediju STM mogu se čuvati do dva tjedna na sobnoj temperaturi te ih se može transportirati bez hlađenja do ispitnog laboratorija. Ispitke treba transportirati u izoliranom spremniku putem službe za dostavu koja dostavlja preko noći ili u roku od 2 dana. U ispitnom laboratoriju ispitke treba čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C ako će se ispitivanje provesti u roku od tjedan dana. Ako će se ispitivanje provesti nakon jednog tjedna, ispitke čuvajte na -20 °C do 3 mjeseca (pogledajte *Napomene* pod *Cervikalni bioptati* prije zamrzavanja). Mediju STM dodan je konzervans kako bi se spriječio razvoj bakterija i zadržao integritet DNK. On **nije namijenjen** za očuvanje vijabilnosti organizama ili stanica. *digene* HC2 DNA Collection Device ne smije se upotrebljavati za prikupljanje ispitaka trudnica.

CERVIKALNI BIOPTATI

Ispitke netom prikupljene cervikalnom biopsijom poprečnog presjeka 2 – 5 mm moguće je također analizirati testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Bioptat je potrebno odmah staviti u 1,0 ml medija STM i čuvati zamrznutog na -20 °C. Bioptati se mogu transportirati na temperaturi od 2 do 30 °C za noćnu isporuku u ispitni laboratorij i čuvati na temperaturi od -20 °C do obrade. Bioptati promjera manjeg od 2 mm ne bi se trebali upotrebljavati.

Napomene: Kako biste spriječili iskakanje čepova s epruveta za ispitke koje se isporučuju ili čuvaju zamrznute:

- Prekrijte čepove folijom Parafilm prije isporuke prethodno zamrznutih epruveta za ispitke. Ispitci se mogu isporučivati zamrznuti ili na temperaturi od 20 – 25 °C.
- Prilikom vađenja ispitaka iz zamrzivača radi testiranja, odmah zamijenite čepove navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka.

CERVIKALNI ISPITCI U OTOPINI PRESERVCYT SOLUTION

Ispitci prikupljeni priborom za prikupljanje nalik metlici ili kombinacijom četkice/špatule te stavljeni u otopinu PreservCyt Solution za uporabu pri pripremi stakalaca za papa testove ThinPrep® mogu se upotrebljavati za test *digene* HC2 HPV DNA Test. Ispitke treba uzeti na rutinski način, a stakalca za papa test ThinPrep treba pripremiti u skladu s uputama tvrtke Hologic.

Napomena: Barem 4 ml otopine PreservCyt Solution mora ostati za *digene* HC2 HPV DNA Test. Ispitci volumena manjeg od 4 ml nakon što je papa test pripremljen možda će sadržavati nedovoljno materijala i mogli bi biti lažno negativni na testu *digene* HC2 HPV DNA Test.

Ispitci u otopini PreservCyt Solution mogu se čuvati do tri mjeseca na temperaturi od 2 °C do 30 °C nakon prikupljanja i prije obrade za *digene* HC2 HPV DNA Test. Ispitci u otopini PreservCyt Solution ne smiju se zamrzavati. Za obradu tih ispitaka pogledajte *Postupak pripreme ispitaka u otopini PreservCyt*.

CERVIKALNI ISPITCI U TEKUĆINI SUREPATH PRESERVATIVE FLUID

(SAMO za testiranje DNK visokorizičnog HPV-a)

Ručna priprema uzoraka ispitaka u tekućini SurePath provodi se s pomoću postgradijentnog staničnog taloga dobivenog pripremom stakalaca za papa testove SurePath. Pripremite stakalca za papa testove SurePath u skladu s odgovarajućim uputama za BD PrepStain® Slide Processor.

Važno: Odmah nakon pripreme stakalca za papa test SurePath, 2,0 ml tekućine SurePath Preservative Fluid treba pipetirati u epruvetu za centrifugiranje u kojoj se nalazi preostali stanični talog. Time se čuva cjelovitost postgradijentnog staničnog taloga za izvođenje testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

Postgradijentni stanični talog s tekućinom SurePath Preservative Fluid može se čuvati do 4 tjedna na temperaturi od 2 – 30 °C prije pripreme uzoraka za *digene* HC2 HPV DNA Test.

Ispitci postgradijentnog staničnog taloga SurePath pripremljeni su kako je navedeno u ovim uputama za uporabu. Rezultat ručne pripreme uzorka denaturirani je uzorak spreman za nastavak na hibridizacijski korak testa.

POSTUPAK TESTA

Ispitci mogu sadržavati infektivne agense te je s njima potrebno postupati u skladu s time. *digene* HC2 HPV DNA Test može se provoditi ručno prema uputama u ovim uputama za uporabu ili instrumentom Rapid Capture System za testiranje s velikim protokom uzoraka.

TESTIRANJE S VELIKIM PROTOKOM UZORAKA S POMOĆU SUSTAVA RAPID CAPTURE SYSTEM

Rapid Capture System sustav je za automatizirano pipetiranje i razrjeđivanje za opću uporabu koji se može upotrebljavati s testom *digene* HC2 HPV DNA Test za testiranje s velikim protokom uzoraka. Taj sustav obrađuje do 352 ispitka u osam sati, uključujući 3,5-satno razdoblje tijekom kojeg nije potrebna intervencija korisnika; u 13 sati moguće je generirati rezultate za do 704 ispitka. Denaturacija ispitaka radi pripreme za testiranje izvodi se neovisno o sustavu RCS, prije stavljanja ispitaka na platformu RCS. Osim toga, otkrivanje kemiluminiscentnog signala i izvještavanje o rezultatu provode se s pomoću izvanmrežnog instrumenta DML koji je zajednički i ručnoj metodi i metodi s pomoću sustava RCS. Koraci postupka testa *digene* HC2 HPV DNA Test provode se jednakim redoslijedom kao i postupak ručnog testiranja. Aplikacija RCS omogućuje raspoređenu obradu do 4 mikrotitar pločice, pri čemu svaka pločica sadržava ispitke te kalibratore i kontrole kvalitete potrebne za ispitivanje.

Kada upotrebljavate sustav Rapid Capture System, pogledajte *Korisnički priručnik za sustav Rapid Capture System* isporučen s instrumentom, kao i ove upute za uporabu, za potrebne informacije o postupku i opise.

RUČNA METODA

Postavljanje

1. Ako upotrebljavate Microplate Heater I, **pričekajte barem 60 minuta da se iz hladnog pokretanja zagrije na temperaturu 65 ± 2 °C**. Za pojedinosti pogledajte *Korisnički priručnik za Microplate Heater I*.
2. Potvrdite da je temperatura vodene kupelji 65 °C i da ima dovoljno vode da prekrije cijeli volumen u epruvetama za ispitke.
3. **Prije početka ispitivanja** izvadite ispitke i **sve** potrebne reagense iz hladnjaka. Ostavite ih 15 do 30 minuta da dosegnu temperaturu od 20 – 25 °C.

Napomena: Pripremite ispitke u otopini PreservCyt Solution i tekućinu SurePath prije izjednačavanja bilo kojeg prethodno denaturiranog ispitka i reagensa iz kompleta sa sobnom temperaturom.

4. Upotrijebite softver za analizu ispitivanja *digene* za izradu rasporeda pločice za ispitivanje. Pogledajte odgovarajući korisnički priručnik za upute o izradi rasporeda pločice.
5. Postavite kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke za testiranje na stalak za testne epruvete onim redoslijedom kojim ćete ih testirati. **Negativni kalibrator, kalibrator za niskorizične tipove HPV-a i kalibrator za visokorizične tipove HPV-a moraju se PRVI testirati.** Negativni kalibrator (Negative Calibrator, NC), kalibrator za niskorizične tipove HPV-a (Low-Risk HPV Calibrator, LRC) ili kalibrator za visokorizične tipove HPV-a (High-Risk HPV Calibrator, HRC), kontrola kvalitete za niskorizične tipove (Low-Risk Quality Control, QC1-LR), kontrola kvalitete za visokorizične tipove (High-Risk Quality Control, QC2-HR) i ispitci trebaju se obraditi u konfiguraciji stupca s 8 jažica mikrotitar pločice. Pogledajte *Primjer rasporeda* u nastavku.

Primjer rasporeda za obradu 24 jažice mikrotitar pločice:			
Redak	Stupac		
	1	2	3
A	NC	Ispitak 1	Ispitak 9
B	NC	Ispitak 2	Ispitak 10
C	NC	Ispitak 3	Ispitak 11
D	LRC ili HRC	Ispitak 4	Ispitak 12
E	LRC ili HRC	Ispitak 5	Ispitak 13
F	LRC ili HRC	Ispitak 6	Ispitak 14
G	QC1-LR	Ispitak 7	Ispitak 15
H	QC2-HR	Ispitak 8	Ispitak 16

6. Ako upotrebljavate metodu koktela kombiniranih proba (Combined-Probe Cocktail, CPC), NC, LRC i HRC testiraju se u triplikatu s koktelom kombiniranih proba na istoj mikrotitar pločici. Upotrijebite jažice A1, B1 i C1 za NC te jažice D1, E1, F1, G1, H1 i A2 za LRC odnosno HRC. Upotrijebite jažice B2 i C2 za kontrole kvalitete QC1-LR odnosno QC2-HR te jažice počevši od D2 za ispitke. **Postupak CPC nije odobren za uporabu sa sustavom Rapid Capture System.**

7. Za metodu s dvije probe provedite testove s mješavinom probe za niskorizične tipove HPV-a na lijevoj strani mikrotitar pločice te provedite testove s mješavinom probe za visokorizične tipove HPV-a na desnoj strani mikrotitar pločice.

PRVO, testirajte negativni kalibrator (Negative Calibrator, NC) i kalibrator za niskorizične tipove (Low-Risk Calibrator, LRC) u triplikatu s mješavinom probe za niskorizične tipove HPV-a. Zatim jednom testirajte kontrole kvalitete (QC1-LR i QC2-HR) i ispitke, također s mješavinom probe za niskorizične tipove HPV-a. Postavite NC replikate u A1, B1, C1; LRC replikate u D1, E1, F1; QC1-LR u G1; QC2-HR u H1; a ispitke počevši od A2.

ZATIM, testirajte NC i kalibrator za visokorizične tipove (High-Risk Calibrator, HRC) u triplikatu s mješavinom probe za visokorizične tipove HPV-a. Zatim jednom testirajte QC1-LR i QC2-HR te ispitke, također s mješavinom probe za visokorizične tipove HPV-a. Postavite NC replikate u A7, B7, C7; HRC replikate u D7, E7, F7; QC1-LR u G7; QC2-HR u H7; a ispitke počevši od A8. Pogledajte primjer rasporeda gore.

Pogledajte odgovarajući korisnički priručnik za pravilno postavljanje kalibratora / kontrola kvalitete / ispitaka u softveru.

8. Alternativno, dvije zasebne mikrotitar pločice mogu se upotrebljavati za kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke testirane s probom za niskorizične i probom za visokorizične tipove HPV-a. NC i LRC testiraju se u triplikatu i QC1-LR i QC2-HR testiraju se jednom mješavinom probe za niskorizične tipove HPV-a na jednoj mikrotitar pločici, a NC i HRC testiraju se u triplikatu i QC1-LR i QC2-HR testiraju se jednom mješavinom probe za visokorizične tipove HPV-a na drugoj mikrotitar pločici. Upotrijebite jažice A1, B1 i C1 za NC te jažice D1, E1 i F1 za LRC odnosno HRC. Upotrijebite jažice G1 i H1 za kontrole kvalitete QC1-LR odnosno QC2-HR.
9. Ispitci se mogu testirati jednim koktelom kombiniranih proba ako se upotrebljava metoda CPC ili jednom mješavinom probe za niskorizične tipove HPV-a te jednom mješavinom probe za visokorizične tipove HPV-a ako se upotrebljava metoda s dvije probe.

DENATURACIJA

Napomene:

- **Upozorenje:** Denaturacijski reagens je nagrizaajući. Prilikom rukovanja budite pažljivi i nosite rukavice bez pudera.
- **Važno:** Neki cervikalni ispitci mogu sadržavati krv ili drugi biološki materijal koji može maskirati promjene boje nakon dodavanja denaturacijskog reagensa. Ispitci koji su tamne boje prije dodavanja denaturacijskog reagensa u ovome koraku možda neće imati odgovarajuću promjenu boje. U tim slučajevima izostanak odgovarajuće promjene boje neće utjecati na rezultate ispitivanja. Ispravno miješanje može se provjeriti promatranjem promjene boje kalibratora i kontrola kvalitete.
- Tijekom koraka denaturacije i hibridizacije pazite da je razina vode u vodenoj kupelji odgovarajuća kako bi cijeli volumen ispitka u epruveti bio uronjen.
- Kalibratori, kontrole kvalitete i ispitci mogu se pripremiti tijekom koraka denaturacije i čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C preko noći ili na temperaturi od -20 °C do 3 mjeseca. Najviše 3 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja mogu se provesti s najviše 2 sata na sobnoj temperaturi tijekom svakog ciklusa odmrzavanja. Dobro pomiješajte prije uporabe.
- Nakon denaturacije i inkubacije ispitci se više ne smatraju infektivnima.²⁶ Međutim, laboratorijsko osoblje svejedno bi se trebalo pridržavati nacionalnih ili lokalnih mjera opreza.
- Nemojte uklanjati pribor za uzimanje ispitaka prije denaturacije.
- Kako biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, od iznimne je važnosti da sav materijal kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u mediju STM dođe u kontakt s denaturacijskim reagensom. Miješanje nakon dodavanja denaturacijskog reagensa ključan je korak: **Potvrdite da je vrtložna miješalica Multi-Specimen Tube Vortexer 2 postavljena na 100 (maksimalna brzina) i da je nastao vidljivi vrtlog tekućine tijekom miješanja tako da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete. Ako izvodite ručno vrtložno miješanje, pripazite da se svaki kalibrator, kontrola kvalitete i ispitak pojedinačno pomiješa vrtložnim miješanjem svakog od njih barem 5 sekundi na punoj brzini tako da tekući vrtlog oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete, a zatim jednom preokrenite epruvetu.**

Postupak pripreme kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u mediju STM

1. Skinite čepove s epruveta s kalibratorima, kontrolama kvalitete i ispitcima u mediju STM te ih bacite.
Napomena: Čepovi skinuti s epruveta za ispitke smatraju se potencijalno infektivnima. Odložite proizvod u otpad u skladu s nacionalnim ili lokalnim propisima.
2. Pipetirajte denaturacijski reagens s indikatorskom bojom u svaki kalibrator, kontrolu kvalitete i ispitak u mediju STM s pomoću ponavljajućeg ili prilagodljivog pipetora. Pazite da ne dodirujete stijenke epruvete jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka. Potreban volumen denaturacijskog reagensa jednak je polovini volumena ispitka. Točan volumen za svaku vrstu kalibratora, kontrole kvalitete i ispitka naveden je u tablici u nastavku.

Razrijedite preostali denaturacijski reagens u bočici prije odlaganja u otpad u skladu s nacionalnim ili lokalnim laboratorijskim postupcima.

Kalibrator, kontrola kvalitete ili ispitak	Potreban volumen denaturacijskog reagensa
Negativni kalibrator	1000 µl
Kalibrator za niskorizične ili visokorizične tipove HPV-a	500 µl
Kontrole kvalitete za niskorizične ili visokorizične tipove	500 µl
Cervikalni ispitak	500 µl

3. Pomiješajte ispitke primjenom jedne od dviju metoda u nastavku.

Metoda na vrtložnoj miješalici Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Napomena: Ispitci prikupljeni s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device pomiješani na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 **moraju se** hibridizirati s pomoću metode na Hybridization Microplate i Microplate Heater I.

- Prekrijte epruvete s kalibratorima, kontrolama kvalitete i ispitcima u mediju STM folijom DuraSeal Tube Sealer Film prevlačenjem folije preko epruveta na stalku.
- Postavite poklopac stalka na epruvete prekrivene folijom i učvrstite ga dvjema bočnim kopčama. Izrežite foliju uređajem za rezanje.
- Postavite stalak na vrtložnu miješalicu Multi-Specimen Tube Vortexer 2 i pričvrstite stalak stezaljkom. Potvrdite da je brzina postavljena na 100 (maksimalna brzina) i okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na UKLJUČENI položaj. Miješajte epruvete na vrtložnoj miješalici 10 sekundi.

Metoda ručnog vrtložnog miješanja pojedinačnih epruveta

- Ponovno začepite epruvete s kalibratorom, kontrolama kvalitete i ispitkom u mediju STM čistim navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka.
- Dobro pomiješajte svaku epruvetu miješajući ih 5 sekundi pojedinačno vrtložnim miješanjem pri velikoj brzini.
- Preokrenite svaku epruvetu za ispitak jedanput kako biste oplahnuli unutrašnjost epruvete, čep i rub.
- Vratite epruvetu na stalak.

Neovisno o tome koja se metoda vrtložnog miješanja upotrebljava, **u svakoj epruveti tijekom miješanja mora nastati vidljivi vrtlog tekućine tako da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete.** Boja kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka trebala bi se promijeniti u ljubičastu.

4. Inkubirajte epruvete na stalku u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 ± 2 °C u trajanju od 45 ± 5 minuta (denaturirani kalibratori, kontrole kvalitete i ispitci mogu se odmah testirati ili čuvati kao što je opisano gore pod Napomene). Tijekom te inkubacije pripremite mješavinu/e probe za HPV. Pogledajte odjeljak *Priprema i čuvanje reagensa*.

Postupak pripreme ispitaka u otopini PreservCyt Solution

Napomene:

- Pogledajte upute za uporabu kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit za sve pojedinosti.
- Obrada alikvota od 4 ml otopine PreservCyt Solution dovoljna je za 2 testa, kada se izvodi ručno testiranje. Minimalni volumen koji se može obraditi je 4 ml.
- Pripremite ispitke u otopini PreservCyt Solution u serijama od 36 ili manje; u suprotnom, talozi se mogu odvojiti prilikom pretakanja supernatanta. To je važno za održavanje integriteta staničnog taloga tijekom koraka pretakanja. Ako pripremate dodatne bočice otopine PreservCyt Solution, nemojte započeti s njihovom pripremom sve dok ne dovršite pripremu prve serije.

Priprema reagensa

Upotrijebite ili denaturacijski reagens (Denaturation Reagent, DNR) isporučen s testom *digene* HC2 HPV DNA Test (pogledajte *Priprema i čuvanje reagensa*) ili DNR isporučen s kompletom *digene* HC2 Sample Conversion Kit. Za pripremu DNR-a isporučenog s kompletom *digene* HC2 Sample Conversion Kit dodajte 3 kapi indikatorske boje u bočicu s DNR-om i dobro pomiješajte. Otopina bi trebala biti ujednačene tamnoljubičaste boje. Za utvrđivanje potrebnih volumena pogledajte tablicu 1.

