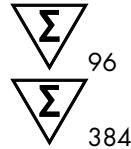


Elokuu 2015

# *digene<sup>®</sup> HC2 High-Risk HPV DNA - kokeen käyttöohjeet*



**IVD**

Kemiluminisenssi-kuoppalevyllä suoritettava signaalin vahvistava in vitro - nukleiinihappohybridisaatiomääritys 13 korkean riskin ihmisen papilloomavirustyyppin (HPV) DNA:n kvalitatiiviseksi osoittamiseksi kohdunkaulan ja emättimen näytteistä.

Käytettäväksi yhdessä seuraavien kanssa:

- *digene* HC2 DNA Collection Device
- *digene* Specimen Transport Medium
- Hologic PreservCyt<sup>®</sup> Solution
- BD SurePath<sup>®</sup> Preservative Fluid



**REF**

5197-1330 (1-levyinen kitti)  
618111 (4-levyinen kitti)



QIAGEN  
19300 Germantown Road  
Germantown, MD 20874  
USA

**EC REP**

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
SAKSA

1058538FI Rev. 02

---

Tärkeimmät muutokset edelliseen käyttöohjeeseen

- Lisätty postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmistelutoimenpiteet QIASymphony® DSP HPV Media -kitillä sekä siihen liittyvät suorituskykytiedot.
- Päivitetty yhdenmukaiseksi kemikaalien maailmanlaajuisen luokitus- ja merkintäjärjestelmän (GHS) kanssa.

# Sisällysluettelo

Käyttötarkoitus .....	8
Summary and Explanation .....	9
Patogeenitiedot .....	10
Menetelmän periaate .....	10
Näytteen valmistelu QIA Symphony SP -laitteella .....	12
Näytteen valmistelu QIA Symphony DSP HPV Media -kitillä .....	12
Näytteen valmistelu QIA Symphony DSP AXpH DNA -kitillä .....	12
Testaus Rapid Capture System (RCS) -järjestelmässä .....	13
Tarvittavat materiaalit .....	15
1-levyisessä kitti .....	15
4-levyisessä kitti .....	15
Kitin sisältö .....	16
Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen .....	18
In vitro -diagnostiset laitteet ja materiaalit .....	18
Yleiset laboratoriossa käytettävät laitteet ja materiaalit .....	19
Lisälaitteita ja -materiaaleja PreservCyt-näytteiden valmisteluun .....	20
Lisälaitteita ja -materiaaleja SurePath-näytteiden valmisteluun .....	20
Varoitukset ja varotoimenpiteet .....	21
Varoitukset .....	21
Näytteet .....	21
Natriumatsidi .....	22
Puskuri N2 .....	22
Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä .....	22
Kitin osien turva- ja vaaralausekkeet .....	23
Varotoimenpiteet .....	24
Reagenssin säilytys ja käsittely .....	26
Kitin osat .....	26

Valmistellut reagenssit.....	26
Näytteiden ottaminen ja valmisteleminen.....	26
Kohdunkaulan ja emättimen näytteet STM:ssä.....	27
Kohdunkaulan koepalat .....	27
Kohdunkaulanäytteet PreservCyt-liuoksessa.....	28
Kohdunkaulanäytteet SurePath-säilytysnesteessä.....	29
SurePath-näytteiden automaattinen valmistelu .....	30
Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden automaattinen valmistelu .....	30
Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalinen valmistelu .....	30
Toimenpide.....	31
Reagenssin valmistelu .....	31
Denaturointireagenssi .....	33
Denaturointireagenssi 2 .....	34
Koetinseos.....	35
Pesupuskuri .....	36
Levylayoutin luominen.....	37
Näytteen valmistelu .....	39
PreservCyt-näytteiden valmisteleminen QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä .....	39
SurePath-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmisteleminen QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä .....	40
PreservCyt-näytteiden valmisteleminen QIAasymphony DSP AXpH DNA -kitillä .....	40
PreservCyt-näytteiden manuaalinen valmisteleminen .....	40
Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalinen valmistelu .....	41
QIAasymphony SP -laitteella valmisteltujen näytteiden denaturaatio ja hybridisaatio .....	43
DNA-eluaattien valinnainen pysähtymiskohta .....	44
Hybridization of DNA eluates.....	44
Varo nesteen läikkymistä sekä hybridisaatiokuoppalevyn kuoppien reunojen koskettamista.....	45
Ravistamisen jälkeen kalibraattorien, laatukontrollien ja DNA-eluaattien pitäisi muuttua keltaisiksi. ....	45