Tablica 1

Zahtjevi volumena: priprema reagensa

Broj testova	Volumen otopine PreservCyt Solution	Volumen pufera za konverziju
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. Označite *digene* HC2 Sample Conversion Tube, konusnu epruvetu od 10 ml Sarstedt ili konusnu epruvetu 15 ml marke VWR ili Corning odgovarajućim identifikacijskim brojem ispitka.
2. Rukovanje ispitcima jedan po jedan:
 - a. Rukom snažnom protresite bočicu s PreservCyt dok stanice ne izgledaju homogeno raspršene.
 - b. Odmah, budući da se stanice vrlo brzo talože, pipetirajte odgovarajući volumen ispitka u otopini PreservCyt u označenu epruvetu. Pipetirajte otopinu PreservCyt Solution na dno konusne epruvete kako biste maksimalno smanjili prijanjanje staničnog materijala unutar epruvete.
3. Dodajte odgovarajući volumen pufera za konverziju uzoraka u svaku epruvetu (pogledajte tablicu 1).
4. Ponovno začepite i dobro pomiješajte sadržaj svake epruvete vrtložnom miješalicom s elementom za pričvršćivanje čašice.

Napomena: Postupak na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 nije odobren za vrtložno miješanje ispitaka u otopini PreservCyt Solution s puferom za konverziju uzoraka prije centrifugiranja te se stoga ne smije upotrebljavati za ovaj korak.

5. Centrifugirajte epruvete u rotoru s nišućim vjedrima pri $2900 \pm 150 \times g$ tijekom 15 ± 2 minuta.

6. Tijekom centrifugiranja pripremite mješavinu transportnog medija za ispitke / denaturacijskog reagensa (Specimen Transport Medium/Denaturation Reagent, STM/DNR) u omjeru 2:1, u skladu s podacima u tablici 2.

Napomena: Svakog dana kada se izvodi test mora se pripremiti svježa mješavina STM/DNR.

- a. Kako biste utvrdili ukupni potrebni volumen mješavine STM/DNR, kao smjernicu upotrijebite početni volumen ispitka u otopini PreservCyt Solution, a zatim pomnožite volumene STM i DNR „po epruveti” brojem ispitaka koji se trebaju obraditi (pogledajte tablicu 2).

Tablica 2
Zahtjevi volumena: STM/DNR

Br. testova	Volumen otopine PreservCyt Solution	Volumen STM po epruveti za konačnu mješavinu STM/DNR*	Volumen DNR po epruveti za konačnu mješavinu STM/DNR*	Mješavina STM/DNR dodana u epruvetu
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	200 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* Volumeni navedeni u ovim stupcima ne bi se trebali izravno dodati epruveti za ispitak.

- b. Dobro pomiješajte otopinu vrtložnim miješanjem.
7. Izvadite epruvete iz centrifuge jednu po jednu te ih postavite na stalak ili na stalak za konverziju. Na dnu svake epruvete trebao bi se nalaziti ružičasti/narančasti talog.

Napomena: Ispitci koji nakon centrifugiranja nemaju vidljivi talog nisu prihvatljivi za testiranje i treba ih baciti.

8. Rukovanje svakom epruvetom pojedinačno:
- a. Skinite čep i odložite ga na čisti papirnati ručnik koji ne otpušta vlakna.
- b. Pažljivo pretočite supernatant.
- c. Zadržite epruvetu u preokrenutom položaju i laganim tapkanjem (otprilike 6 puta) papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna osušite dok tekućina više ne curi iz epruvete. Svaki put upotrijebite čisti dio ručnika. Nemojte dopustiti da stanični talog sklizne niz epruvetu tijekom sušenja tapkanjem.

Napomene:

- Nemojte tapkati na istom dijelu upijajućeg ručnika koji ne otpušta vlakna više od jedanput.
 - Važno je ukloniti maksimalnu količinu otopine PreservCyt Solution tapkanjem. Međutim, normalno je vidjeti ostatak otopine PreservCyt Solution nakon tapkanja.
- d. Postavite epruvetu na stalak ili na stalak za konverziju.

VRTLOŽNO MIJEŠANJE I DENATURACIJA

Postupak ručnog vrtložnog miješanja

1. Dodajte odgovarajući volumen STM/DNR u svaki talog (pogledajte tablicu 2). Ponovno začepite svaku epruvetu i resuspendirajte taloge vrtložnim miješanjem svake epruvete zasebno barem 30 sekundi na postavci najveće brzine. Ako je teško resuspendirati talog, miješajte ga na vrtložnoj miješalici dodatnih 10 – 30 sekundi ili dok talog ne počne plutati odvojen od dna epruvete. Ako talog ostane neotopljen nakon dodatnog vrtložnog miješanja (maksimalno ukupno 2 minute), zabilježite identifikacijski broj ispitka i prijedite na sljedeći korak.
2. Postavite epruvete na stalak.
3. Postavite stalak u vodenu kupelj na temperaturu od 65 ± 2 °C u trajanju od 15 ± 2 minuta. Potvrdite da je razina vode dovoljna da prekrije svu tekućinu u epruvetama.
4. Izvadite stalak s ispitcima iz vodene kupelji i zasebno pomiješajte svaki ispitak na vrtložnoj miješalici u trajanju od 15 – 30 sekundi.

Napomena: Potvrdite da su u tom trenutku svi talozi potpuno resuspendirani. Ispitci koji i dalje imaju vidljivi talog nisu prihvatljivi za testiranje i treba ih baciti.

5. Vratite stalak u vodenu kupelj na temperaturi od 65 ± 2 °C i nastavite s denaturacijom u trajanju od dodatnih 30 ± 3 minuta.
6. Nastavite na korak *Hibridizacija* ili pogledajte *Opcionalna točka zaustavljanja* za pohranu i obradu denaturiranih ispitaka.

Postupak s vrtložnom miješalicom Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Napomene:

- Postupak s vrtložnom miješalicom Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 odobren je za obradu ispitaka u otopini PreservCyt Solution nakon centrifugiranja i pretakanja supernatanta.
 - Samo je vrtložna miješalica MST Vortexer 2 osmišljena za obradu ispitaka u otopini PreservCyt Solution.
 - Stalac za konverziju i poklopac posebno su osmišljeni za *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (konusne epruvete od 15 ml marke VWR ili Corning). Korisnik bi trebao istovremeno upotrebljavati samo jednu vrstu epruvete na stalku za konverziju. Druge marke nisu odobrene za uporabu.
 - Potrebno je strogo pridržavanje navedenih vremena vrtložnog miješanja stalka za konverziju i poklopca.
 - Stalac za konverziju i poklopac ne mogu se upotrebljavati za miješanje kalibratora ili kontrola kvaliteta iz kompleta *digene* HC2 DNA Test. Visina epruveta s ispitcima u mediju STM sprječava odgovarajuće vrtložno miješanje uz primjenu stalka za konverziju i poklopca.
1. Nakon sušenja tapkanjem svake označene konusne epruvete od 15 ml stavite je na odgovarajući položaj na stalku za konverziju.
 2. Dodajte odgovarajući volumen mješavine STM/DNR u svaki talog (tablica 2).
 3. Prekrijte konusne epruvete od 15 ml folijom DuraSeal Tube Sealer Film prevlačenjem folije preko epruveta na stalku.
 4. Postavite poklopac stalka na epruvete prekrivene folijom i učvrstite poklopac dvjema bočnim stezaljkama. Izrežite foliju uređajem za rezanje nakon što je poklopac dobro pričvršćen.
 5. Pomaknite ručicu s crvenom drškom prema gore tako da bude u vodoravnom položaju.

6. Postavite stalak za konverziju i poklopac na vrtložnu miješalicu MST Vortexer 2 tako da se kut stalka za konverziju s najvećim urezom nalazi u prednjem desnom kutu. Postavite stalak i poklopac na platformu MST Vortexer 2 tako da sigurno stoje unutar vodilica. Pričvrstite stalak na mjestu pomicanjem ručice s crvenom drškom prema dolje u okomiti položaj. Time ćete zaključati stalak na mjestu.
7. Potvrdite da je brzina postavljena na 100 (maksimalna brzina) i da je prekidač mehanizma za pulsiranje u ISKLJUČENOM položaju.
8. Okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na UKLJUČENI položaj. **Miješajte epruvete na vrtložnoj miješalici 30 sekundi.**
9. Okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na ISKLJUČENI položaj.
10. Izvadite stalak za konverziju i poklopac s vrtložne miješalice MST Vortexer 2 podizanjem ručice s crvenom drškom.
11. Postavite stalak u vodenu kupelj na temperaturu od 65 ± 2 °C u trajanju od 15 ± 2 minuta. Potvrdite da voda potpuno prekriva svu tekućinu u svim epruvetama.
12. Nakon 15 minuta inkubacije izvadite stalak s ispitcima iz vodene kupelji.
13. Kako biste spriječili prskanje, osušite višak vode na stalku prije nego što ga postavite na MST Vortexer 2.
14. Pričvrstite stalak za konverziju i poklopac na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 kao što je opisano u *koraku 6*.
15. Potvrdite da je brzina postavljena na 100 i okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na UKLJUČENI položaj. **Miješajte epruvete na vrtložnoj miješalici 1 minutu.**
16. Okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na ISKLJUČENI položaj.

Napomena: U postupku na MST Vortexer 2 standardizirano je vrijeme miješanja, vrijeme i proces pa ne postoji potreba za vizualnom provjerom staničnih taloga, kao što je potrebno kada se upotrebljava postupak ručnog vrtložnog miješanja.
17. Vratite stalak u vodenu kupelj na temperaturi od 65 ± 2 °C i nastavite s denaturacijom u trajanju od 30 ± 3 minute.
18. Uklonite stalak iz vodene kupelji, osušite stalak i pričvrstite ga na vrtložnu miješalicu.
19. Okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na UKLJUČENI položaj. Vrtložno miješajte 10 sekundi na maksimalnoj postavci.
20. Okrenite prekidač za napajanje vrtložne miješalice na ISKLJUČENI položaj. Uklonite stalak.
21. Odmah uklonite poklopac stalka i foliju DuraSeal Tube Sealer Film s ispitaka.
22. Nastavite na korak *Hibridizacija* ili pogledajte *Opcionalna točka zaustavljanja* za pohranu i obradu denaturiranih ispitaka.

Postupak pripreme ispitka u tekućini SurePath (SAMO za testiranje DNK visokorizičnog HPV-a)

Nakon citološke obrade učinite sljedeće:

1. Potvrdite da je vidljivi volumen tekućine 2,8 ml.

OPREZ: Ako izgleda da preostali stanični talog sadrži manje od 1 ml tekućine, moguće je da tekućina SurePath Preservative Fluid nije dodana nakon citološke obrade te da **ispitak NIJE prikladan za testiranje na DNK visokorizičnog HPV-a.**
2. Potvrdite da su ispitci dovedeni na sobnu temperaturu.
3. Centrifugirajte uzorak u rotoru s njišućim vjedrima pri 800 ± 15 x g tijekom 10 ± 1 minutu.

4. Izvadite epruvete iz centrifuge.
5. Pažljivo pretočite supernatant odmah nakon centrifugiranja i lagano tapkajte svaku epruvetu (~3 puta) na upijajući papirnati ručnik kako biste uklonili višak tekućine. Promotrite talog u svakoj epruveti.
Nemojte dopustiti da stanični talozi skliznu niz epruvetu tijekom sušenja tapkanjem.

6. Postavite epruvete na stalak.
7. Dodajte 200 µl medija STM u svaki talog s pomoću ponavljajućeg ili prilagodljivog pipetora.

Napomena: Epruvete se smiju miješati bez poklapanja.

8. Resuspendirajte svaki talog miješanjem svake epruvete pojedinačno vrtložnim miješanjem tijekom 15 sekundi pri velikoj brzini. Ako je teško resuspendirati talog, miješajte ga na vrtložnoj miješalici dodatnih 5 do 30 sekundi ili dok talog ne počne plutati odvojen od dna epruvete i počne se otapati.
9. Pipetirajte 100 µl pripremljenog denaturacijskog reagensa (s indikatorskom bojom) u svaki ispitak ponavljajućim ili prilagodljivim pipetorom.

OPREZ: Pazite da ne dodirujete stijenke epruvete jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka.

Ako odlažete preostali denaturacijski reagens u otpad, pridržavajte se primjenjivih lokalnih, državnih i saveznih propisa za odlaganje nagrizajućih tvari.

10. Dobro pomiješajte svaku epruvetu miješajući ih 5 sekundi pojedinačno vrtložnim miješanjem pri velikoj brzini.

Napomena: Epruvete se mogu miješati bez poklapanja.

Označite konusnu epruvetu od 15 ml odgovarajućom identifikacijskom oznakom ispitka i vrstom (na primjer, „SP” za vrstu ispitka u tekućini SurePath) i postavite ih u stalak.

Napomena: Ako upotrebljavate sustav Rapid Capture System za poluautomatiziranu obradu ispitivanja, konusne epruvete od 15 ml marke VWR ili Corning moraju se upotrijebiti za pravilno postavljanje u *digene* Conversion Rack (srebrni stalak).

11. Prenesite cijeli volumen epruvete u konusnu epruvetu od 15 ml s navojnim čepom jednokratnom pipetom za prijenos sa standardnim vrškom od 7 ml ili sličnom¹.
12. Začepite konusne epruvete od 15 ml.
13. Inkubirajte 90 ± 5 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 ± 2 °C.

OPREZ: To je vrijeme inkubacije dulje nego što je potrebno za druge odobrene vrste ispitaka.

14. Ako će se testiranje na HPV provesti istog dana, denaturirajte kalibratore u sklopu *digene* HC2 DNA Test u skladu s ovim uputama za uporabu.
15. Uklonite stalak za uzorke iz vodene kupelji.

Opcionalna točka zaustavljanja

Nakon denaturacije ispitci u mediju STM i konvertirani ispitci u otopini PreservCyt i tekućini SurePath mogu se čuvati na 2 – 8 °C preko noći ili pri -20 °C najviše 3 mjeseca. Za čuvanje u hladnjaku preko noći ispitke možete ostaviti u stalku za konverziju s vraćenom folijom DuraSeal i poklopcem stalka. Prije čuvanja na -20 °C morate ukloniti poklopac stalka i foliju DuraSeal te na epruvete staviti čepove. U oba slučaja, ispitke treba dovesti na sobnu temperaturu (20 – 25 °C) i dobro vrtložno pomiješati prije prelaska na korak hibridizacije.

Napomena: Nemojte čuvati ili transportirati denaturirane ispitke na suhom ledu.

¹ Za testove provjere tvrtke QIAGEN upotrebljavale su se konusne epruvete od 15 ml marke VWR

Najviše 3 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja mogu se provesti s najviše 2 sata na sobnoj temperaturi tijekom svakog ciklusa odmrzavanja.

HIBRIDIZACIJA: METODE S KOKTELOM KOMBINIRANIH PROBA (COMBINED-PROBE COCKTAIL, CPC) I DVIJE PROBE

Napomene:

- Mješavine probe za HPV viskozne su. Potvrdite da se mješavina probe dobro pomiješa i da se potrebna količina u potpunosti pipetira u svaku jažicu mikrotitar pločice. Pogledajte odjeljak *Priprema i čuvanje reagensa*.
- Ako je denaturirani ispitak pohranjen na -20 °C, ostavite ispitak da se odmrzne do temperature od 20 – 25 °C te temeljito pomiješajte ispitak na vrtložnoj miješalici prije nego što nastavite s hibridizacijom.
- Prije uporabe pričekajte barem 60 minuta da se Microplate Heater I zagrije na temperaturu od 65 ± 2 °C. Prema potrebi, za dodatne upute pogledajte *Korisnički priručnik za Microplate Heater I*.

Metoda hibridizacije s pomoću pločice za hibridizaciju i grijača Microplate Heater I

Napomena: Ispitci prikupljeni s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device u STM i obrađeni metodom na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 mogu se hibridizirati **samo** metodom s pomoću grijača Microplate Heater I.

1. Nabavite i označite Hybridization Microplate.
2. Uklonite kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke iz vodene kupelji nakon inkubacije. Ako se upotrebljava Multi-Specimen Tube Vortexer 2, vrtložno miješajte cijeli stalak s ispitcima u mediju STM najmanje 5 sekundi na maksimalnoj postavci brzine. Za ispitke u otopini PreservCyt Solution ili tekućini SurePath miješajte cijeli stalak za konverziju na vrtložnoj miješalici minimalno 10 sekundi na maksimalnoj postavci brzine. Alternativno, pomiješajte svaku epruvetu pojedinačno vrtložnom miješalicom najmanje 5 sekundi.
3. Pipetirajte 75 µl svakog kalibratora, kontrole kvalitete ili ispitka na **dno** prazne jažice Hybridization Microplate prema rasporedu pločice izrađenom pod *Postavljanje*. Spriječite dodirivanje stijenki jažica i ograničite stvaranje mjehurića zraka. Upotrebljavajte čisti ekstra dugačak vršak pipete za svaki prijenos kako biste izbjegli križnu kontaminaciju kalibratora, kontrola kvalitete ili ispitaka. Nemojte uklanjati pribor za uzimanje ispitaka iz epruvete za transport ispitaka. Denaturirani ispitci mogu se začepiti navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka i pohraniti s priborom za uzimanje ispitaka preostalim u epruvetama. Denaturirani ispitci u otopini PreservCyt mogu se ponovno začepiti svojim originalnim čepovima.

Napomena: Može doći do lažno pozitivnih rezultata ako alikvoti ispitka nisu pažljivo preneseni. Tijekom prijenosa ispitka pazite da vršak pipete ne dodiruje unutrašnjost epruvete kada uzimate alikvot od 75 µl.

4. Nakon što prenesete posljednji ispitak, prekrijte pločicu poklopcem pločice i **inkubirajte Hybridization Microplate 10 minuta na temperaturi od 20 – 25 °C**.
5. Alikvotirajte pripremljenu i dobro vrtložno pomiješanu mješavinu probe u jednokratni spremnik za reagense. Pažljivo pipetirajte 25 µl mješavine probe u svaku jažicu koja sadrži kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke 8-kanalnim pipetom uz primjenu svježih vršaka za svaki redak. Pipetirajte volumen probe u svaku jažicu za hibridizaciju te pritom izbjegavajte povratno prskanje. Izbjegavajte dodirivanje stijenki jažica. Postavite poklopac pločice na mikrotitar pločice i ostavite ga dok traje inkubacija u sklopu denaturacije.

6. Poklopcem pločice prekrijte Hybridization Microplate i protresite je na tresilici Hybrid Capture System Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min u trajanju od 3 ± 2 minute. *Boja kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka trebala bi se promijeniti u žutu nakon protresanja.* Jažice koje ostanu ljubičaste možda nisu primile odgovarajuću količinu mješavine probe. Dodajte dodatnih 25 μ l mješavine probe ispitcima koji su ostali ljubičasti i ponovno ih protresite. Ako jažice ostanu ljubičaste boje nakon izvođenja ovog postupka, ispitke treba ponovno testirati.

Napomene:

- Nakon protresanja ispitci u otopini PreservCyt Solution trebali bi poprimiti ružičastu boju umjesto žute.
- Kada stavljate Hybridization Microplate u Microplate Heater I, osigurajte da ne dođe do prskanja.

7. Inkubirajte u grijaču Microplate Heater I zagrijanom na 65 ± 2 °C u trajanju od 60 ± 5 minuta.

Metoda hibridizacije s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji

Napomene:

- Obrada ispitaka prikupljenih s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device u STM s pomoću metode na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 za miješanje i u vodenoj kupelji za hibridizaciju **nije odobrena**. Ispitci prikupljeni s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device u STM i obrađeni metodom na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 mogu se hibridizirati **samo** metodom s pomoću grijača Microplate Heater I.
- Ako je denaturirani ispitak pohranjen na -20 °C, ostavite ispitak da se odmrzne do temperature od $20 - 25$ °C te temeljito pomiješajte ispitak na vrtložnoj miješalici prije nego što nastavite s hibridizacijom.

1. Označite i postavite željeni broj čistih mikroepreveta za hibridizaciju na stalak za mikroeprevete.
2. Uklonite kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke iz vodene kupelji nakon inkubacije. Pomiješajte svaku epruvetu pojedinačno vrtložnom miješalicom najmanje 5 sekundi neposredno prije uklanjanja alikvota.
3. Pipetirajte 75 μ l svakog kalibratora, kontrole kvalitete ili ispitka na **dno** prazne mikroeprevete za hibridizaciju prema rasporedu pločice izrađenom pod Postavljanje. Spriječite dodirivanje stijenki mikroepreveta i ograničite stvaranje mjehurića zraka. Upotrebljavajte čisti ekstra dugačak vršak pipete za svaki prijenos kako biste izbjegli križnu kontaminaciju kalibratora, kontrola kvalitete ili ispitaka. Nije potrebno uklanjati pribor za uzimanje ispitaka iz epruvete za transport ispitaka. Denaturirani ispitci mogu se začepiti navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka i pohraniti s priborom za uzimanje ispitaka preostalim u epruvetama.

Napomena: Može doći do lažno pozitivnih rezultata ako alikvoti ispitka nisu pažljivo preneseni. Tijekom prijenosa ispitka pazite da vršak pipete ne dodiruje unutrašnjost epruvete kada uzimate alikvot od 75 μ l.

4. Nakon što prenesete posljednji ispitak, **inkubirajte mikroeprevete za hibridizaciju 10 minuta na temperaturi od $20 - 25$ °C.**
5. Alikvotirajte pripremljenu i dobro vrtložno pomiješanu mješavinu probe u jednokratni spremnik za reagense. Pažljivo pipetirajte 25 μ l mješavine probe u svaku mikroeprevetu koja sadrži kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke 8-kanalnim pipetom uz primjenu svježih vršaka za svaki redak. Pipetirajte volumen probe u svaku mikroeprevetu za hibridizaciju te pritom izbjegavajte povratno prskanje. Izbjegavajte dodirivanje stijenki epruveta. Pregledajte stalak s donje strane kako biste se uvjerali da se u svim epruvetama nalazi odgovarajuća količina mješavine probe.

6. Prekrijte mikroeprovete folijom za prekrivanje pločica. Postavite poklopac za stalak na stalak. Protresajte stalak za mikroeprovete na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min u trajanju od 3 ± 2 minute. *Boja kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka trebala bi se promijeniti u žutu nakon protresanja.* Epruvete koje ostanu ljubičaste možda nisu primile odgovarajuću količinu mješavine probe. Dodajte dodatnih 25 μ l mješavine probe ispitcima koji su ostali ljubičasti i ponovno ih protresite. Ako epruvete ostanu ljubičaste boje nakon izvođenja ovog postupka, ispitke treba ponovno testirati.

Napomena: Nakon protresanja ispitci u otopini PreservCyt Solution trebali bi poprimiti ružičastu boju umjesto žute.

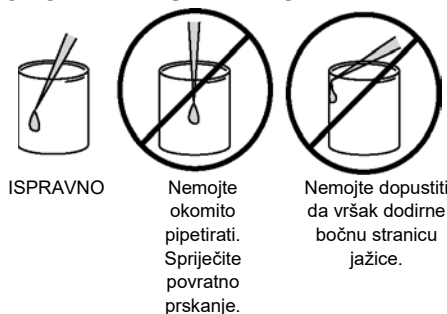
7. Inkubirajte 60 ± 5 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 ± 2 °C. Potvrdite da je razina vode u vodenoj kupelji dovoljna da bi prekrila cijeli volumen mješavine za hibridizaciju. Stalak za mikroeprovete plutat će u vodenoj kupelji.

Napomena: Izradite datoteku rasporeda pločice s pomoću softvera za analizu ispitivanja *digene* ako to već niste učinili ranije.

HVATANJE HIBRIDA

1. S okvira pločice uklonite sve osim potrebnog broja jažica mikrotitar pločice za hvatanje. Vratite neiskorištene jažice mikrotitar pločice u originalnu vrećicu i ponovno je zatvorite. Markerom označite svaki stupac 1, 2, 3. . . . Označite mikrotitar pločicu odgovarajućom identifikacijskom oznakom. Ispitci će se dodati u jažice prema primjeru rasporeda pripremljenom pod Setup (Postavljanje).
2. Pažljivo uklonite Hybridization Microplate koja sadržava kalibratore, kontrole i ispitke iz grijača Microplate Heater I. Odmah uklonite poklopac pločice i stavite na čistu površinu. Alternativno, uklonite stalak za mikroeprovete iz vodene kupelji. Odmah uklonite poklopac stalka i polako postavite foliju za prekrivanje pločica na i preko stalka.
3. Prenesite cijeli sadržaj (približno 100 μ l) kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka iz jažica Hybridization Microplate ili iz mikroeproveta na dno odgovarajuće jažice mikrotitar pločice za hvatanje 8-kanalnim pipetom. Upotrijebite novе vrške pipete na 8-kanalnom pipetoru za svaki preneseni stupac i pričekajte da se svaki vršak pipete dobro ocijedi kako biste osigurali potpuni prijenos ispitka. Po želji, pipetor možete umiriti oslanjajući **sredinu** vršaka pipeta o gornji rub jažica mikrotitar pločice za hvatanje (pogledajte *dijagram 1*).

DIJAGRAM 1: ISPRAVNO PIPETIRANJE



4. Poklopcem pločice ili folijom za prekrivanje pločica prekrijte mikrotitar pločicu za hvatanje i protresite je 60 ± 5 minuta na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min na temperaturi od 20 – 25 °C.
5. Pripremite pufer za pranje i provjerite spremnike za ispiranje i otpad automatiziranog uređaja za pranje pločica tijekom te inkubacije. Pogledajte odjeljak Priprema i čuvanje reagensa.

6. Nakon završetka koraka hvatanja uklonite mikrotitar pločicu za hvatanje s tresilice Rotary Shaker I i pažljivo skinite poklopac pločice ili foliju za prekrivanje pločica. Uklonite tekućinu iz jažica tako da je odlijete u sudoper; potpuno preokrenite pločicu iznad sudopera i snažno je protresite pokretima prema dolje, a pritom budite pažljivi da ne uzrokuje povratno prskanje pretakanjem preblizu dna sudopera. **Nemojte ponovno preokretati pločicu**; osušite čvrstim tapkanjem 2 – 3 puta na čistim papirnatim ručnicima Kimtowels Wipers ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna. Potvrdite da je sva tekućina uklonjena iz jažica te da je vrh pločice suh.

OTKRIVANJE HIBRIDA

Napomene:

- Proizvode dodajte na pločicu u smjeru slijeva udesno s pomoću 8-kanalnog pipetora.
 - Preporučuje se primjena tehnike obrnutog pipetiranja kako bi se poboljšala dosljednost prijenosa reagensa. Ovom tehnikom, vršci pipete prvo se previše pune s pomoću drugog zaustavnika na kontroli za aspiriranje/pipetiranje (klipu) pipetora. Pogledajte postupak opisan u nastavku. Obrišite vrške na jednokratnom spremniku za reagense kako biste uklonili višak reagensa prije pipetiranja u pločicu.
 - Po želji, pipetor možete umiriti oslanjajući sredinu vršaka pipeta o gornji rub jažica mikrotitar pločice. Pazite da ne dodirujete stijenke jažica mikrotitar pločica jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka. Pogledajte gore prikazan dijagram 1.
1. Alikvotirajte odgovarajući volumen detekcijskog reagensa 1 u jednokratni spremnik za reagense (za upute pogledajte odjeljak *Priprema i čuvanje reagensa*). Pažljivo pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 1 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje 8-kanalnim pipetorom i tehnikom obrnutog pipetiranja.

Postupak obrnutog pipetiranja:

- a) Pričvrstite vrške na 8-kanalni pipetor; provjerite jesu li svi vršci čvrsto sjeli.
 - b) Gurnite klip pipetora preko prvog zaustavnika do drugog zaustavnika.
 - c) Uronite vrške u otopinu detekcijskog reagensa 1.
 - d) Polagano otpustite klip i omogućite da otopina napuni vrške.
 - e) Pipetirajte otopinu u jažice mikrotitar pločice (75 µl) tako da pritisnete klip do prvog zaustavnika. Nemojte otpustiti klip dok vršci pipete nisu ponovno uronjeni u otopinu detekcijskog reagensa 1.
 - f) Ponovno napunite vrške i ponavljajte postupak sve dok sve jažice ne budu napunjene. Napunite jažice mikrotitar pločice slijeva nadesno. Provjerite jesu li sve jažice napunjene promatranjem intenziteta ružičaste boje. U svim jažicama intenzitet bi trebao biti sličan.
2. Prekrijte pločice poklopcem pločice ili čistom folijom Parafilm (ili sličnom) te ih inkubirajte 30 – 45 minuta na 20 – 25 °C.

PRANJE

Operite pločicu za hvatanje primjenom jedne od dviju metoda u nastavku.

Metoda s automatiziranim uređajem za pranje pločica

Napomena: Automatizirani uređaj za pranje pločica uvijek držite **UKLJUČENIM**. Potvrdite da je spremnik za ispiranje napunjen, a spremnik za otpad prazan. Automatizirani uređaj za pranje pločica rutinski će ispirati sustav radi čišćenja. Prema potrebi, za dodatne upute pogledajte Korisnički priručnik za automatizirani uređaj za pranje pločica.

PRIJE SVAKE UPORABE:

- Potvrdite da je spremnik za pranje napunjen otopinom pufera za pranje barem do oznake za 1 l. Ako nije, pripremite otopinu pufera za pranje. Pogledajte odjeljak *Priprema i čuvanje reagensa*.
- Potvrdite da je spremnik za ispiranje napunjen deioniziranom ili destiliranom vodom.

- Potvrdite da je spremnik za otpad prazan, a čep dobro pričvršćen.
 - Automatizirani uređaj za pranje pločica automatski će se pripremiti prije svakog pranja i isprati nakon svakog pranja.
1. Uklonite poklopac pločice i postavite pločicu na platformu automatiziranog uređaja za pranje pločica.
 2. Provjerite je li napajanje uključeno i piše li na zaslonu „digene Wash Ready” (Pranje uređaja digene spremno) ili „P1”.

Napomena: Ako se upotrebljava samo djelomični dio trake jažica za hvatanje, prazne jažice mikrotitar pločice trebat ćete postaviti u pločicu za hvatanje kako biste popunili stupac prije pranja.

3. Odaberite broj traka koje je potrebno oprati pritiskom na tipku „Rows” (Redci) te potom pritiskom na „+” ili „-” za prilagodbu. Pritisnite tipku „Rows” (Redci) za povratak na zaslon „digene Wash Ready” (Pranje uređaja digene spremno) ili „P1”.
4. Pritisnite „Start/Stop”(Pokreni/Zaustavi) za početak.
5. Uređaj za pranje provest će šest ciklusa punjenja i aspiriranja koji će trajati približno 10 minuta. Za vrijeme programa bit će kratka pauza tako da nemojte prerano ukloniti pločicu. Kada automatizirani uređaj za pranje pločica završi s pranjem, na zaslonu će pisati „digene Wash Ready” (Pranje uređaja digene spremno) ili „P1”.
6. Uklonite mikrotitar pločicu s uređaja za pranje kada program završi. Pločica bi trebala biti bijela, a u jažicama mikrotitar pločice ne bi trebalo biti ostataka ružičaste tekućine.

Metoda ručnog pranja

1. Uklonite detekcijski reagens 1 s jažica tako da stavite čiste papirnate ručnike Kimtowels Wipers ili slične papirnate ručnike koji ne otpuštaju vlakna na vrh pločice i pažljivo preokrenete. Prije preokretanja potvrdite da je papir u kontaktu s cijelom površinom pločice. Ostavite pločicu da se ocijedi 1 – 2 minute. Dobro je osušite tapkanjem na čistim papirnatim ručnicima Kimtowels Wipers ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna. Pažljivo bacite iskorištene papirnate ručnike kako biste izbjegli kontaminaciju alkalnom fosfatazom u daljnjim koracima.
2. S pomoću uređaja za pranje ručno operite pločicu 6 puta. Svaka jažica pere se dok nije prepunjena kako bi se detekcijski reagens 1 uklonio s vrha jažica. Pranje započinje na jažici A1 te se nastavlja vijugavo udesno i prema dolje. Nakon što su sve jažice napunjene, pretočite tekućinu u sudoper snažnim pokretom prema dolje. Drugo pranje započinje na jažici H12 te se nastavlja vijugavo ulijevo i prema gore. Taj slijed od 2 pranja ponavlja se još 2 puta, što čini ukupno 6 pranja po jažici.
3. Nakon pranja osušite pločicu tako da je preokrenete na čiste papirnate ručnike Kimtowels Wipers ili slične papirnate ručnike koji ne otpuštaju vlakna i potapkate je čvrsto 3 – 4 puta. Zamijenite papirnate ručnike i ponovno je tapkanjem osušite. Ostavite pločicu preokrenutu da se cijedi 5 minuta. Još jedanput tapkanjem osušite pločicu.
4. Pločica bi trebala biti bijela, a u jažicama mikrotitar pločice ne bi trebalo biti ostataka ružičaste tekućine.

AMPLIFIKACIJA SIGNALA

Napomene:

- Upotrijebite novi par rukavica za rukovanje detekcijskim reagensom 2.
 - Alikvotirajte **samo** količinu reagensa potrebnu za izvođenje ispitivanja u jednokratni spremnik za reagense kako biste spriječili kontaminaciju detekcijskog reagensa 2. Pogledajte odjeljak Priprema reagensa. **Nemojte vraćati detekcijski reagens 2 u originalnu bočicu. Bacite neiskorišteni materijal nakon uporabe.**
 - Detekcijski reagens 2 treba dodavati bez prekida. Vrijeme inkubacije svih jažica mora biti što je moguće sličnije.
 - Pazite da ne dodirujete bočne stijenke jažice mikrotitar pločice ili da reagens povratno ne prska po vršcima jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka (pogledajte *dijagram 1*).
1. Pažljivo pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 2 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje 8-kanalnim pipetom kao što je prethodno opisano. *Boja svih jažica mikrotitar pločice trebala bi se promijeniti u žutu.* Provjerite jesu li sve jažice napunjene promatranjem intenziteta boje. U svim jažicama intenzitet bi trebao biti sličan.
 2. Prekrijte mikrotitar pločice poklopcem pločice ili čistom folijom Parafilm (ili sličnom) te ih inkubirajte 15 minuta na 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
 3. Očitajte mikrotitar pločicu na instrumentu DML nakon 15 minuta inkubacije (i ne kasnije od 30 minuta inkubacije).
 4. Protokol softvera specifičan za ispitivanje omogućit će unos informacija bitnih za ispitivanje izravno u softver.
 5. Ako nije korištena cijela mikrotitar pločica, uklonite iskorištene jažice mikrotitar pločice s držača mikrotitar pločice, temeljito isperite držač destiliranom ili deioniziranom vodom, osušite ga i sačuvajte za sljedeće ispitivanje.

KRITERIJI PROVJERE KALIBRACIJE ISPITIVANJA

Provjera kalibracije ispitivanja izvodi se kako bismo se uvjerali da reagensi te priloženi kalibratori i materijali kontrole kvalitete ispravno funkcioniraju, što omogućuje točno određivanje granične vrijednosti ispitivanja. *digene* HC2 HPV DNA Test zahtijeva kalibraciju sa svakim ispitivanjem stoga je potrebno provjeriti svako ispitivanje u skladu s kriterijima u nastavku. Taj postupak provjere nije namijenjen da služi kao zamjena za interno testiranje kontrole kvalitete. Protokoli ispitivanja softvera za analizu ispitivanja *digene* automatski provjeravaju kriterije navedene u nastavku.

1. Negativni kalibrator

Negativni kalibrator mora se testirati u triplicatu sa svakim ispitivanjem u sklopu testa. Srednja vrijednost negativnog kalibratora mora iznositi ≥ 10 i ≤ 250 RLU kako biste mogli nastaviti. Rezultati negativnog kalibratora trebali bi imati koeficijent varijacije (% CV) od ≤ 25 %. Ako % CV iznosi > 25 %, odbacite vrijednost s vrijednosti RLU najdaljoj od srednje vrijednosti kao sumnjivu vrijednost te ponovno izračunajte srednju vrijednost s pomoću preostalih dviju vrijednosti. Ako je razlika između srednje vrijednosti i svake od dviju vrijednosti ≤ 25 %, nastavite na korak 2. U suprotnom, provjera kalibracije ispitivanja nije važeća i ispitivanje je potrebno ponoviti za sve ispitke pacijenta. U skladu s time, rezultate ispitaka pacijenata ne treba prijaviti.

2. Kalibratori

Kalibratori se moraju testirati u triplicatu sa svakim ispitivanjem. Za CPC oba se kalibratora moraju testirati u triplicatu. Rezultati kalibratora trebali bi pokazivati koeficijent varijacije (% CV) od ≤ 15 %. Za CPC % CV za LRC, HRC i kombinaciju LRC-HRC trebao bi biti ≤ 15 % % CV. Ako % CV iznosi > 15 %, odbacite vrijednost kalibratora s vrijednosti RLU najdaljoj od srednje vrijednosti kao sumnjivu vrijednost te ponovno izračunajte srednju vrijednost s pomoću preostalih vrijednosti kalibratora. Može se izbrisati samo 1 LRC i 1 HRC replikat. Ako je % CV kalibratora ≤ 15 %, nastavite na korak 3. U suprotnom, provjera kalibracije ispitivanja nije važeća i ispitivanje je potrebno ponoviti za sve ispitke pacijenta. U skladu s time, rezultate ispitaka pacijenata ne treba prijaviti.