Violetteina pysyvät näytteet eivät ehkä ole saaneet riittävästi koetinseosta. Lisää vielä 25 µl koetinseosta violeteiksi jääneisiin näytteisiin ja ravista uudelleen. Jos näyte on edelleen violetti, testaa näyte uudelleen. ....	45
STM-näytteiden sekä manuaalisesti valmistettujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden denaturointi ja hybridisaatio .....	45
Kalibraattorien, laatukontrollien ja STM-näytteiden denaturointi .....	45
Valmistettujen STM-näytteiden sekä manuaalisesti valmistettujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden hybridisaatio .....	48
Hybridisaatio kuoppalevyllä ja Microplate Heater I -laitteella .....	48
Hybridisaatio mikroputkilla ja vesihauteella.....	50
Varmista telineen alapuolelta, että kaikissa hybridisaatiomikroputkissa on riittävä määrä koetinseosta. ....	50
Hybridinsieppaus .....	51
Hybridin osoittaminen.....	53
Pesu .....	54
Levyn pesu levykonepesurilla .....	54
Manuaalinen pesumenetelmä .....	55
Signaalin monistuminen .....	56
Sieppauskuoppalevyn mittaus ja tulosten laatiminen .....	57
Tulosten tulkinta.....	58
STM-näytteiden koetulokset.....	58
SurePath-näytteiden koetulokset.....	58
PreservCyt-näytteiden koetulokset .....	58
RLU/CO-arvo on lähes 1,0.....	59
Muut HPV-tyypit .....	59
Analyysin kalibroinnin verifiointi.....	59
Negatiivinen kalibraattori .....	59
Positiivinen kalibraattori .....	60
Positiivisen kalibraattorin keskiarvo / negatiivisen kalibraattorin keskiarvo.....	60
Raja-arvon (cut-off, CO) laskenta.....	60
Laaduntarkkailu.....	61
Limitations .....	62

Suorituksen ominaispiirteet .....	64
Kliiniset suoritusominaisuudet seulottaessa potilaita, joilla Papa-koetulos on normaali, riskin arvioinnin apuvälineenä potilashallinnassa.....	64
Kliininen suoritus Papa-koetuloksen ASC-US saaneiden potilaiden seulonnassa kolposkopia-lähetteen tarpeen määrittämistä varten.....	69
Kliininen herkkyys ja spesifisyys korkea-asteisen sairauden riskin määrittämiseksi naisilla, joiden papa-tuloksena on LSIL tai HSIL .....	71
Emätinnäytteiden ja potilaiden itse ottamien näytteiden toimivuus .....	75
Analyttinen herkkyys .....	76
Näytteiden välinen ekvivalenssi .....	77
STM- ja PreservCyt-näytteiden olevien näytteiden välinen ekvivalenssi .....	77
PreservCyt-näytteiden manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen PreservCyt-näytteiden valmistelun välinen ekvivalenssi .....	77
PreservCyt-näytteiden manuaalisen valmistelun ja PreservCyt-näytteiden QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritettujen valmistelun välinen ekvivalenssi.....	78
STM-käsittelyn ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalisen valmistelun välinen yhtäpitävyys.....	78
Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen valmistelun yhtäpitävyys .....	79
Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalisen valmistelun ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen valmistelun yhtäpitävyys .....	80
Koemenetelmien välinen yhtäpitävyys .....	81
Toistettavuus .....	85
Manuaalisen testauksen yleinen toistettavuus .....	85
Toistettavuus kliinisillä STM-näytteillä .....	85
Kliinisten PreservCyt-näytteiden toistettavuus .....	89
Kliinisten SurePath-näytteiden toistettavuus.....	100
Ristireagointi.....	105
Ristihydridisaatio.....	107
Veren ja muiden aineiden vaikutus STM-näytteisiin .....	108
Veren ja muiden aineiden vaikutus PreservCyt-näytteisiin .....	108
Manuaalinen näytteen valmistelu .....	108