Gore opisanu provjeru kalibracije ispitivanja za kalibratore automatski izvodi softver za analizu ispitivanja *digene*, a rezultati se ispisuju u izvješće o analizi podataka. **Protokoli za analizu ispitivanja *digene* za HPV automatski provjeravaju iznosi li % CV kalibratora za niskorizične i visokorizične tipove HPV-a ≤ 15 %.** Međutim, u verzijama v1.0.2 i v1.0.3 softvera za analizu ispitivanja *digene* ispitivanje se NEĆE smatrati nevažećim osim ako % CV iznosi > 25 % za kalibratore. Stoga korisnik mora ručno provjeriti je li % CV izračunat u softveru za analizu ispitivanja *digene* ≤ 15 % te nastaviti na način opisan pod Situacija 1 u tablici u nastavku. Ako je % CV replikata kalibratora između 15 i 25, pogledajte upute pod Situacija 2 ili 3 u tablici u nastavku te provedite navedenu radnju korisnika.

Situacija	Prijavite % CV za LRC i/ili HRC replikate	Radnja koju poduzima softver za analizu ispitivanja <i>digene</i>	Radnja korisnika
1	≤ 15 %	Ispitivanje je prijavljeno kao „Valid” (Važeće)	Rezultati se mogu prijaviti; nije potrebna nikakva druga radnja.
2	Između 15 % i 25 %	Nisu uklonjene nikakve sumnjive vrijednosti i ispitivanje je prijavljeno kao „Valid” (Važeće)	Odbacite vrijednost RLU kalibratora najdalju od srednje vrijednosti. Ponovno izračunajte % CV kalibratora s pomoću dviju preostalih vrijednosti. Ako je % CV preostalih vrijednosti RLU > 15 %, ispitivanje je nevažeće. Rezultate ne smijete prijaviti. Ako je % CV preostalih vrijednosti RLU ≤ 15 %, ponovno izračunajte graničnu vrijednost ispitivanja, a zatim ponovno izračunajte omjer RLU / granične vrijednosti za svaki ispitak primjenom te granične vrijednosti. Te ponovno izračunate vrijednosti mogu se prijaviti.
3	Između 15 % i 25 %	Uklonjena je jedna sumnjiva vrijednost po kalibratoru i ispitivanje je prijavljeno kao „Valid” (Važeće)	Ispitivanje je nevažeće. Rezultati se ne smiju prijaviti. Ispitivanje treba ponoviti.
4	> 25 %	Uklonjena je jedna sumnjiva vrijednost i ispitivanje je prijavljeno kao „Invalid” (Nevažeće)	Ispitivanje je nevažeće. Rezultati se ne smiju prijaviti. Ispitivanje treba ponoviti.

Kako bi ručno izračunao % CV što je potrebno u gore opisanoj situaciji 2, korisnik treba podijeliti standardnu devijaciju (Standard Deviation, STDEV) (n-1) preostalih vrijednosti RLU replikata sa srednjom vrijednosti preostalih vrijednosti RLU replikata (LRC ili HRC ili oboje) te taj rezultat pomnožiti sa 100.

Kako bi izračunao % CV s pomoću programa Microsoft® Excel® (isporučen s prethodnom verzijom softvera za analizu ispitivanja *digene*), korisnik može izračunati standardnu devijaciju replikata kalibratora formulom *STDEV* i odrediti srednju vrijednost RLU kalibratora formulom *AVERAGE*. Nakon što su dobivene te dvije vrijednosti, podijelite *STDEV* s *AVERAGE* te rezultat pomnožite sa 100 kako biste dobili % CV.

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

Ako imate pitanja o izračunu vrijednosti % CV, ponovnom izračunu granične vrijednosti ispitivanja ili ponovnom izračunu omjera RLU / granična vrijednost za ispitke, nazovite lokalnog predstavnika tvrtke QIAGEN.

Kako biste odredili obnovljivost kalibratora i utvrdili koliko su često potrebni ručni ponovni izračuni, sastavljeni su rezultati iz tri kliničke procjene koje su uključivale 152 obrade ispitivanja s pomoću testa *digene* HC2 HPV DNA Test. Rezultati su pokazali da je prosječna vrijednost % CV za te 152 obrade bila 8,1. Uzimajući u obzir sva tri replikata kalibratora po obradi testa, obnovljivost kalibratora od > 15 % CV uočena je za samo 17 od 152 obrade (11,2 %), a 10 od tih 17 obrada testova dale su % CV između 15 i 25 (situacija 2). Za 17 obrada testova koje su dale % CV > 15 uklonjena je jedna sumnjiva vrijednost i % CV ponovno je izračunat. U skladu s radnjom korisnika za situaciju 2, samo je jedan % CV za obrade testova ostao > 15, zbog čega je ta obrada testa nevažeća. Vrijednosti % CV za preostalu 151 obradu testova izračunate su i dobiven je prosjek % CV od 6,0.

- Rezultati srednje vrijednosti kalibratora (LRC ili HRC) i srednje vrijednosti negativnog kalibratora (Negative Calibrator, NC) upotrebljavaju se za izračun omjera LRC/NC ili HRC/NC za svaku probu. Ranije verzije (V1.0.2 i V1.0.3) protokola softvera za analizu ispitivanja *digene* točno ne izračunavaju prihvatljive raspone. Ti omjeri moraju ispunjavati sljedeće kriterije kako bi se provjerila kalibracija ispitivanja prije nego što se rezultati ispitaka mogu tumačiti:

METODA CPC	METODA S DVIJE PROBE
Prihvatljivi rasponi provjere kalibracije ispitivanja	Prihvatljivi rasponi provjere kalibracije ispitivanja
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (strana LR)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (strana HR)
$2,0 \leq (LRC \text{ i } HRC)\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Izračunajte odgovarajuće omjere $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$ ili $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ za svaki od kompleta proba. Ako su omjeri $\geq 2,0$ i ≤ 15 , nastavite na sljedeći korak. Ako je bilo koji od omjera $< 2,0$ ili > 15 , **ispitivanje je nevažeće za tu specifičnu probu i mora se ponoviti**. Ponovno obradite sve ispitke pacijenata unutar obrade.

Napomena: Prihvatljivi rasponi za negativni kalibrator i pozitivne kalibratore utvrđeni su samo za instrument DML.

IZRAČUN GRANIČNE VRIJEDNOSTI

Nakon što je ispitivanje odobreno prema gore navedenim kriterijima, granične vrijednosti za određivanje pozitivnih ispitaka sljedeće su:

1) Metoda s koktelom kombiniranih proba: $(LRC \text{ replikati} + HRC \text{ replikati})$
br. replikata

2) Metoda s dvije probe: Granična vrijednost probe za niskorizične tipove HPV-a = $LRC\bar{x}$
Granična vrijednost probe za visokorizične tipove HPV-a = $HRC\bar{x}$

Primjer izračuna graničnih vrijednosti					
za:		Metoda s dvije probe primjenom probe za niskorizične ili visokorizične tipove HPV-a	Metoda CPC primjenom probe za niskorizične tipove HPV-a	Metoda CPC primjenom probe za visokorizične tipove HPV-a	Metoda CPC primjenom kombinirane probe za HPV
	RLU vrijednosti NC-a	Vrijednosti RLU za LRC ili HRC	Vrijednosti RLU za LRC	Vrijednosti RLU za HRC	Vrijednosti RLU za LRC i HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Srednja vrijednost 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/P	3,31	3,54	3,00	3,32

Srednja vrijednost RLU za pozitivni kalibrator određuje graničnu vrijednost ispitivanja. Stoga pozitivna granična vrijednost iznosi (LRC) = 318.

* Srednja vrijednost % CV za svih 6 replikata iznosila je 16,8. Replikat s vrijednosti od 235 izbrisan je kao sumnjiva vrijednost. % CV preostalih replikata iznosio je 13,0 sa srednjom vrijednosti od 318,8. Početna vrijednost % CV za HRC iznosila je 11,5.

Sve vrijednosti RLU ispitaka trebale bi se konvertirati u omjer s odgovarajućom graničnom vrijednosti. Na primjer, sva ispitivanja testirana probom za niskorizične tipove HPV-a trebala bi se izraziti kao RLU / granična vrijednost za niskorizične tipove za ispitke. Isto se može učiniti s ispitcima testiranim s probom za visokorizične tipove HPV-a ili s CPC probom.

Napomene: Vrijednosti RLU/CO i pozitivni/negativni rezultati za sve ispitke izvještavaju se u *Izvešću o analizi podataka* u instrumentu DML.

Za primjene na instrumentu Rapid Capture System, protokol softvera za HPV sustava RCS programiran je tako da primijeni faktor prilagodbe kalibracije (Calibration Adjustment Factor, CAF) od 0,8 na srednju vrijednost RLU važećih replikata pozitivnog kalibratora. Taj je CAF nužan kako bi radne značajke ispitivanja ostale ekvivalentne postupku ručnog testiranja. Ta se promjena primjenjuje samo na ispitivanja koja se provode s pomoću aplikacije na instrumentu Rapid Capture System. Stoga je neophodno odabrati ispravan protokol softvera koji će se upotrebljavati sa svakom specifičnom metodom testa kako bi se dobili točni rezultati testa. Sve vrijednosti RLU ispitaka trebale bi se konvertirati u omjer s odgovarajućom graničnom vrijednosti (Cutoff, CO). Na primjer, sva bi se ispitivanja trebala izraziti kao vrijednost RLU/CO ispitka.

KONTROLA KVALITETE

Uzorci kontrole kvalitete isporučuju se s testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Pogledajte odgovarajući korisnički priručnik za upute o tome kako unijeti brojeve serija i rokove trajanja kontrola kvalitete. Te kontrole kvalitete moraju biti uključene u svaku obradu testa, a vrijednost RLU/CO svake kontrole kvalitete mora biti unutar prihvatljivih raspona navedenih u nastavku kako bi se obrada smatrala važećom. **Ako kontrole kvalitete nisu unutar tih raspona, ispitivanje je nevažeće i potrebno ga je ponoviti.** U skladu s time, nikakvi rezultati pacijenta ne bi se trebali prijaviti za nevažeću obradu.

Kontrola kvalitete	Tip HPV-a	Očekivani rezultat (RLU / granična vrijednost) Proba za niskorizične tipove HPV-a			
		Minimalno	Maksimalno	Prosjek	% CV
QC1-LR	Niskorizični (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Visokorizični (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Kontrola kvalitete	Tip HPV-a	Očekivani rezultat (RLU / granična vrijednost) Proba za visokorizične tipove HPV-a			
		Minimalno	Maksimalno	Prosjek	% CV
QC1-LR	Niskorizični (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Visokorizični (HPV 16)	2	8	5,0	25

Kontrola kvalitete	Tip HPV-a	Očekivani rezultat (RLU / granična vrijednost) CPC proba za HPV			
		Minimalno	Maksimalno	Prosjek	% CV
QC1-LR	Niskorizični (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Visokorizični (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Materijali kontrole kvalitete isporučeni u kompletu klonirane su ciljne sekvence DNK HPV-a koje ne potječu od HPV-a divljeg tipa. To je ista vrsta materijala koja se upotrebljava za kalibratore isporučene s *digene* HC2 HPV DNA Test.
2. Taj materijal kontrole kvalitete neće služiti kao odgovarajuća kontrola za obradu otopine PreservCyt Solution ili tekućine SurePath Preservative Fluid.
3. Kontrole kvalitete isporučene s ovim kompletom testa moraju se upotrebljavati za internu kontrolu kvalitete. Dodatne kontrole kvalitete mogu se testirati u skladu sa smjernicama ili zahtjevima lokalnih i/ili državnih propisa ili akreditacijskih organizacija.

TUMAČENJE REZULTATA ISPITAKA

Napomena: Granična vrijednost ispitivanja za *digene* HC2 HPV DNA Test od 1 pg/ml jednaka je 100.000 HPV kopija/ml ili 5.000 HPV kopija po ispitivanju.

1. Ispitci u mediju STM s omjerima RLU / granična vrijednost $\geq 1,0$ **samo s probom za niskorizične tipove HPV-a** smatraju se „pozitivnima” na 1 ili više tipova HPV-a 6, 11, 42, 43 ili 44.
2. Ispitci u mediju STM s omjerima RLU / granična vrijednost $\geq 1,0$ **samo s probom za visokorizične tipove HPV-a** smatraju se „pozitivnima” na 1 ili više tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.
3. Prilikom testiranja ispitaka u otopini PreservCyt, ako je omjer RLU/CO ispitka $\geq 1,0$ i $< 2,5$, tvrtka QIAGEN preporučuje ponovno testiranje ispitka. Ako je početni rezultat ponovnog testiranja pozitivan ($\geq 1,0$ RLU/CO), ispitak se može prijaviti kao pozitivan i nije potrebno izvoditi nikakvo dodatno ponovno testiranje. Međutim, ako je prvi rezultat ponovnog testiranja negativan ($< 1,0$), treba provesti drugo ponovno testiranje (treći rezultat) radi dobivanja konačnog rezultata. Rezultat drugog ponovnog testiranja smatra se konačnim rezultatom i treba se prijaviti.
4. Ako je omjer RLU / granična vrijednost blizu, ali manji od 1,0, a sumnja se na infekciju visokorizičnim tipom HPV-a, razmotrite alternativne metode testiranja i/ili ponovno uzimanje ispitka.
5. Za ispitke u mediju STM s omjerima RLU / granična vrijednost $\geq 1,0$ za probu za niskorizične tipove HPV-a i probu za visokorizične tipove HPV-a smatra se da su „Positive” (Pozitivno) na 1 ili više tipova HPV-a iz svake skupine proba.
6. Za ispitke u mediju STM s omjerima RLU / granična vrijednost $\geq 1,0$ samo s probom za visokorizične tipove HPV-a smatra se da su „Positive” (Pozitivno) na 1 ili više tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.
7. Za ispitke s omjerima RLU / granična vrijednost $< 1,0$ za koktel kombiniranih proba ili za probu za niskorizične tipove HPV-a i probu za visokorizične tipove HPV-a smatra se da su „Negative” (Negativno) ili se smatra da „No HPV DNA detected” (DNK HPV-a nije otkriven) za 18 testiranih tipova HPV-a. Sekvenci DNK HPV-a ili nema ili su razine DNK HPV-a ispod granice detekcije ispitivanja.

PODACI KOJI PODRŽAVAJU INDIKACIJU ZA TESTIRANJE NA NISKORIZIČNI I VISOKORIZIČNI TIP HPV-A

Klinički probir pacijenata s rezultatima papa testa ASC-US za utvrđivanje potrebe za upućivanjem na kolposkopiju

Kliničko ispitivanje naziva „Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears” (Korisnost ispitivanja na DNK HPV-a radi trijaže žena s graničnim rezultatima papa testa) provedeno je 1996. godine u SAD-u pod vodstvom instituta Kaiser Foundation Research Institute i grupe Kaiser Permanente Medical Group. Cervikalni ispitci za rutinske papa testove i za *digene* HC2 HPV DNA Test uzeti su od žena koje su se liječile u nekoliko objekata klinike Kaiser. Početni papa testovi procijenjeni su prema Bethesda klasifikaciji. Za ekvivalentnu terminologiju povezanu s probirom raka vrata maternice u Europskoj zajednici pogledajte Europske smjernice za osiguranje kvalitete probira raka vrata maternice⁴⁰. Žene (u dobi od 15 godina ili starije) s rezultatima papa testa koji su ukazivali na atipične stanice neodređenog značenja (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) bile su ponovno pozvane na kolposkopiju i biopsiju. Ispitke dobivene kolposkopski navođenom histološkom obradom pregledali su patolozi i postavljena je početna dijagnoza. Svaki histološki ispitak također je ponovno pregledao neovisni patolog, a u slučaju nepodudaranja između početnog pregleda i neovisnog pregleda konačnu je odluku donio treći patolog.

Testiranje na DNK HPV-a provedeno je na početnom ispitku i upotrebljavala se samo proba za visokorizične tipove HPV-a. Testiranje na DNK HPV-a provedeno je s prototipom testa *digene* HC2 HPV DNA Test koji je sadržavao probe za 11 od 13 tipova HPV-a uključenih u probu za visokorizične tipove HPV-a, ali nije sadržavao probe za tipove HPV-a 59 i 68. Za takvu se razliku ne bi očekivalo da će rezultirati znatno različitim profilima radnih značajki za dva ispitivanja.

Rezultati testa na HPV i histološke dijagnoze dobiveni su od 885 žena s rezultatima papa testa ASC-US. Testiranje je u većine pacijenata provedeno s ispitcima prikupljenima u STM i PreservCyt Solution. Zbog sličnosti između radnih značajki testa *digene* HC2 HPV DNA Test za ispitke u mediju STM i za ispitke u otopini PreservCyt, radne značajke ispitivanja prikazane su samo za otopinu PreservCyt Solution.

Tablica 3 pokazuje da je među osobama s rezultatom referalnog papa testa ASC-US negativna prediktivna vrijednost testa *digene* HC2 HPV DNA Test za otkrivanje HSIL-a ili višeg stupnja bolesti pri kolposkopiji iznosila 99 %.

Tablica 3
Usporedba testa *digene* HC2 HPV DNA Test i konsenzusne histološke obrade
Populacija upućena zbog rezultata papa testa ASC-US
Ispitivanje Kaiser, ispitci u otopini PreservCyt Solution

	HSIL ili više u vrijeme kolposkopije			Ukupno
		+	-	
Visokorizični HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Ukupno	71	814	885

Osjetljivost $[TP/(TP+FN)] = 93,0\%$ (66/71)

95-postotni CI = od 84,3 do 97,7

Specifičnost $[TN/(TN+FP)] = 61,1\%$ (497/814)

95-postotni CI = od 57,7 do 64,4

Prevalencija bolesti = 8,0 % (71/885)

Pozitivna prediktivna vrijednost ispitivanja = 17,2 % (66/383)

Negativna prediktivna vrijednost ispitivanja = 99,0 % (497/502)

Tablica 4 pokazuje teoretske pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti temeljene na različitim prevalencijama za otkrivanje HSIL-a ili bolesti višeg stupnja nakon početnog rezultata ASC-US na temelju rezultata probe za visokorizične tipove HPV-a.

Tablica 4
Teoretski pozitivna i negativna prediktivna vrijednost
Proba za visokorizične tipove HPV-a
Rezultati papa testa ASC-US

Teoretska prevalencija za HSIL	Početni rezultat papa testa ASC-US	
	Pozitivna prediktivna vrijednost ispitivanja	Negativna prediktivna vrijednost ispitivanja
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

Tablica 5 pokazuje razlike između različitih dobnih skupina uključenih u ovo ispitivanje:

Tablica 5
Podaci ispitivanja Kaiser
Radne značajke testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u
odnosu na rezultate konsenzusne histološke obrade (HSIL)
Značajke specifične za dob

	Dob < 30	Dob 30 – 39	Dob > 39
n	287	233	365
Prevalencija bolesti (%)	12,2	11,2	2,7
Osjetljivost (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95-postotni interval pouzdanosti	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-postotni interval pouzdanosti	25,7 – 37,5	59,3 – 72,6	74,6 – 83,3
Negativna prediktivna vrijednost (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Klinička osjetljivost i specifičnost za utvrđivanje rizika od bolesti visokog stupnja u žena čiji rezultati papa testa pokazuju LSIL ili HSIL

Multicentrično kliničko ispitivanje u kojem se upotrebljava *digene* HC2 HPV DNA Test provedeno je na ispiscima prikupljenima iz nekoliko velikih kolposkopskih klinika u sklopu bolnica i medicinskih centara s velikom prevalencijom bolesti vrata maternice i HPV-a (3 centra) na zapadu i jugu SAD-a. Testiranje na HPV provedeno je u 3 ispitivačka centra koja nisu povezana s kolposkopskim klinikama u kojima su ispiti prikupljeni. Populacija za ovo kliničko ispitivanje obuhvaćala je žene kojima su dijagnosticirani LSIL ili HSIL na temelju nedavno provedenog papa testa i koje su upućene na kolposkopsku kontrolu. Od 702 uključenih pacijenata, 327 ih je imalo rezultate papa testa veće od ASC-US i dostupne adekvatne informacije; 96 ih je imalo konačan status bolesti HSIL ili viši. Ispitci oljuštenih cervikalnih stanica prikupljeni su priborom *digene* HC2 DNA Collection Device te stavljeni u STM ili četkicom za prikupljanje i isprani u otopini PreservCyt Solution. Ispitci su prikupljeni za vrijeme kolposkopije. Ispitci su testirani primjenom testa *digene* HC2 HPV DNA Test, a njihovi su rezultati uspoređeni sa statusom bolesti

utvrđenim za svakog pacijenta. Status bolesti temeljio se na rezultatima histološke procjene. Međutim, kada je histološka procjena bila negativna ili u nedostatku rezultata histološkog rezultata, status bolesti utvrđen je citološkom obradom u vrijeme kolposkopskog pregleda (pogledajte *tablicu 6*). *digene* HC2 HPV DNA Test proveden je u 3 velika metropolitanska medicinska centra koja nisu povezana s centrima u kojima su se prikupljali ispitci tijekom kolposkopije. Citološka obrada provedena je u referentnom patološkom laboratoriju, dok je histološka obrada provedena u institucijama u kojima se provodi kolposkopija. Rezultati testa uspoređeni su sa statusom bolesti kako bi se ocijenile osjetljivost, specifičnost te negativne i pozitivne prediktivne vrijednosti testa za otkrivanje neoplazije vrata maternice visokog stupnja. Zbog sličnosti između radnih značajki testa *digene* HC2 HPV DNA Test za ispitke u mediju STM i PreservCyt, radne značajke ispitivanja prikazane su samo za otopinu PreservCyt.

Nije opažena razlika između rezultata probe za visokorizične tipove HPV-a za ispitke u mediju STM te ispitke u otopini PreservCyt Solution. Tablica u nastavku prikazuje rezultate dobivene probom za visokorizične tipove HPV-a u ovoj populaciji:

Tablica 6
Algoritam statusa bolesti pacijenta

Citološki nalaz	Nalaz histološke obrade	Status bolesti
NEG.	NEG. ili nije provedeno*	NEG.
LSIL	NEG.	LSIL
HSIL	NEG.	HSIL
Rak	NEG.	HSIL+
NEG.	LSIL	LSIL
LSIL	Nije provedeno*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Rak	LSIL	LSIL
NEG.	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Nije provedeno*	HSIL
Rak	HSIL	HSIL
NEG.	Rak	HSIL+
LSIL	Rak	HSIL+
HSIL	Rak	HSIL+
Rak	Nije provedeno*	HSIL+
Rak	Rak	HSIL+

* Biopsija i/ili endocervikalna kiretaža (Endocervical Curettage, ECC) nisu provedene jer nisu primijećene abnormalnosti prilikom kolposkopije ili rezultat histološke obrade nije bio dostupan.

Tablice 7 i 8 predstavljaju radne značajke testa *digene* HC2 HPV DNA Test utvrđene na 327 ispitaka PreservCyt, od kojih je 96 prikupljeno od žena kojima je dijagnosticirana cervikalna bolest visokog stupnja. Usporedbe su obavljene uključivanjem svih pacijenata uključenih u ispitivanje s abnormalnim rezultatima referalnog papa testa. Usporedbe su prikazane za ispitke u otopini PreservCyt testirane s pomoću probe za visokorizične tipove HPV-a.

Tablica 7
Rezultati probe za visokorizične tipove HPV-a

Rezultati referalnog papa testa	Konačni status bolesti						Ukupno
	HSIL		LSIL		Negativno		
	POZ.	NEG.	POZ.	NEG.	POZ.	NEG.	
Rezultati za visokorizične tipove HPV-a							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Ukupno	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Tablica 8 pokazuje da je test *digene* HC2 HPV DNA Test uz primjenu probe za visokorizične tipove HPV-a pokazao približno 93 % ukupne osjetljivosti za identificiranje žena s neoplazijom visokog stupnja u populaciji upućenoj na kolposkopiju na temelju dijagnoze papa testa LSIL, HSIL ili slične. Test je također pokazao negativnu prediktivnu vrijednost od približno 93 % u toj populaciji.

Tablica 8
Radne značajke testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test među pacijentima čiji je rezultat referalnog papa testa LSIL ili viši, a konačni status bolesti HSIL

Rezultat probe za visokorizične tipove HPV-a	Rezultat referalnog papa testa LSIL ili HSIL → Bolest stupnja HSIL			Ukupno
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Ukupno		96	231	327

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

95-postotni CI = od 85,6 do 97,0

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

95-postotni CI = od 33,1 do 46,0

Prevalencija bolesti za referalni LSIL do konačnog HSIL-a = 21,4 %

Prevalencija bolesti za referalni HSIL do konačnog HSIL-a = 46,6 %

Ukupna pozitivna prediktivna vrijednost = 38,9 % (89/229)

Ukupna negativna prediktivna vrijednost = 92,8 % (91/98)

Dok je specifičnost testa *digene* HC2 HPV DNA Test naizgled bila dosta niska, ne očekuje se stroga korelacija između odsutnosti neoplazije i negativnog rezultata na HPV. DNK HPV-a može biti prisutan u žena kod kojih nije došlo do progresije na bolest višeg stupnja. Zapravo, kada je provedeno ispitivanje na HPV primjenom lančane reakcije polimerazom (Polymerase Chain Reaction, PCR) (ispitivanje samo u svrhu istraživanja) na ispincima s pozitivnim rezultatima na HPV čiji je odgovarajući status bolesti bio niži od neoplazije niskog stupnja, približno 75 % bilo ih je pozitivno.

Tablica 9 pokazuje teoretski pozitivnu i negativnu prediktivnu vrijednost probe za visokorizične tipove HPV-a za početni rezultat LSIL ili HSIL za koji se kolposkopijom utvrdilo da je HSIL ili teži oblik bolesti.

Tablica 9
Teoretska pozitivna i negativna prediktivna vrijednost probe za visokorizične tipove HPV-a za početne rezultate papa testa LSIL ili HSIL

Teoretska prevalencija za HSIL	Početni rezultat papa testa LSIL ili HSIL	
	Pozitivna prediktivna vrijednost ispitivanja	Negativna prediktivna vrijednost ispitivanja
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

PODACI KOJI PODRŽAVAJU INDIKACIJU ZA PRIMARNI PROBIR ZA VISOKORIZIČNI HPV

Kliničke radne značajke prilikom probira pacijenata s normalnim rezultatima papa testa kao pomoć pri procjeni rizika za skrb o pacijentima

Rezultati osam neovisnih kliničkih ispitivanja koja su provele istaknute medicinske, akademske i vladine institucije u centrima u SAD-u i u inozemstvu opisani su u nastavku. Ispitivanja su se koristila utvrđenim metodama papa testa koje se primjenjuju u državama u kojima su se ispitivanja provodila. U svim slučajevima osim dvaju za tumačenje rezultata papa testova primjenjivan je sustav ocjenjivanja Bethesda. Osim toga, bolest vrata maternice visokog stupnja dijagnosticirana je primjenom kolposkopski navođene biopsije za svako ispitivanje. Ta su ispitivanja ocjenjivala kliničku korisnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u usporedbi s papa testom za starije žene (općenito starije od 30 do 35 godina). Sva ispitivanja osim jednog također su provela prospektivno testiranje na HPV s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Ispitivanja su predstavljala presječna ispitivanja opće populacije u svrhu probira koja upotrebljavaju test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, osim ako je u nastavku drugačije navedeno. Kako je naznačeno, 2 od 8 ispitivanja u sklopu probira provedena su u SAD-u, 2 u Europi, 2 u Latinskoj Americi, 1 u Africi i 1 u Aziji.

Radne značajke testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test promatrane u šest presječnih ispitivanja sažete su u tablicama 10 i 11 za žene u dobi od 30 godina i više kojima je dijagnosticirana histološki potvrđena cervikalna neoplazija visokog stupnja, koja je (definirana kao CIN3 ili još teži oblik).

Tablica 10
Procjena radnih značajki testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test
Osjetljivost i specifičnost

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

† Podaci testa HC2 ako su bili dostupni, u suprotnom su se upotrebljavali HCS podaci; podaci su kombinirani.

Tablica 11
Procjena radnih značajki testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test
 Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost

Populacija	n		Prevalencija (%)	Pozitivna prediktivna vrijednost (%)			Negativna prediktivna vrijednost (%)		
				Samo papa test	Samo HPV	HPV + papa test	Samo papa test	Samo HPV	HPV + papa test
Zapadna Europa 1	7592		CIN 3 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-postotni CI	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 1	6115		1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		95-postotni CI	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-postotni CI	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-postotni CI	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-postotni CI	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
SAD 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-postotni CI	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

† Podaci testa HC2 ako su bili dostupni, u suprotnom su se upotrebljavali HCS podaci; podaci su kombinirani.

U svim ispitivanjima postoji ujednačeno i često vrlo značajno poboljšanje osjetljivosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u odnosu na samo papa test. Kao što je slučaj i s osjetljivošću, negativna prediktivna vrijednost (Negative Predictive Value, NPV) HPV-a premašuje samo papa test u svim slučajevima, približavajući se postotku od 100 %. Taj NPV pokazuje veliku vjerojatnost za odsutnost bolesti vrata maternice visokog stupnja ili raka u žena s normalnim citološkim nalazima koje nemaju infekciju HPV-om.

Iako je specifičnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test niža nego samo za papa test, analiza odnosa vjerojatnosti pokazala je da opaženo smanjenje specifičnosti nije dovoljno značajno da bi utjecalo na kliničku korisnost primjene testa za identificiranje žena koje imaju malen ili nikakav rizik od imanja ili razvijanja bolesti vrata maternice. Ipak, važno je da se odluka o upućivanju pacijenta na kolposkopiju temelji na svim kliničkim podacima i informacijama o riziku te povijesti bolesti pacijenta koji su dostupni liječniku. Važne varijable uključuju povijest infekcija HPV-om i/ili abnormalne rezultate papa testova, dob u kojoj je pacijent imao prvi spolni odnos, broj seksualnih partnera i druge istodobno prisutne spolno prenosive bolesti.^{27,28}

Iako prevalencija bolesti visokog stupnja ne varira znatno među ispitivanjima u kojima su određivane radne značajke, prevalencija infekcije HPV-om u populaciji može utjecati na radne značajke i obično varira ovisno o populaciji pacijenata. Osim toga, pokazalo se da se prevalencija infekcije HPV-om drastično smanjuje s dobi.^{28, 30-37, 41} Pozitivne prediktivne vrijednosti smanjuju se kod testiranja populacija s niskom prevalencijom ili osoba kod kojih postoji mali rizik od infekcije.

Longitudinalne analize provedene su primjenom rezultata dvaju ispitivanja; jednog koje je u SAD-u proveo američki Nacionalni institut za rak (National Cancer Institute, NCI) u Portlandu, Oregon, i drugog provedenog u Francuskoj u laboratoriju Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims. Te su longitudinalne analize provedene kako bi se dokazalo da pacijenti s negativnim rezultatom papa testa / negativnim rezultatom na HPV imaju manji rizik od obolijevanja od bolesti vrata maternice u usporedbi s tradicionalno definiranim niskorizičnim ženama čiji status HPV-a nije poznat i u usporedbi s pacijentima s negativnim rezultatom papa testa / pozitivnim rezultatom na HPV.

Rezultati tih longitudinalnih analiza prikazani su u tablicama 12 i 13 u nastavku.

Tablica 12
Sažetak rezultata: Ispitivanja provedena u institutu NCI i Francuskoj
Relativan rizik bolesti visokog stupnja

Ispitivana skupina	Dob	Klasifikacija niskog rizika	n	Slučajevi CIN 3+	Stopa (na 100 pacijent-godina)	Relativni rizik (95-postotni CI)
NCI	30 i više	Papa test normalan, HPV negativan	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Uzastopni normalni papa testovi*	9429	19	0,048	1,000
	Sve	Papa test normalan, HPV negativan	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Uzastopni normalni papa testovi*	13.392	44	0,082	1,000
Francuska	30 i više	Papa test normalan, HPV negativan	1690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Uzastopni normalni papa testovi*	2026	4	0,099	1,000
	Sve	Papa test normalan, HPV negativan	2180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Uzastopni normalni papa testovi*	2650	7	0,136	1,000

*Tri normalna godišnja papa testa unutar približno 2 godine

Tablica 13

**Sažetak rezultata: Ispitivanja provedena u institutu NCI i Francuskoj
Stope bolesti stratificirane prema statusu HPV-a tijekom prvog posjeta**

Ispitivana skupina	Dob	Status tijekom prvog posjeta	n	Slučajevi CIN 3+	Stopa (na 100 pacijent-godina)	Relativni rizik (95-postotni CI)
NCI	30 i više	Papa test normalan, HPV pozitivan	1078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Papa test normalan, HPV negativan	12.054	28	0,043	1,00
	Sve	Papa test normalan, HPV pozitivan	2561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Papa test normalan, HPV negativan	17.594	48	0,056	1,00
Francuska	30 i više	Papa test normalan, HPV pozitivan	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Papa test normalan, HPV negativan	1696	3	0,084	1,00
	Sve	Papa test normalan, HPV pozitivan	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Papa test normalan, HPV negativan	2180	3	0,066	1,00

Klinička korisnost rezultata testa na HPV dodatno je dokazana povećanim rizikom od razvoja bolesti vrata maternice u žena pozitivnih na HPV u usporedbi sa ženama negativnima na HPV.

ANALITIČKA OSJETLJIVOST

Neklinički panel kloniranog DNK plazmida HPV-a testiran je kako bi se utvrdilo može li se testom *digene* HC2 HPV DNA Test otkriti svaki od 18 tipova HPV-a te kako bi se utvrdila analitička osjetljivost ispitivanja za svaki tip HPV-a. Svaka koncentracija ciljane sekvence HPV-a (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml i 0,2 pg/ml) svakog od 18 tipova DNK HPV-a (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68) testirana je u triplikatu s probom za niskorizične tipove HPV-a ili probom za visokorizične tipove HPV-a, prema potrebi. Srednja vrijednost signala u RLU za svaku koncentraciju svakog tipa HPV-a izračunata je i uspoređena s pozitivnim kalibratorom za odgovarajuću stranu ispitivanja.

Utvrđena granica detekcije za svaki tip HPV-a u mediju STM prikazana je u tablici 14. Granice detekcije varirale su od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml ovisno o testiranom tipu HPV-a. Svi tipovi HPV-a mogli su se otkriti na procijenjenoj razini od 1,09 pg ciljane sekvence DNK HPV-a po 1 ml ispitka u mediju STM. Srednja granica detekcije za svih 18 tipova DNK HPV-a iznosila je 1,09 pg/ml uz standardnu devijaciju od 0,05.

Tablica 14
Sažetak granica osjetljivosti detekcije testa *digene* HC2 HPV DNA Test
za svaki tip DNK HPV-a u mediju STM

Tip DNK HPV-a	Koncentracija DNK HPV-a koju je moguće otkriti (pg/ml)	Standardna devijacija	95-postotni raspon pouzdanosti
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
Srednja vrijednost (svi tipovi)	1,09	0,05	0,97 – 1,27

RADNE ZNAČAJKE KOKTELA KOMBINIRANIH PROBA (COMBINED-PROBE COCKTAIL, CPC)

Isti gore opisan neklinički panel DNK plazmida HPV-a testiran je da bi se utvrdila analitička osjetljivost svakog od 18 tipova HPV-a testom *digene* HC2 HPV DNA Test u skladu s protokolom s koktelom kombiniranih proba (Combined-Probe Cocktail, CPC) opisanim u ovim uputama. Analitička osjetljivost protokola CPC varirala je od 0,58 pg/ml do 1,39 pg/ml, a svi tipovi HPV-a mogli su se otkriti pri procijenjenoj razini od 0,95 pg/ml ciljne sekvence DNK HPV-a po 1 ml ispitka. Srednja granica otkrivanja za svih 18 tipova HPV-a iznosila je 0,95 pg/ml uz standardnu devijaciju od 0,07. Ta je osjetljivost jednaka analitičkoj osjetljivosti utvrđenoj za metodu s dvije probe testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

EKVIVALENCIJA IZMEĐU ISPITAKA U MEDIJU STM I ISPITAKA U OTOPINI PRESERV CYT SOLUTION

Ekvivalencija između ispitaka u mediju STM i ispitaka u otopini PreservCyt ispitana je kako bi se utvrdilo je li jednaka iskoristivost DNK HPV-a 18 u približno 10⁶ pozitivnih HeLa stanica koje sadrže integrirane genome HPV-a 18 dodane u STM i u pool negativnih stanica u otopini PreservCyt Solution. Svaka vrsta ispitka obrađena je u skladu s odgovarajućim postupcima obrade/denaturacije za taj ispitak kako je opisano u ovim uputama za uporabu te je testirana testom *digene* HC2 HPV DNA Test primjenom probe za visokorizične tipove HPV-a. Rezultati su pokazali da je iskoristivost DNK HPV-a 18 iz stanica humanog karcinoma ekvivalentna za dva medija i da postupak pripreme u otopini PreservCyt Solution ne utječe na analitičku osjetljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test.