---

Näytteen valmistelu QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä.....	108
Näytteen valmistelu QIAasymphony DSP AXpH DNA -kitillä.....	109
Veren ja muiden aineiden vaikutus SurePath-näytteisiin.....	110
SurePath-näytteiden valmisteleminen QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä.....	110
Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmisteleminen QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä .....	111
Siirtyminen .....	111
Reagenssien stabiilitetti laitteessa .....	113
Viitteet.....	116
Symbolit .....	121
Vianetsintä .....	122
DR2:n kontaminaation tarkastus .....	129
Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus.....	130
Automated Plate Washer -laitteen kontaminaation tarkastaminen .....	130
Yhteystiedot .....	131

# Käyttötarkoitus

In vitro -diagnostiikkaan (IVD).

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa käytetään Hybrid Capture® 2 (HC2) -teknologiaa. Se on kemiluminesenssiuoppalevyllä suoritettava signaalin vahvistava nukleinihappohybridisaatiomääritys HPV DNA:n 13 korkean riskin tyyppien kvalitatiiviseen osoittamiseen kohdunkaulan ja emättimen näytteistä.

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella voidaan tutkia seuraavat kohdunkaulan ja emättimen näytteet:

- Lääkärin *digene* HC2 DNA Collection Device -näytteenottolaitteella ottamat kohdunkaulanäytteet
- Itse *Digene* HC2 DNA Collection Device -näytteenottolaitteella otetut vaginanäytteet
- *digene* Specimen Transport Medium (STM) -näytteenkuljetusaineeseen otetut koepalat
- Harjalla otetut tai harjan/lastan yhdistelmällä otetut näytteet, jotka on asetettu PreservCyt-liuokseen tai SurePath-säilytysnesteeseen

Kokeen käyttö on indisoitu:

- Korkean riskin HPV-tyyppien 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 detekointiin, joiden on osoitettu olevan ensisijainen syyshdetekijä kohdunkaulan syövän kehittämisessä.
- Initiaalisena perusväestön seulontakokeena, joko yksin tai yhdessä papa-kokeen kanssa, sellaisten naisten tunnistamiseksi, joilla on lisääntynyt riski sairastua kohdunkaulan syöpään tai joilla on korkean asteen kohdunkaulan sairaus. HPV-diagnoosi osoittaa iän lisääntymisen myötä yhä voimakkaammin kohdunkaulan sairauden.
- Seurantakokeena potilailla, joiden papa-näytteessä on ilmennyt poikkeavuutta tai joilla on kohdunkaulan sairaus, määrittämään kolposkopian tai muiden jatkotoimenpiteiden tarpeellisuus.
- Seurantakokeena potilailla, joilla on Papa-kokeessa todettu matala-asteinen kohdunkaulan intraepiteelinen leesio (LSIL) tai korkea-asteinen kohdunkaulan intraepiteelinen leesio (HSIL) ennen kolposkopiaa. Näiden potilaiden *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetulokset auttavat lääkäreitä potilashallinnassa, sillä ne tukevat naisten riskinarviointia korkea-asteisen sairauden poissulkemiseksi.



## Summary and Explanation

Tietyt naisen genitaalialueella esiintyvät HPV-tyypit liittyvät useisiin sairauksiin, mukaan lukien kondylooma, bowenoidi papuloosi, kohdunkaulan, vaginan ja vulvan intraepiteelineoplasiat ja karsinooma. (1–3). Näiden virusten tarttuminen pääasiassa sukupuoliteitse on yleisesti myönnetty ja korkean riskin HPV -tyyppien on todettu olevan pääasiallisia riskitekijöitä kohdunkaulan syövän kehittymiselle (4–8).