KORELACIJA REZULTATA ZA ISPITKE U TEKUĆINI SUREPATH I ISPITKE U MEDIJU STM U KLINIČKOJ POPULACIJI

Klinička procjena u dvije faze provedena je primjenom 6 centara u kojima su prikupljeni uzorci i 3 ispitna centra u SAD-u. Pacijenti koji se liječe u klinici za spolno prenosive bolesti, opstetričkoj/ginekološkoj klinici, kolposkopskoj klinici, bolnici ili centru za planiranje obitelji ispunjavali su uvjete za uključivanje u ispitivanje prema unaprijed određenim kriterijima uključivanja i isključivanja. Faza procjene izvedivosti namijenjena za utvrđivanje odgovarajuće granične vrijednosti ispitivanja za *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za uporabu s ispitcima u tekućini SurePath uključivala je približno 400 pacijenata. Faza kliničke provjere valjanosti, koja je uključivala približno 1500 pacijenata za provjeru odabrane granične vrijednosti ispitivanja, započela je nakon što je međuanaliza izvedivosti pokazala da je granična vrijednost ispitivanja od 1,0 RLU/CO kada se upotrebljavaju ispitci u tekućini SurePath rezultirala prihvatljivim podudaranjem s rezultatima ispitaka u mediju STM.

U obje faze procjene upareni cervikalni ispitci u tekućini SurePath i ispitci u mediju STM prikupljeni su od svake sudionice koja je za to dala privolu. Ispitak SurePath zatim je poslan u citološki laboratorij radi pripreme stakalca. Nakon citološke pripreme preostali ispitci u tekućini SurePath i odgovarajući ispitci u mediju STM testirani su testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test uz primjenu granične vrijednosti ispitivanja od 1,0 RLU/CO.

Tablica 15 pokazuje korelaciju rezultata za ispitke u tekućini SurePath u odnosu na uparene ispitke u mediju STM uočenu u konačnim rezultatima dostupnima za analizu podataka dobivenima od ukupne uključene populacije.

Tablica 15
Podudaranje rezultata za SurePath i rezultata za STM
(sve dobi i citološke klasifikacije)
(n = 1490)

% pozitivnog podudaranja 95-postotni CI (n/N)		% negativnog podudaranja 95-postotni CI (n/N)	
Svi pozitivni	Podskup visoko pozitivnih (RLU/CO ≥ 2,5)	Svi negativni	Podskup nisko negativnih RLU/CO (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1011/1061)	96,0 94,6, 97,1 (1002/1044)

Ti rezultati predviđaju da će relativna osjetljivost i specifičnost ispitivanja kada se upotrebljavaju ispitci u tekućini SurePath imati veliku korelaciju s onima dobivenima kada se upotrebljava vrsta ispitaka u mediju STM, što dokazuje donja granica 95-postotnog intervala pouzdanosti i za pozitivno i za negativno podudaranje.

OBNOVLJIVOST

Multicentrično ispitivanje obnovljivosti provedeno je kako bi se utvrdila obnovljivost između dana, između centara i sveukupna obnovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test primjenom panela ciljnih sekvenci DNK HPV-a te kliničkih ispitaka pozitivnih na HPV i negativnih na HPV.

Tri vanjska laboratorija provela su testiranje s istom serijom kompleta *digene* HC2 HPV DNA Test na 3 različita dana s identičnim panelom za obnovljivost. Panel za obnovljivost uključivao je sljedeće ispitke: 12 poolova denaturiranih kliničkih ispitaka u mediju STM, 3 poola nedenaturiranih kliničkih ispitaka u tekućini PreservCyt Solution, negativni kalibrator i pozitivni kalibratori za niskorizične i visokorizične tipove pri koncentracijama od 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml i 10 pg/ml. Sve sastavnice panela testirane su svakog dana u triplicatu metodom s probom za visokorizične tipove HPV-a i metodom CPC. Rezultati se prikazuju u tablici 16.

Tablica 16
Sažetak ukupnih statističkih podataka za obnovljivost dobivenu
multicentričnim ispitivanjem za test *digene* HC2 HPV DNA Test

Statistička mjera	PROBA ZA VISOKORIZIČNE TIPOVE HPV-a	Koktel kombiniranih proba (Combined-Probe Cocktail, CPC)	Kombinirani rezultati za probu za visokorizične tipove HPV-a i CPC^a
Udio očekivanih pozitivnih rezultata u odnosu na dobivene pozitivne rezultate	100 % (99,0 – 100,0)	99,8 % (98,92 – 100,0)	99,9 % (99,38 – 100,0)
Udio očekivanih negativnih rezultata u odnosu na dobivene negativne rezultate	99,0 % (97,49 – 99,73)	98,9 % (96,79 – 99,77)	99,0 % (97,88 – 99,58)
Podudaranje	99,5 % (98,70 – 99,86)	99,5 % (98,70 – 99,86)	99,5 % (99,0 – 99,78)
Kapa	0,990	0,989	0,990

^aBrojevi u zagradama označavaju 95-postotne intervale pouzdanosti. Ukupni podaci kombinacija su svih obrada u svim centrima.

To pokazuje da je obnovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test s kliničkim ispiscima prikupljenima u mediju STM vrlo dobra.

KRIŽNA REAKTIVNOST

PANEL ZA UTVRĐIVANJE KRIŽNE REAKTIVNOSTI

Skup bakterija, virusa i plazmida koji se često nalaze u ženskom anogenitalnom traktu, kao i skup kožnih tipova HPV-a za koje su bili dostupni klonovi ispitani su kako bi se utvrdilo može li doći do križne reaktivnosti s probama za HPV koje se upotrebljavaju u testu *digene* HC2 HPV DNA Test. Svi su mikroorganizmi ispitani u koncentracijama od 1×10^5 i 1×10^7 organizama po ml. Pročišćeni DNK-ovi virusa i plazmida ispitani su u koncentracijama od 4 ng/ml.

U nastavku je popis testiranih bakterija. Sve bakterije dale su negativni rezultat testiranjem s *digene* HC2 HPV DNA Test.

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

* Ispitani su i soj *E. coli* koji se upotrebljava za uzgoj plazmida (HB101) i klinički izolat *E. coli*.

U nastavku je popis testiranog virusnog ili plazmidnog DNK ili humanog seruma:

Adenovirus 2	Humani papilomavirus tipa 1
Citomegalovirus	Humani papilomavirus tipa 2
Epstein-Barrov virus	Humani papilomavirus tipa 3
Serum pozitivan na površinski antigen hepatitisa B	Humani papilomavirus tipa 4
Herpes simplex I	Humani papilomavirus tipa 5
Herpes simplex II	Humani papilomavirus tipa 8
Virus humane imunodeficijencije (HIV, RT DNK)	Humani papilomavirus tipa 13
Majmunski virus tip 40 (SV40)	Humani papilomavirus tipa 30 pBR322

Jedini virusi ili plazmidi koji su pokazali križnu reaktivnost s testom *digene* HC2 HPV DNA Test bili su HPV tipa 13 i plazmid pBR322. DNK HPV-a 13 reagirao je samo s probom za niskorizične tipove HPV-a. HPV 13 se obično otkriva u lezijama na usnama određenih etničkih skupina, ali nije otkriven u anogenitalnom traktu.²⁹ Stoga se ne očekuje da će križna reaktivnost uočena između HPV-a 13 i probe za niskorizične tipove HPV-a testa *digene* HC2 HPV DNA Test uzrokovati klinički zbunjujuće rezultate za anogenitalne ispitke. Križna reaktivnost između pBR322 i proba za niskorizične i visokorizične tipove HPV-a testa *digene* HC2 HPV DNA Test nije neočekivana jer je teško ukloniti sav DNK vektora pBR322 prilikom izolacije inserta HPV-a. Prisutnost homolognih sekvenci pBR322 zabilježena je u humanim genitalnim ispitcima, a do lažno pozitivnih rezultata moglo bi doći u slučaju prisutnosti visokih razina bakterijskog plazmida. Međutim, pokazalo se da nijedan od 298 kliničkih ispitaka koji su dali pozitivni rezultat testiranjem probama za niskorizične i visokorizične tipove HPV-a testa *digene* HC2 HPV DNA Test nije imao pozitivne rezultate zbog pBR322 kada su testirani probom za pBR322. Stoga se vjerojatnost da će rezultat testa *digene* HC2 HPV DNA Test biti lažno pozitivan zbog homolognih sekvenci pBR322 u kliničkim ispitcima čini niskom.

KRIŽNA HIBRIDIZACIJA

Svaki od 18 tipova HPV-a testiran je probama za niskorizične i visokorizične tipove HPV-a u koncentracijama od 4 ng/ml DNK HPV-a. Očekivalo se da će sve ciljne sekvence HPV-a biti pozitivne s odgovarajućom skupinom probe, dok se za suprotnu skupinu probe nije očekivalo da će niti jedan ispitak biti pozitivan. Ovo ispitivanje pokazalo je da postoji mala količina križne hibridizacije između HPV-a tipova 6 i 42 (niskorizični tipovi HPV-a) i skupine probe za visokorizične tipove (proba za visokorizične tipove HPV-a). Ispitci s velikim razinama (4 ng/ml ili više) DNK HPV-a 6 ili HPV-a 42 mogu biti pozitivni za obje skupine probe. Klinički je značaj toga da će pacijenti s razinama DNK HPV-a 6 ili HPV-a 42 od 4 ng/ml ili višima možda biti upućeni na kolposkopiju.

Osim toga, pokazalo se da proba za visokorizične tipove HPV-a križno reagira s HPV tipovima 40, 53 i 66. Ti su tipovi rijetki i ne postoji dovoljno dokaza kako bi se utvrdila točna korelacija između infekcije tim tipovima i razvoja bolesti visokog stupnja³⁸. Pacijenti čiji ispitci sadržavaju visoke razine DNK tih tipova HPV-a mogu netočno biti upućeni na kolposkopiju. U literaturi je također zabilježeno da kompleksne probe slične onima koje se upotrebljavaju u ovom testu mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate zbog križne hibridizacije s tipovima HPV-a 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ili MM9.³⁹ Premda nekoliko od tih tipova HPV-a predstavlja rijetke ili nove tipove koji se ne susreću često kod bolesti visokog stupnja, pacijenti čiji ispitci sadržavaju visoke razine DNK tih tipova HPV-a mogu biti netočno upućeni na kolposkopiju.

UČINAK KRVI I DRUGIH TVARI NA ISPITKE U MEDIJU STM

Učinak krvi i drugih potencijalno interferirajućih definiranih ili nedefiniranih tvari procijenjen je testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Puna krv, irigacijsko sredstvo, krema protiv gljivica i kontracepcijski gel (sredstva koja se često mogu naći u cervikalnim ispitcima) dodani su negativnim i pozitivnim ispitcima u mediju STM (poolovi kliničkih ispitaka i neklinički ispitci) u koncentracijama koje se mogu pronaći u cervikalnim ispitcima. Nisu zabilježeni lažno pozitivni rezultati ni s kojim od četiri sredstva ni u kojoj koncentraciji. Međutim, lažno negativni rezultat može se prijaviti u kliničkim ispitcima s razinama DNK HPV-a blizu pozitivne granične vrijednosti za ispitivanje (1 pg/ml) ako su prisutne visoke razine kreme protiv gljivica ili kontracepcijskog gela. No, vrlo je malo vjerojatno da će se klinički ispitak gotovo u potpunosti sastojati od jedne od tih tvari jer se vrat maternice rutinski čisti prije uzimanja ispitaka za papa test ili za testiranje na HPV.

UČINAK KRVI I DRUGIH TVARI NA ISPITKE U OTOPINI PRESERV CYT SOLUTION

Učinak krvi i drugih potencijalno interferirajućih definiranih ili nedefiniranih tvari koje su potencijalno prisutne u kliničkim ispitcima u otopini PreservCyt Solution procijenjen je testom *digene* HC2 HPV DNA Test. Puna krv, irigacijsko sredstvo, krema protiv gljivica i kontracepcijski gel (sredstva koja se često mogu naći u cervikalnim ispitcima) dodani su poolovima negativnih i pozitivnih kliničkih ispitaka u otopini PreservCyt Solution u koncentracijama koje se mogu pronaći u cervikalnim ispitcima. Nisu zabilježeni lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati ni s kojim od 4 sredstva ni u kojoj koncentraciji. Nadalje, tvari svojstvene nekim kliničkim ispitcima ne inhibiraju otkrivanje DNK HPV-a testom *digene* HC2 HPV DNA Test.

OBNOVLJIVOST TESTA *digene* HC2 HPV DNA TEST S KLINIČKIM ISPITCIMA PRIKUPLJENIMA U STM

Obnovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test s kliničkim ispitcima prikupljenima u STM utvrđena je u ispitivanju u kojem se upotrebljavalo 20 kliničkih poolova (10 pozitivnih i 10 negativnih) pripremljenih kombiniranjem prethodno denaturiranih i testiranih ispitaka prikupljenih cervikalnom četkicom u STM. Ispitci su testirani u replikatima od 4 svakog od 5 dana kako bi se dobilo ukupno 20 replikata po ispitku. Testiranje je provedeno metodom s koktelom kombiniranih proba. Srednje vrijednosti, standardna devijacija i 95-postotni intervali pouzdanosti (Confidence Intervals, CIs) oko srednje vrijednosti izračunati su za svaki ispitak unutar jednog dana i tijekom 5 dana te se prikazuju u tablici 17.

Tablica 17
Srednja vrijednost RLU/CO s intervalima pouzdanosti i postotkom
pozitivnih (silazni redoslijed prema srednjoj vrijednosti RLU/CO)

Br.	ID uzorka	Srednja vrijednost RLU/CO	CI	% pozitivno
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 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti (br. 1 – 5), 100 od 100 replikata (100,0 %) bilo je pozitivno. Za 5 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti ispitivanja (br. 6 – 10), 60 od 100 (60 %) replikata bilo je pozitivno, a 40 od 100 (40 %) bilo je negativno. Za 10 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO pri više od 20 % ispod granične vrijednosti ispitivanja, 200 od 200 replikata (100 %) bilo je negativno.

Stoga su ispitci sa srednjom vrijednosti RLU/CO od 20 % ili više iznad granične vrijednosti bili pozitivni 100 % vremena, dok su ispitci sa srednjom vrijednosti RLU/CO od 20 % ili više ispod granične vrijednosti bili negativni 100 % vremena, što ukazuje da se može očekivati da će ispitci s vrijednosti višom ili nižom od 20 % ili više od granične vrijednosti dati dosljedne rezultate. Ispitci blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ovi podaci pokazuju da ispitci u mediju STM daju obnovljive rezultate kada se upotrebljava test *digene* HC2 HPV DNA Test.

OBNOVLJIVOST TESTA *digene* HC2 HPV DNA TEST S KLINIČKIM ISPITCIMA PRIKUPLJENIMA U OTOPINU PRESERVCYT SOLUTION

Obnovljivost testa *digene* HC2 HPV DNA Test s kliničkim ispitcima prikupljenima u otopinu PreservCyt Solution utvrđena je u ispitivanju u kojem su se upotrebljavala 24 lažna ispitka u koncentraciji koja obuhvaća raspon koncentracija DNK HPV-a. Ispitci su se sastojali od otopine PreservCyt Solution i bijelih krvnih stanica s bakterijama koje su sadržavale plazmid HPV-a 16 i bez njih.

Ispitci su testirani u replikatima od 4 svakog od 5 dana kako bi se dobilo ukupno 20 replikata po ispitku. Svakog od 5 dana ispitivanja, 8 ml alikvota iz svakog ispitka obrađeno je i testirano prema uputama za uporabu kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit te primjenom samo probe za visokorizične tipove HPV-a. Srednje vrijednosti, standardne devijacije i 95-postotni intervali pouzdanosti (Confidence Interval, CI) izračunati su za svaki ispitak unutar svakog dana i tijekom svih 5 dana i replikata. Srednja vrijednost RLU/CO, interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti i postotak pozitivnih replikata pokazani su u tablici 18 za svaki ispitak, silaznim redom na temelju srednje vrijednosti RLU/CO.

Tablica 18
Srednja vrijednost RLU/CO s intervalima pouzdanosti i postotkom
pozitivnih (silazni redoslijed prema srednjoj vrijednosti RLU/CO)

Br.	Br. ispitka	Srednja vrijednost RLU/CO	CI	% pozitivno
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 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti (br. 1 – 6), 114 od 120 replikata (95,0 %) bilo je pozitivno. Za 7 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti ispitivanja (br. 7 – 13), 88 od 139 (63,3 %) replikata bilo je pozitivno, a 51 od 139 (36,7 %) bilo je negativno. Za 4 ispitka unutar 10 % iznad ili ispod granične vrijednosti (br. 10 – 13), 41 od 79 (51,9 %) replikata bilo je pozitivno, a 38 (48,1 %) bilo je negativno. Za 11 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO pri više od 20 % ispod granične vrijednosti ispitivanja, 220 od 220 replikata (100 %) bilo je negativno.

Stoga su ispiti sa srednjom vrijednosti RLU/CO od 20 % ili više iznad granične vrijednosti bili pozitivni više od 95 % vremena, dok su ispiti sa srednjom vrijednosti RLU/CO od 20 % ili više ispod granične vrijednosti bili negativni 100 % vremena, što ukazuje da se može očekivati da će ispiti s vrijednosti višom ili nižom od 20 % ili više od granične vrijednosti dati dosljedne rezultate. Ispiti blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ovi podaci pokazuju da ispiti u otopini PreservCyt Solution daju obnovljive rezultate kada se upotrebljava test *digene* HC2 HPV DNA Test.

OBNOVLJIVOST TESTA *digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA TEST S ISPITCIMA PRIKUPLJENIMA U TEKUĆINU SUREPATH PRESERVATIVE FLUID

Procjene obnovljivosti provedene su kako bi se utvrdila sposobnost 3 različita laboratorija da dobiju sličan dijagnostički rezultat na različite dane i s različitim obradama od identičnog skupa ispitaka poznatog pozitivnog/negativnog statusa HPV-a kada se upotrebljava granična vrijednost ispitivanja od 1,0 RLU/CO. Panel ispitaka za procjenu obnovljivosti sastojao se od 5 ispitaka pozitivnih na HPV, 2 ispitka s koncentracijama DNK HPV-a blizu granične vrijednosti ispitivanja i 5 ispitaka negativnih na HPV.

Sastavnice panela pripremljene su kombiniranjem jedinstvenih ispitaka pacijenta prikupljenih u tekućinu SurePath s poznatim negativnim i pozitivnim statusom za HPV kako bi se dobile željene ciljne vrijednosti RLU/CO. Svaka sastavnica panela testirana je u duplikatu dvaput na dan u razdoblju od pet dana u svakom od tri laboratorija koji su sudjelovali.

Tablica 19
Ispitivanje obnovljivosti s ispitcima u tekućini SurePath
Kvalitativni rezultati po sastavnici panela

Sastavnica panela	Srednja vrijednost RLU/CO	Očekivani rezultat	Br. pozitivnih na HPV (%)	Br. negativnih na HPV (%)
1	0,20	negativno	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativno	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativno	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativno	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativno	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativno	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	pozitivno	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	pozitivno	60 (100)	0 (0)
9	25,65	pozitivno	60 (100)	0 (0)
10	81,52	pozitivno	60 (100)	0 (0)
11	154,18	pozitivno	60 (100)	0 (0)
12	765,29	pozitivno	60 (100)	0 (0)

OBNOVLJIVOST REZULTATA ISPITAKA U TEKUĆINI SUREPATH KADA SE ZA OBRADU ISPITIVANJA UPOTREBLJAVA RAPID CAPTURE SYSTEM

Obnovljivost rezultata ispitaka u tekućini SurePath kada se za obradu ispitivanja upotrebljava Rapid Capture System uspoređena je s rezultatima dobivenima kada se upotrebljava ručna obrada ispitivanja. Dva usporedna testa provedena su na zasebnim alikvotima istog obrađenog ispitka.

Tablica 20
Podudaranje rezultata unutar ispitaka za ispitke u tekućini SurePath
primjenom sustava RCS (RCS u usporedbi s ručnim ispitivanjem)

% pozitivnog podudaranja 95-postotni CI (n/N)		% negativnog podudaranja 95-postotni CI (n/N)	
Svi pozitivni	Podskup visoko pozitivnih (RLU/CO ≥ 2,5)	Svi negativni	Podskup nisko negativnih (RLU/CO < 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1057/1079 96,9, 98,7	98,7 1050/1064 97,8, 99,28

OGRANIČENJA POSTUPKA

Za *in vitro* dijagnostičku uporabu

Pogledajte *Korisnički priručnik za sustav Rapid Capture System* za dodatna ograničenja postupka specifična za uporabu tog sustava za testiranje s velikim protokom uzoraka.

- *digene* HC2 HPV DNA Test za tipove humanog papilomavirusa 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 nije preporučen za procjenu sumnje na seksualno zlostavljanje.
- Prevalencija infekcije HPV-om u populaciji može utjecati na radne značajke. Pozitivne prediktivne vrijednosti smanjuju se kod testiranja populacija s niskom prevalencijom ili pojedinaca kod kojih ne postoji rizik od infekcije.
- Negativan rezultat ne isključuje mogućnost infekcije HPV-om jer vrlo niske razine infekcije ili pogreška pri uzorkovanju mogu uzrokovati lažno negativan rezultat.
- *digene* HC2 HPV DNA Test razlikuje između 2 skupine tipova HPV-a: HPV 6/11/42/43/44 i 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Neće razlikovati među tipovima virusa unutar tih skupina.
- *digene* HC2 HPV DNA Test može se upotrebljavati samo s cervikalnim ispitcima prikupljenima s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device ili biopstatima prikupljenima u STM ili s cervikalnim ispitcima koji su prikupljeni priborom za prikupljanje nalik metlici ili kombinacijom četkice/špatule i stavljeni u otopinu PreservCyt Solution ili s cervikalnim ispitcima prikupljenima u tekućinu SurePath Preservative Fluid. Biopstat se mogu ispitivati samo ako se odmah stave u STM i čuvaju na temperaturi od -20 °C do ispitivanja.
- *digene* HC2 DNA Collection Device ne smije se upotrebljavati za prikupljanje ispitaka trudnica.
- Infekcija HPV-om nije definitivni pokazatelj prisutnosti bolesti vrata maternice visokog stupnja, niti u svim slučajevima ukazuje na to da će se razviti bolest visokog stupnja ili rak.
- Postoji mala količina križne hibridizacije između tipova HPV-a 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 56, MM4, MM7, MM8 i MM9 te probe za visokorizične tipove HPV-a. Pacijenti čiji ispitci sadržavaju visoke razine tih tipova HPV-a mogu netočno biti upućeni na kolposkopiju³⁸.
- *digene* HC2 HPV DNA Test osmišljen je za otkrivanje niskorizičnih i visokorizičnih tipova HPV-a, uključujući 39, 58, 59 i 68. Analitička ispitivanja koja je provela tvrtka QIAGEN primjenom kloniranog plazmidnog DNK HPV-a pokazala su da ovo ispitivanje otkriva te tipove pri razinama u rasponu od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml. To je ekvivalentno značajkama otkrivanja drugih tipova HPV-a na koje test *digene* HC2 HPV DNA Test cilja. Tvrtka QIAGEN mogla je potvrditi valjanost otkrivanja tih tipova HPV-a tek u ograničenom broju kliničkih ispitaka. Zbog niske prevalencije tih tipova u općoj populaciji (kao što su pokazali Bosch et. Al³⁶.), radne značajke testa *digene* HC2 HPV DNA Test za otkrivanje tipova HPV-a 39, 58, 59 i 68 nisu statistički potvrđene.
- Ako su u ispitku tijekom njegova prikupljanja radi testiranja na HPV prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica, kontracepcijskog gela ili irigacijskog sredstva, postoji vjerojatnost da će se dobiti lažno negativan rezultat ako ti ispitci sadržavaju razine DNK HPV-a zbog kojih će vrijednosti RLU/CO biti blizu granične vrijednosti ispitivanja.
- Moguća je križna reaktivnost između probe testa *digene* HC2 HPV DNA Test i plazmida pBR322. Prisutnost homolognih sekvenci pBR322 zabilježena je u humanim genitalnim ispitcima, a do lažno pozitivnih rezultata moglo bi doći u slučaju prisutnosti visokih razina bakterijskog plazmida.

LITERATURA

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: 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]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899-901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.

36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.
37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79-88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252-255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.; and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, p. 651-655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333-341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
43. 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.

VODIČ ZA RJEŠAVANJE PROBLEMA

Uočeno je sljedeće	Mogući uzroci	Rješenja
<p>Neispravna promjena boje ili izostanak promjene boje zabilježeni tijekom denaturacije.</p>	<p>Denaturacijski reagens nije ispravno pripremljen ili</p> <p>Denaturacijski reagens nije dodan</p> <p>Ispitak sadržava krv ili druge materijale koji maskiraju promjenu boje.</p> <p>pH vrijednost ispitka mogla bi biti neuobičajeno kisela.</p>	<p>Potvrdite da denaturacijski reagens sadržava indikatorsku boju te da je tamnoljubičaste boje.</p> <p>Provjerite je li denaturacijski reagens dodan ispitku mjerenjem volumena ispitka (očekivani volumen je 1,5 ml). Ako volumen ukazuje na to da denaturacijski reagens nije dodan, dodajte prikladnu količinu, pomiješajte i nastavite s ispitivanjem ako nakon toga opazite ispravnu promjenu boje.</p> <p>Točno opisana promjena boje ne očekuje se s ovim vrstama ispitaka; to ne bi trebalo štetno utjecati na rezultate testa <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test.</p> <p>Ako nije prisutan nijedan drugi uzrok, ispitak je možda neuobičajeno kiseo te se stoga očekivana promjena boje neće dogoditi. Uzmite novi ispitak prije primjene octene kiseline u cerviksu jer će neodgovarajući pH ispitka štetno utjecati na rezultate testa.</p>
<p>Kontrole kvalitete daju netočne rezultate</p>	<p>Neispravan protokol softvera odabran za test (npr. upotrebljavao se protokol CPC za metodu s dvije probe)</p> <p>Obrnuto postavljanje kontrola kvalitete QC1-LR i QC2-HR</p> <p>Obrnuto postavljanje LRC i QC1-LR i/ili HRC i QC1-HR.</p>	<p>Ako je protokol softvera neispravan za test koji se izvodi, pločicu treba ponovno očitati unutar 30 minuta od dodavanja detekcijskog reagensa 2 primjenom ispravnog protokola.</p> <p>Ponovno testirajte ispitke.</p> <p>Ponovno testirajte ispitke.</p>
<p>Neispravna promjena boje zabilježena tijekom hibridizacije.</p>	<p>Neodgovarajuće miješanje mješavine probe s denaturiranim kalibratorima, kontrolama i/ili ispitcima; ili mješavina probe nije dodana; ili je dodan neispravan volumen reagensa.</p> <p>Ispitak sadržava krv ili druge materijale koji maskiraju promjenu boje.</p> <p>Ispitak je imao < 1000 µl medija STM.</p>	<p>Protresite Hybridization Microplate ili stalak s mikroepurvetama dodatne 2 minute. Ako su neke jažice i dalje ljubičaste, dodajte dodatnih 25 µl odgovarajuće mješavine probe i dobro pomiješajte. Ako nakon dodavanja mješavine probe i ponovnog miješanja ne dođe do ispravne promjene boje, a ispitak nije sadržavao krv ili druge materijale, ponovno testirajte ispitak.</p> <p>Točno opisana promjena boje ne očekuje se s ovim vrstama ispitaka; to ne bi trebalo štetno utjecati na rezultate testa <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test.</p> <p>Provjerite volumen izvornog ispitka. Volumen bi trebao biti 1350 µl ± 20 µl (nakon uklanjanja 75 µl proba za niskorizične i visokorizične tipove HPV-a). Ako volumen iznosi < 1350 µl, izvorni je ispitak sadržavao < 1000 µl medija STM. Uzmite novi ispitak.</p>

Uočeno je sljedeće	Mogući uzroci	Rješenja
<p>Ispitivanje ne zadovoljava kriterije provjere valjanosti. Nikakav signal nije uočen za kalibrator, kontrole kvalitete ili ispitke.</p>	<p>Proba nije dodana u diluens za probe.</p> <p>Proba je kontaminirana RNazom tijekom pripreme.</p> <p>Neodgovarajuće miješanje probe i diluensa za probe.</p> <p>Neodgovarajuće miješanje razrijeđene probe i denaturiranog ispitka.</p> <p>Neispravno vrijeme ili temperatura tijekom koraka hibridizacije.</p> <p>Neodgovarajuće miješanje tijekom koraka hvatanja.</p> <p>Zamijenjene probe / mješavine proba / epruvete za hibridizaciju.</p> <p>Nije dodana ispravna količina detekcijskog reagensa 1 ili nije inkubiran tijekom određenog vremena.</p> <p>Nije dodana ispravna količina detekcijskog reagensa 2 ili nije inkubiran tijekom određenog vremena.</p> <p>Kvar ili netočno programiranje luminometra.</p>	<p>Pripremite mješavine probe kako je opisano u ovim uputama za uporabu. Pažljivo označite epruvete.</p> <p>Tijekom pipetiranja probe upotrebljavajte vrške pipeta s pregradama za aerosole i nosite rukavice. Upotrebljavajte samo čiste nove jednokratne spremnike za reagense.</p> <p>Nakon dodavanja probe u diluens za probe vrlo temeljito pomiješajte vrtložnim miješanjem pri velikoj brzini najmanje 5 sekundi. Mora nastati vidljivi vrtlog.</p> <p>Nakon dodavanja mješavine probe i ispitka u svaku jažicu Hybridization Microplate ili mikroeprevetu protresite ih na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min 3 ± 2 minute. Provjerite je li došlo do promjene boje iz ljubičaste u žutu u svakoj epruveti ili jažici mikrotitar pločice.</p> <p>Hibridizirajte 60 ± 5 minuta na temperaturi od 65 ± 2 °C. Provjerite temperaturu grijača Microplate Heater I ili vodene kupelji. Potvrdite da su grijač Microplate Heater I ili vodena kupelj postavljeni da griju ispitke na ispravnu temperaturu te da su unaprijed zagrijani 60 minuta prije uporabe. Potvrdite da je razina vode dovoljna da bi zagrijala ispitke na ispravnu temperaturu. Redovito treba kalibrirati vodene kupelji.</p> <p>Protresite na tresilici Rotary Shaker I 60 ± 5 minuta na temperaturi od $20 - 25$ °C kako je opisano u ovim uputama za uporabu. Provjerite brzinu tresilice Rotary Shaker I kalibracijom na način opisan u odjeljku Kalibracija brzine tresilice u <i>Korisničkom priručniku za Rotary Shaker I</i>.</p> <p>Pažljivo pripremite mješavine proba i na odgovarajući način označite epruvete s mješavinama proba. Pripazite da dodate ispravnu probu ispravnom kompletu epruveta za hibridizaciju. Označite epruvete s mješavinama proba, epruvete za hibridizaciju i/ili stalke kako biste mogućnost zamjene sveli na najmanju moguću mjeru.</p> <p>Pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 1 u svaku jažicu 8-kanalnim pipetorom. Inkubirajte na $20 - 25$ °C tijekom 30 – 45 minuta.</p> <p>Pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 2 u svaku jažicu 8-kanalnim pipetorom. Inkubirajte na $20 - 25$ °C tijekom 15 do 30 minuta.</p> <p>Za dodatne upute pogledajte odgovarajući korisnički priručnik ili nazovite lokalnog predstavnika tvrtke QIAGEN.</p>

Uočeno je sljedeće	Mogući uzroci	Rješenja
<p>Povišene vrijednosti RLU u kalibratorima, kontrolama kvalitete i/ili ispitcima (≥ 200 RLU u mnogo jažica ili u svim jažicama). Ispitivanje možda ne zadovoljava kriterije provjere valjanosti.</p>	<p>Denaturacijski reagens nije dodan ili je dodan netočan volumen reagensa ili je denaturacijski reagens nedovoljno pomiješan s ispitcima ili kalibratorima.</p> <p>Propuštanje svjetla u luminometru. Vrata nisu hermetički zatvorena. Brtva oko vrata potrgana je.</p> <p>Kontaminacija detekcijskog reagensa 2 ili jažica mikrotitar pločice za hvatanje detekcijskim reagensom 1 ili vanjskom alkalnom fosfatazom.</p> <p>Kontaminirani pufer za pranje.</p> <p>Kontaminirani automatizirani uređaj za pranje pločica.</p> <p>Neodgovarajuće pranje jažica mikrotitar pločice za hvatanje nakon inkubacije detekcijskog reagensa 1.</p> <p>Kontaminacija jažica mikrotitar pločice detekcijskim reagensom 1.</p> <p>Sušenje otopine za hibridizaciju tapkanjem na istom području papirnatih ručnika Kimtowels Wipers ili sličnih papirnatih ručnika koji ne otpuštaju vlakna.</p> <p>Upotrijebljeni su neispravni papirnatih ručnici za sušenje.</p>	<p>Potvrdite da ponavljajući pipetor ispravno pipetira prije dodavanja denaturacijskog reagensa. Kalibrirani pipetori neophodni su. Dodajte pola volumena denaturacijskog reagensa u svaku epruvetu i dobro pomiješajte. Da biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, potvrdite da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete. Kalibratori, kontrole kvalitete i ispitci trebali bi poprimiti ljubičastu boju nakon dodavanja denaturacijskog reagensa.</p> <p>Provjerite pozadinsko očitavanje luminometra očitavanjem prazne mikrotitar pločice. Očitavanje veće od 50 RLU naznačuje da postoji propuštanje svjetla. Za dodatne upute pogledajte odgovarajući korisnički priručnik ili nazovite lokalnog predstavnika tvrtke QIAGEN.</p> <p>Pogledajte dio Provjera kontaminacije u ovom odjeljku Rješavanje problema.</p> <p>Pogledajte dio Provjera kontaminacije u ovom odjeljku Rješavanje problema.</p> <p>Pogledajte dio Provjera kontaminacije u ovom odjeljku Rješavanje problema.</p> <p>Jažice mikrotitar pločice operite temeljito puferom za pranje 6 puta, tako da svaki put napunite jažice dok nisu prepunjene ili automatiziranim uređajem za pranje pločica. U jažicama nakon pranja ne bi trebalo biti vidljivih ostataka ružičaste tekućine. Pogledajte Korisnički priručnik za automatizirani uređaj za pranje pločica za upute o testiranju kako bi se utvrdila kontaminacija ili kvarovi.</p> <p>Potvrdite da su sve radne površine čiste i suhe. Budite oprezni kada upotrebljavate detekcijski reagens 1. Izbjegavajte aerosole.</p> <p>Nemojte ponovno sušiti tapkanjem na prethodno iskorištenim papirnatim ručnicima Kimtowels Wipers ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna.</p> <p>Upotrebljavajte papirnatih ručnike Kimtowels Wipers ili slične papirnatih ručnike koji ne otpuštaju vlakna za sušenje tapkanjem.</p>
<p>Niski omjeri PC/NC ili velik broj nisko pozitivnih ispitaka s omjerima $< 2,0$ ($> 20\%$). Ispitivanje možda ne zadovoljava kriterije provjere valjanosti.</p>	<p>Neodgovarajuća priprema ispitka.</p> <p>Proba je nedovoljno pomiješana ili je nedovoljna količina probe dodana ispitivanjima.</p> <p>Nedovoljan volumen razrijeđene probe dodan je u svaku mikroeprevetu za hibridizaciju.</p> <p>Gubitak aktivnosti detekcijskog reagensa 1.</p> <p>Nedostatno hvatanje.</p>	<p>Dodajte odgovarajući volumen denaturacijskog reagensa i dobro pomiješajte vrtložnim miješanjem. Da biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, potvrdite da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete. Za ispitke u otopini PreservCyt Solution potvrdite da je provedeno ispravno miješanje i resuspenzija staničnog taloga prije inkubacije u sklopu denaturacije. Pogledajte upute za uporabu kompleta <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit za pojedinosti o protokolu. Trebala bi se vidjeti izrazita promjena boje iz prozirne u tamnoljubičastu. Inkubirajte 45 ± 5 minuta na 65 ± 2 °C.</p> <p>Pripremite mješavine probe kako je opisano. Dobro pomiješajte vrtložnim miješanjem i potvrdite da se napravio vidljivi vrtlog. Mješavine probe moraju se dodati u epruvete pipetom s pozitivnim pomakom ili višekanalnim pipetom kako bi se osiguralo točno pipetiranje.</p> <p>Potvrdite da 8-kanalni pipetor točno pipetira prije dodavanja mješavine probe u Hybridization Microplate ili mikroeprevete. Dodajte 25 μl mješavine probe u svaku jažicu mikrotitar pločice ili mikroeprevetu koje sadržavaju denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete i kliničke ispitke. Potvrdite da 8-kanalni pipetor točno pipetira prije dodavanja mješavine probe u jažice Hybridization Microplate. Boja bi se trebala promijeniti od tamnoljubičaste do žute nakon dodavanja i temeljitog miješanja mješavine probe. Ispitci u otopini PreservCyt Solution trebali bi poprimiti ružičastu boju umjesto žute.</p> <p>Čuvajte detekcijski reagens 1 na temperaturi od $2 - 8$ °C. Upotrijebite ga prije isteka roka trajanja naznačenog na naljepnici vanjske kutije kompleta.</p> <p>Korak hvatanja trebao bi se provoditi na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min. Kalibracijom potvrdite brzinu tresilice.</p>