Tähän saakka HPV:n in vitro -viljely ei ole ollut mahdollista eikä immunologisin testein ole pystytty osoittamaan kohdunkaulan HPV-infektiota. Epäsuoraa näyttöä anogenitaalisesesta HPV-infektiosta voidaan saada lääkärintarkastuksessa tai kun Papa-näytteissä tai koepaloissa havaitaan tyyppillisiä virusreplikaation assosioitavia solumuutoksia. Vaihtoehtoisesti koepalat voidaan analysoida nukleiinihappohybridisaatiolla HPV:n DNA:n toteamiseksi suoraan.

Historiallisesti HPV 16 ja HPV 18 -viruksia on pidetty korkean riskin, syöpään assosioitavina HPV-tyyppeinä (8–10). HPV-tyypeillä 31, 33 ja 35 on osoitettu olevan intermediaarinen yhteys syövän kehittymiselle (2, 11–14). Intermediaarinen assosiaatio johtuu siitä, että syöpiä useammin näitä tyyppisiä havaitaan korkea-asteisessa kohdunkaulan intraepiteeliaalisissa leesioissa. Siksi näiden tyyppien ilmenemisestä johtuva syöpien induktio on epätodennäköisempää kuin korkean riskin HPV DNA -tyyppien ilmeneminen (15). Nämä viisi HPV-tyyppiä yhteensä vastaavat noin 73 %:a HPV-infektioista (16, 17). Muut HPV-tyypit, mukaan lukien 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68, on osoitettu pääasiallisiksi HPV-viruksiksi loppuisissa leesioissa (17–27). Nämä HPV-tyypit voidaan luokitella myös keskiasteen ja korkean riskin ryhmiin sen mukaan millainen niiden suhteellinen jakauma on eri histopatologisissa diagnoosiluokituksissa (16, 17, 24–28).

Vaikka HPV DNA:ta on todettu esiintyvän noin 10 %:lla naisista, joilla kohdunkaulan epiteeli on normaali, todelliseen esiintyvyyteen tietyissä naisryhmissä vaikuttavat voimakkaasti ikä ja muut demografiset muuttujat (2, 10, 16, 29). Prospektiivisissä tutkimuksissa on ilmennyt, että 15–28 %:lle HPV DNA -positiivisista naisista kehittyi kohdunkaulan epiteelin neoplasia (SIL) kahden vuoden kuluessa, kun HPV DNA -negatiivisilla naisilla SIL kehittyi vain 1–3 %:lla (30, 31). Etenemisriski oli suuri etenkin HPV-tyypeillä 16 ja 18 (noin 40 %) muihin HPV-tyyppeihin verrattuna (30).

## Patogeenitiedot

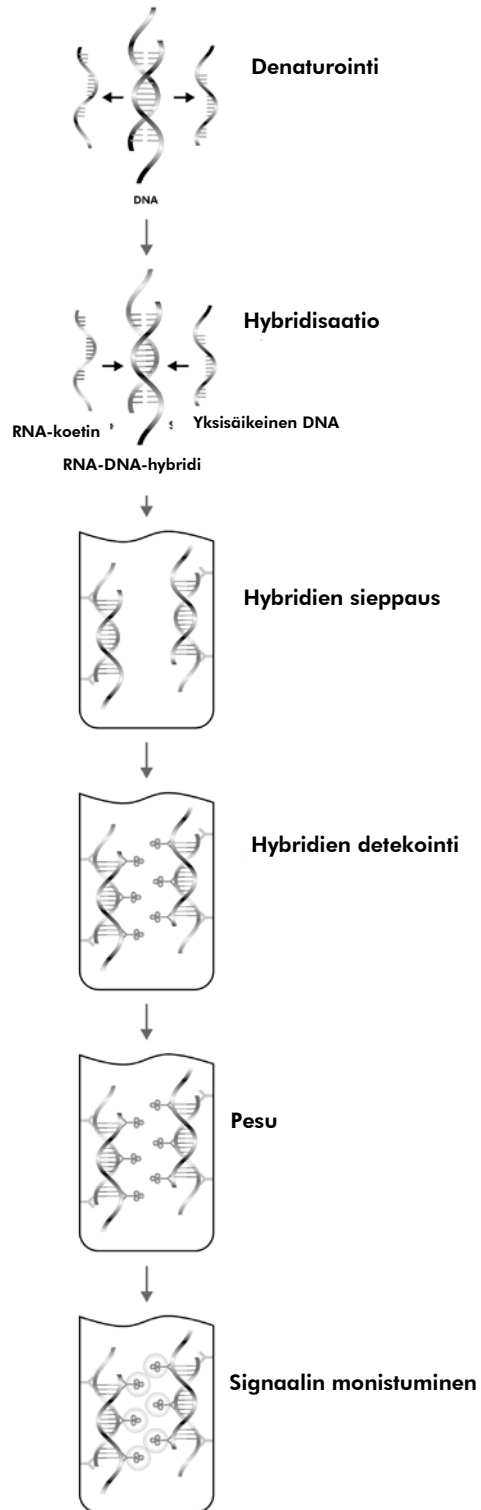
Ihmisen papilloomavirus koostuu ikosahedraalisesta viruspartikkelista (virionista). Se sisältää 8000 emäsparista koostuvan kaksinauhaisen ja rengasmaisen DNA-molekyylin, jonka ympärillä on proteiinikapsidi. Epiteelisolujen infektoiduttua virus-DNA etabloituu kauttaaltaan koko epiteeliin, mutta intakteja virioneja esiintyy vain kudoksen ylemmissä kerroksissa. Sen vuoksi virus-DNA:ta todetaan joko virioneissa tai episomaaleina tai integroituina HPV-sekvensseinä leesion tyypistä ja asteesta riippuen.

## Menetelmän periaate

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa käytetään HC2-tekniikkaa. Se on kemiluminesenssi-kuoppalevyllä suoritettava signaalin vahvistava nukleiinihappohybridisaatiomääritys. Kohde-DNA:ta sisältävät näytteet hybridisoituvat spesifiin HPV RNA -koettimeen. Näin syntyneet RNA:DNA-hybridit siepataan kuoppalevyllä, joka on huolellisesti sivelty RNA:DNA-spesifeillä vasta-aineilla. Immobilisoitujen hybridien annetaan sitten reagoitua alkaliseen fosfataasiin konjugoituihin, RNA:DNA-hybridispesifisiin vasta-aineisiin ja detekoidaan kemiluminesenssi-substraattilla. Jokaiseen vasta-aineeseen konjugoituu useita alkalifosfataasimolekyylejä. Konjugoituneet vasta-aineet sitoutuvat monilukuisina kuhunkin siepattuun hybridiin ja saavat aikaan huomattavan signaalin vahvistumisen. Kun sitoutunut alkalinen fosfataasi halkaisee substraatin, säteilee valoa, joka mitataan suhteellisen valon yksiköllä (RLU) *digene* Microplate Luminometer (DML) -laitteessa. Syntyvän valon intensiteetti ilmaisee, että näyte joko sisältää tai ei sisällä kohde-DNA:ta.

Mittauksessa saatu RLU, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin määrityksen raja-arvo (cutoff, CO), osoittaa korkean riskin HPV DNA -sekvenssien ilmenemiseen näytteessä. Raja-arvoa pienempi RLU-arvo osoittaa, että näytteessä ei ole spesifejä korkean riskin HPV DNA -sekvenssejä tai että HPV DNA -tasot jäävät alle analyysin detekointirajan.

## Hybridien sieppausmenetelmä



## Näytteen valmistelu QIASymphony SP -laitteella

PreservCyt-näytteet voidaan valmistella automaattisesti QIASymphony SP -laitteella sekä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä tai QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä.