Uočeno je sljedeće	Mogući uzroci	Rješenja
	<p>Neodgovarajuće pranje.</p> <p>Kontaminirani pufer za pranje.</p>	<p>Jažice mikrotitar pločice operite temeljito puferom za pranje 6 puta, tako da svaki put napunite jažice dok nisu prepunjene ili automatiziranim uređajem za pranje pločica.</p> <p>Pogledajte dio Provjera kontaminacije u ovom odjeljku Rješavanje problema.</p>
<p>Niz pozitivnih ispitaka s vrijednostima RLU koje su približno jednake.</p>	<p>Kontaminacija jažica mikrotitar pločice za hvatanje tijekom rukovanja ispitivanjem.</p> <p>Kontaminacija detekcijskog reagensa 2.</p> <p>Kvar automatiziranog uređaja za pranje pločica.</p>	<p>Prekrijte mikrotitar pločicu za hvatanje tijekom svih inkubacija. Izbjegavajte izlaganje epruveta kontaminaciji aerosolom prilikom provođenja ispitivanja. Tijekom rukovanja nosite rukavice bez pudera.</p> <p>Pazite da ne kontaminirate izvorni reagens prilikom pipetiranja detekcijskog reagensa 2 u jažice mikrotitar pločice za hvatanje. Izbjegavajte kontaminaciju detekcijskog reagensa 2 aerosolima iz detekcijskog reagensa 1 ili iz laboratorijske prašine itd.</p> <p>Pogledajte dio Provjera kontaminacije u ovom odjeljku Rješavanje problema ili pogledajte <i>Korisnički priručnik za automatizirani uređaj za pranje pločica</i> za upute o testiranju kako bi se utvrdila kontaminacija ili kvarovi.</p>
<p>Širok raspon % CV među replikatima.</p>	<p>Netočno pipetiranje.</p> <p>Nedovoljno miješanje.</p> <p>Nepotpuni prijenos tekućine iz mikroepreveta za hibridizaciju u jažice mikrotitar pločice za hvatanje.</p> <p>Neodgovarajući uvjeti pranja.</p> <p>Kontaminacija jažica mikrotitar pločice detekcijskim reagensom 1.</p>	<p>Provjerite pipetor kako biste potvrdili da se pipetiraju obnovljivi volumeni. Redovito kalibrirajte pipetore.</p> <p>Dobro pomiješajte u svim koracima. Vrtložno pomiješajte prije inkubacije u sklopu denaturacije i nakon dodavanja mješavine probe. Potvrdite da se napravio vidljivi vrtlog.</p> <p>Budite pažljivi prilikom koraka prijenosa iz jažica Hybridization Microplate ili mikroepreveta u jažice mikrotitar pločice za hvatanje kako biste osigurali prijenos obnovljivih volumena.</p> <p>Jažice mikrotitar pločice operite temeljito puferom za pranje 6 puta, tako da ih svaki put napunite dok nisu prepunjene ili automatiziranim uređajem za pranje pločica primjenom odgovarajućih protokola automatiziranog uređaja za pranje pločica.</p> <p>Potvrdite da su sve radne površine čiste i suhe. Budite oprezni kada upotrebljavate detekcijski reagens 1. Izbjegavajte aerosole.</p>
<p>Lažno pozitivni rezultati dobiveni za ispitke za koje je poznato da su negativni.</p>	<p>Detekcijski reagens 2 je kontaminiran.</p> <p>Kontaminacija jažica mikrotitar pločice detekcijskim reagensom 1.</p> <p>Sušenje tapkanjem na istom području papirnatih ručnika Kimtowels Wipers ili sličnih papirnatih ručnika koji ne otpuštaju vlakna u nekoliko redaka.</p> <p>Neodgovarajuća priprema ispitka.</p> <p>Neodgovarajući uvjeti pranja.</p>	<p>Pazite da ne dođe do križne kontaminacije ispitaka dok alikvotirate detekcijski reagens 2 među ispitcima. Ako upotrebljavate samo dio kompleta, alikvotirajte volumen potreban za ispitivanje u čisti jednokratni spremnik za reagense prije punjenja pipetora.</p> <p>Jažice mikrotitar pločice operite temeljito puferom za pranje 6 puta, tako da ih svaki put napunite dok nisu prepunjene ili automatiziranim uređajem za pranje pločica. U jažicama mikrotitar pločice nakon pranja ne bi trebalo biti vidljivih ostataka ružičaste tekućine.</p> <p>Nemojte sušiti tapkanjem na području papirnato ručnika koje je prethodno korišteno jer bi moglo doći do kontaminacije.</p> <p>Dodajte odgovarajući volumen denaturacijskog reagensa i dobro pomiješajte vrtložnim miješanjem. Da biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, potvrdite da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete ili ručnom metodom ili metodom na vrtložnoj miješalici MST Vortexer 2 (za ručnu metodu na vrtložnoj miješalici jednom preokrenite epruvetu). Za ispitke u otopini PreservCyt Solution potvrdite da je provedeno ispravno miješanje i resuspenzija staničnog taloga prije inkubacije u sklopu denaturacije. Pogledajte upute za uporabu kompleta <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit za pojedinosti o protokolu. Za sve ispitke trebali biste vidjeti jasnu promjenu boje u tamnoljubičastu. Inkubirajte 45 ± 5 minuta na temperaturi od 65 ± 2 °C. Za ispitke u tekućini SurePath potvrdite da se ispitci inkubiraju 90 ± 5 minuta na 65 ± 2 °C.</p> <p>Jažice mikrotitar pločice operite temeljito puferom za pranje 6 puta, tako da svaki put napunite jažice dok nisu prepunjene ili automatiziranim uređajem za pranje pločica primjenom odgovarajućih protokola automatiziranog uređaja za pranje pločica.</p>

Uočeno je sljedeće	Mogući uzroci	Rješenja
	Kontaminacija vrška pipete materijalom koji nije denaturiran tijekom prijenosa denaturiranog ispitka u mikroeprevetu ili jažicu mikrotitar pločice koja se upotrebljava za hibridizaciju probe za HPV.	Denaturacijski korak postupka obrade ispitka mora se izvesti prema uputama opisanim u ovim uputama za uporabu. Neodgovarajuće vrložno miješanje ispitka, preokretanje epruvete i agitacija mogu rezultirati nedovršenom denaturacijom endogenih nespecifičnih RNK/DNK hibrida u cervikalnim ispitcima. Posebice kada upotrebljavate ispitke u otopini PreservCyt Solution ili tekućini SurePath Preservative Fluid, postoji vjerojatnost da će ti hibridi biti prisutni na unutarnjim stijenkama epruvete za denaturaciju ispitka. Kako biste spriječili mogući prijenos tog nedenastriranog staničnog materijala, vršak mikropipete ne smije dodirivati stijenke epruvete za denaturiranje ispitaka tijekom prijenosa denaturiranog ispitka u mikroeprevetu ili jažicu mikrotitar pločice koja se upotrebljava za hibridizaciju probe za HPV.
Povišene vrijednosti RLU negativnog kalibratora (> 200 RLU). Ostatak ispitivanja izvodi se na očekivani način.	<p>Detekcijski reagens 2 inkubiran je na temperaturi većoj od 20 – 25 °C.</p> <p>Detekcijski reagens 2 inkubiran je dulje od 30 minuta.</p> <p>Detekcijski reagens 2 ili pufer za pranje kontaminirani su alkalnom fosfatazom ili detekcijskim reagensom 1.</p>	<p>Ponovno provedite test i potvrdite da se koraci hvatanja i otkrivanja inkubiraju na temperaturi od 20 – 25 °C.</p> <p>Očitajte pločicu nakon 15 minuta inkubacije (i ne kasnije od 30 minuta inkubacije) na temperaturi od 20 – 25 °C.</p> <p>Pogledajte dio Provjera kontaminacije u ovom odjeljku Rješavanje problema.</p>
Ispitivanje ne zadovoljava kriterije provjere valjanosti. Povećani omjer PC/NC	Obrnuto postavljanje HRC i QC2-HR i/ili LRC i QC1-LR	Ponovno testirajte ispitke. Pažljivo pročitajte naljepnice na bočicama s kalibratorom i kontrolom kvalitete kako biste spriječili postavljanje tih reagensa naopako.

PROVJERA KONTAMINACIJE

Procijenjeni reagens	Postupak provjere kontaminacije	Tumačenje rezultata
Napomena: Budite pažljivi prilikom pipetiranja detekcijskog reagensa 2 da biste spriječili kontaminaciju. Nosite rukavice i pazite da vršci pipete ne dotiču nikakve radne površine.		
Detekcijski reagens 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipetirajte 75 µl alikvotiranog, ostatnog detekcijskog reagensa 2 i/ili detekcijskog reagensa 2 iz originalne bočice u praznu jažicu mikrotitar pločice za hvatanje. Inkubirajte 15 minuta na 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost. Očitajte jažice mikrotitar pločice u luminometru. <p>Napomena: Testiranje detekcijskog reagensa 2 u replikatima od 3 omogućuje optimalnu procjenu radnih značajki.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola detekcijskog reagensa 2 trebala bi biti < 50 RLU. Ako su vrijednosti detekcijskog reagensa 2 < 50 RLU, detekcijski reagens 2 može se upotrijebiti za ponavljanje ispitivanja. Ako je kontaminiran (> 50 RLU), nabavite novi komplet i ponovite ispitivanje.
Uređaj za pranje s puferom za pranje i/ili izvor vode	<ul style="list-style-type: none"> Pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 2 u 4 zasebne jažice mikrotitar pločice za hvatanje. Označite jažice brojevima 1 – 4. Jažica 1 služi kao kontrola za detekcijski reagens 2. Pipetirajte 10 µl pufera za pranje iz boce za pranje u jažicu 2. Dopustite da pufer za pranje teče kroz cijevi uređaja za pranje. Pipetirajte 10 µl pufera za pranje iz cijevi u jažicu 3. Uzmite alikvot vode koja je upotrijebljena za pripremu pufera za pranje. Pipetirajte 10 µl vode u jažicu 4. Inkubirajte 15 minuta na 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost. Očitajte jažice mikrotitar pločice u luminometru. 	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola detekcijskog reagensa 2 (jažica 1) trebala bi biti < 50 RLU. Usporedite vrijednost RLU iz jažica 2, 3 i 4 s kontrolnom vrijednosti RLU za detekcijski reagens 2 (jažica 1). Pojedinačne vrijednosti RLU za jažice 2, 3 i 4 ne bi trebale biti veće od 50 RLU od kontrolne vrijednosti RLU za detekcijski reagens 2 (jažica 1). Vrijednosti koje premašuju 50 RLU u odnosu na kontrolnu vrijednost za detekcijski reagens 2 upućuju na kontaminaciju. Pogledajte Priprema i čuvanje reagensa za upute za čišćenje i održavanje uređaja za pranje.

Procijenjeni reagens	Postupak provjere kontaminacije	Tumačenje rezultata
Automatizirani uređaj za pranje pločica	<ul style="list-style-type: none"> • Pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 2 u 5 zasebne jažice mikrotitar pločice za hvatanje. • Označite jažice brojevima 1 – 5. • Jažica 1 služi kao kontrola za detekcijski reagens 2. • Pipetirajte 10 µl pufera za pranje iz boce na uređaju za pranje pločica s oznakom Wash u jažicu 2. • Pipetirajte 10 µl tekućice za ispiranje iz boce na uređaju za pranje pločica s oznakom Rinse (Ispiranje) u jažicu 3. • Pritisnite tipku Prime (Pripremi) na tipkovnici uređaja za pranje pločica, što omogućuje da pufer za pranje teče kroz vodove. • Pipetirajte 10 µl pufera za pranje iz spremnika u jažicu 4. • Pritisnite tipku Rinse (Ispiranje) na tipkovnici uređaja za pranje pločica, što omogućuje da tekućina za ispiranje teče kroz vodove. • Pipetirajte 10 µl pufera za pranje iz spremnika u jažicu 5. • Prekrijte i inkubirajte 15 minuta na temperaturi od 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost. • Očitajte jažice mikrotitar pločice u luminometru. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrola detekcijskog reagensa 2 (jažica 1) trebala bi biti < 50 RLU. • Usporedite vrijednost RLU iz jažica 2, 3, 4 i 5 s kontrolnom vrijednosti RLU za detekcijski reagens 2 (jažica 1). Pojedinačne vrijednosti RLU za jažice 2, 3, 4 i 5 ne bi trebale biti veće od 50 RLU od kontrolne vrijednosti RLU za detekcijski reagens 2 (jažica 1). • Vrijednosti koje premašuju 50 RLU kontrole za DR2 upućuju na kontaminaciju uređaja za pranje pločica. • Pogledajte <i>Korisnički priručnik za automatizirani uređaj za pranje pločica, Decontamination Procedure</i> (Postupak dekontaminacije).

PODACI ZA KONTAKT TVRTKE QIAGEN

Pogledajte list s podacima za kontakt isporučen s ovim proizvodom kako biste kontaktirali svog lokalnog predstavnika tvrtke QIAGEN.

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

Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

Ovaj proizvod i metode njegove uporabe pokriveni su jednim ili više patenata navedenih u nastavku:

Brojevi patenata za HPV u SAD-u

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

Broj patenta za Hybrid Capture u SAD-u

6,228,578B1

Sažetak testa digene HC2 HPV DNA Test

VAŽNO: Važno je temeljito se upoznati s detaljnim postupkom prije uporabe ovog sažetka.

	Postupak	
	Metoda ručnog vrtložnog miješanja	Metoda na vrtložnoj miješalici Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
DENATURACIJA (Za ispitke u otopini PreservCyt Solution pogledajte upute za uporabu za komplet digene HC2 Sample Conversion Kit)	<p>Označite mikroeprovete za hibridizaciju. Pripremite denaturacijski reagens.</p> <p>↓</p> <p>Pipetirajte denaturacijski reagens (volumen je jednak polovini volumena ispitka) u kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke. Vrtložno pomiješajte svaki ispitak, kalibrator i kontrolu kvalitete pojedinačno u trajanju od 5 sekundi na velikoj brzini (za pojedinosti proučite ove upute za uporabu). Potvrdite da je boja u svim epruvetama ljubičasta.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte na 65 ± 2 °C tijekom 45 ± 5 minuta.</p> <p>↓</p> <p>Pripremite mješavinu probe za HPV.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Označite pločicu za hibridizaciju. Pripremite denaturacijski reagens.</p> <p>↓</p> <p>Pipetirajte denaturacijski reagens (volumen je jednak polovini volumena ispitka) u kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke. Potvrdite da je boja u svim epruvetama ljubičasta.</p> <p>↓</p> <p>Prekrijte stalak folijom i poklopcem.</p> <p>↓</p> <p>Vrtložno miješajte 10 sekundi.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte na 65 ± 2 °C tijekom 45 ± 5 minuta.</p> <p>↓</p> <p>Pripremite mješavinu probe za HPV.</p> <p>↓</p>
HIBRIDIZACIJA Metoda s koktelom kombiniranih proba	<p>Metoda u vodenoj kupelji</p> <p>Dobro pomiješajte denaturirani ispitak i pipetirajte 75 µl u epruvete.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte 10 minuta na $20 - 25$ °C</p> <p>↓</p>	<p>Metoda na grijaču Microplate Heater I</p> <p>Dobro pomiješajte denaturirani ispitak i pipetirajte 75 µl u jažice mikrotitar pločice.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte 10 minuta na $20 - 25$ °C</p> <p>↓</p>
Metoda s dvije probe	<p>Pipetirajte 25 µl koktela kombiniranih proba u mikroeprovete za hibridizaciju.</p> <p>ILI</p> <p>Dobro pomiješajte denaturirani ispitak i pipetirajte 75 µl u epruvete „LR”.</p> <p>Dobro pomiješajte denaturirani ispitak i pipetirajte 75 µl u epruvete „HR”.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte 10 minuta na $20 - 25$ °C</p> <p>↓</p> <p>Pipetirajte 25 µl mješavine probe za niskorizične tipove HPV-a u epruvete „LR”.</p> <p>Pipetirajte 25 µl mješavine probe za visokorizične tipove HPV-a u epruvete „HR”.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Folijom za prekrivanje pločica prekrijte mikroeprovete i protresite ih na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min u trajanju od 3 ± 2 minute. Potvrdite da je boja u svim epruvetama žuta.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte na 65 ± 2 °C tijekom 60 ± 5 minuta. Pripremite mikrotitar pločicu za hvatanje.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Pipetirajte 25 µl koktela kombiniranih proba u jažice Hybridization Microplate.</p> <p>ILI</p> <p>Dobro pomiješajte denaturirani ispitak i pipetirajte 75 µl u jažice mikrotitar pločice „LR” i 75 µl u jažice mikrotitar pločice „HR”.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte 10 minuta na $20 - 25$ °C</p> <p>↓</p> <p>Pipetirajte 25 µl mješavine probe za niskorizične tipove HPV-a u jažice mikrotitar pločice „LR”.</p> <p>Pipetirajte 25 µl mješavine probe za visokorizične tipove HPV-a u jažice mikrotitar pločice „HR”.</p> <p>↓</p> <p>Poklopcem pločice prekrijte mikrotitar pločicu i protresite je na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min u trajanju od 3 ± 2 minute. Potvrdite da je boja u svim epruvetama žuta.</p> <p>↓</p> <p>Inkubirajte na 65 ± 2 °C tijekom 60 ± 5 minuta. Pripremite mikrotitar pločicu za hvatanje.</p> <p>↓</p>
HVATANJE HIBRIDA	<p>Prenesite sadržaj iz svake jažice pločice za hibridizaciju ili mikroeprovete u odgovarajuću jažicu na mikrotitar pločici za hvatanje 8-kanalnim pipetom.</p> <p>Prekrijte poklopcem pločice ili folijom za prekrivanje pločica.</p> <p>Tresite na 1100 ± 100 o/min na temperaturi od $20 - 25$ °C u trajanju od 60 ± 5 minuta. Pripremite pufer za pranje.</p> <p>↓</p> <p>Pretočite i tapkanjem osušite mikrotitar pločicu za hvatanje (za pojedinosti proučite ove upute za uporabu).</p> <p>↓</p>	

OTKRIVANJE HIBRIDA	Pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 1 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje. Prekrijte mikrotitar pločicu za hvatanje poklopcem pločice, folijom Parafilm ili sličnom. Inkubirajte 30 – 45 minuta na 20 – 25 °C. Operite pločicu primjenom željene metode. ↓	
PRANJE	<p style="text-align: center;">Metoda ručnog pranja</p> Pretočite i tapkanjem osušite mikrotitar pločicu za hvatanje (za pojedinosti proučite ove upute za uporabu). ↓ Operite 6 puta. ↓ Osušite tapkanjem na papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna. ↓	<p style="text-align: center;">Metoda s automatiziranim uređajem za pranje pločica</p> Postavite pločicu na uređaj za pranje pa pritisnite „START/STOP”(Pokreni/Zaustavi) za početak. ↓ Prijedite na sljedeći korak. ↓ ↓ ↓ ↓
AMPLIFIKACIJA SIGNALA	Pipetirajte 75 µl detekcijskog reagensa 2 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje. Inkubirajte 15 – 30 minuta na 20 – 25 °C. ↓	
OČITAVANJE	Očitajte mikrotitar pločicu za hvatanje na instrumentu DML. ↓ Potvrdite valjanost ispitivanja i protumačite rezultate ispitka.	