### Näytteen valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä

QIASymphony DSP HPV Media -kiti sisältää hybridisaatiokuoppalevyllä näyteutteita, jotka ovat valmiita automaattiseen testaukseen Rapid Capture® -järjestelmässä (RCS) digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen kanssa. QIASymphony SP suorittaa kaikki näytteen valmistelutoimenpiteet kerralla enintään 88 näyteelle, enintään 24 näytteen erissä.

QIASymphony SP käsittelee 88 PreservCyt-näytettä 2 tunnissa ja 15 minuutissa. Kun näytteet on ladattu laitteeseen, muita käyttäjän toimenpiteitä ei vaadita.

QIASymphony SP käsittelee 88 SurePath-näytettä 1 tunnissa ja 45 minuutissa. Kun näytteet on ladattu laitteeseen, muita käyttäjän toimenpiteitä ei vaadita. QIASymphony SP -laitteessa suoritettujen näytteen valmistelun jälkeen näyteutteita inkuboidaan 90 minuuttia hybridisaatiokuoppalevyllä Microplate Heater -laitteessa. Näyteutteen inkuboinnin aikana kalibraattorit ja laatukontrollit denaturoidaan erikseen vesihauteessa. Kun näyteutteen inkubointi on valmis, ne pipetoidaan manuaalisesti hybridisaatiokuoppalevyn ensimmäiselle palstalle. SurePath-näytteen valmistelu QIASymphony SP -laitteella ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä voidaan tehdä joko ennen sytologista käsittelyä tai kun sytologinen käsittely on valmis.

**Tärkeää:** QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelluista PreservCyt- ja SurePath-näytteistä tuotetut näyteutteen saa testata ainoastaan RCS-järjestelmässä. Testin suorittamista manuaalisesti näyteutteilla ei ole validoitu.

Kun näytteet valmistellaan automaattisesti QIASymphony-laitteella, katso tarvittavat toimenpiteet koskevat ja muut tarvittavat tiedot asianmukaisista QIASymphony-käyttöoppaista ja QIASymphony DSP HPV Media -kitin käsikirjasta (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) näiden käyttöohjeiden lisäksi.

### Näytteen valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä

QIASymphony DSP AXpH DNA -kiti sisältää DNA-eluaatit hybridisaatiokuoppalevyille, jotka ovat valmiit manuaaliseen testaukseen tai automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. QIASymphony SP suorittaa kaikki näytteen valmistelutoimenpiteet

kerralla enintään 88 näytteelle, enintään 24 näytteen erissä. QIASymphony SP käsittelee 88 näytettä 4 tunnissa ja 30 minuutissa. Kun näytteet on ladattu laitteeseen, muita käyttäjän toimenpiteitä ei vaadita.

Kun näytteet valmistellaan automaattisesti QIASymphony-laitteella, katso tarvittavat toimenpidettä koskevat ja muut tarvittavat tiedot asianmukaisista QIASymphony-käyttöoppaista ja QIASymphony DSP AXpH DNA -kitin käsikirjasta (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) näiden käyttöohjeiden lisäksi.

## Testaus Rapid Capture System (RCS) -järjestelmässä

Suurten näytemäärien tehokas testaus digene HC2 High-Risk HPV DNA -testeillä on mahdollista RCS-järjestelmässä. 4-levyistä kittiä (tuotenumero 618111) saa käyttää ainoastaan RCS-järjestelmän kanssa. Sitä ei voida käyttää manuaaliseen testaukseen.

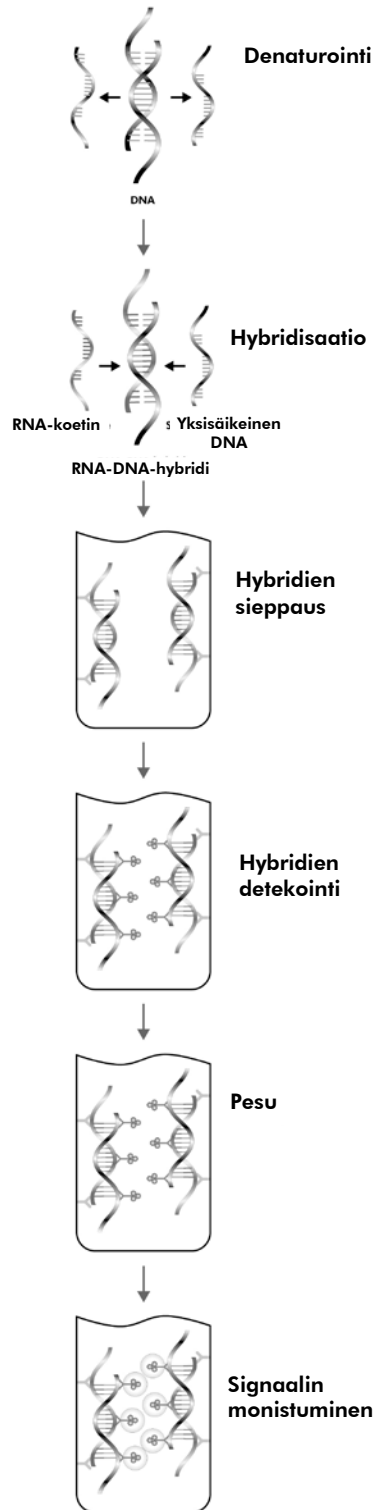
RCS on yleiskäyttöinen automaattinen pipetointi- ja laimennusjärjestelmä, jota voidaan käyttää digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeiden kanssa suurten näytemäärien tehokkaaseen testaukseen. Järjestelmä käsittelee enintään 352 näytettä 8 tunnissa mukaan lukien 3,5 tunnin jakso, jonka aikana käyttäjän toimenpiteet eivät ole tarpeen; 13 tunnissa voidaan saada enintään 704 näytetulosta.

Näytteet valmistellaan RCS:n ulkopuolella ennen niiden asettamista RCS-tasolle. Lisäksi kemiluminesenssisignaalin tunnistus ja tulosten raportointi tapahtuvat erillisellä DML-laitteella sekä manuaalisessa testauksessa että automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä.

Kaikki digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen vaiheet suoritetaan samassa järjestyksessä kuin manuaalinen testaus. RCS mahdollistaa enintään 4 kuoppalevyn yhteiskäsittelyn jokaisen kuoppalevyn sisältäessä näytteet sekä tarvittavat koekalibraattorit ja laatukontrollit.

RCS-järjestelmässä suoritettavan automaattisen testauksen osalta katso tarvittavat toimenpidettä koskevat ja muut tarvittavat tiedot näiden käyttöohjeiden lisäksi seuraavista käyttöoppaista: Rapid Capture System -järjestelmän käyttöopas ja Rapid Capture -järjestelmän käyttöopas — *digene HC2 DNA -kokeiden suorittaminen QIASymphony SP -laitteella käsitellyillä näytteillä (Rapid Capture System User Manual and Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples)*.

## Hybridien sieppausmenetelmä



Manuaalinen näytteen valmistelu

Automaattinen valmistelu Rapid Capture

# Tarvittavat materiaalit

## 1-levyisessä kitti

1-levyisessä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koeitissä (tuotenumero 5197-1330) on 96 koetta.

1-levyisellä kitillä suoritetussa manuaalisessa testauksessa pienin suositeltava koemäärä on 24 käyttökertaa kohti. Jos kerralla halutaan testata vähemmän kuin 24 koetta, kitin sisältämien kokeiden yhteismäärää voidaan pienentää rajoitettujen reagenssimäärien vuoksi. Potilastulosten määrä vaihtelee kitin käyttökertojen määrästä riippuen seuraavalla tavalla:

Käyttökertojen määrä	Potilastulosten määrä
1	88
2	80
3	72
4	64

Automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä 1-levyisen kitin käyttö edellyttää täyden kuoppalevyn testausta (88 näytettä) jokaisella RCS-järjestelmän käyttökerralla. Osittaisten kuoppalevyjen testaus on sallittua. Silloin kuitenkin käytetään koko kitti laitteen käyttöön vaadittavan tyhjän tilavuuden vuoksi.

## 4-levyisessä kitti

4-levyisessä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koeppakkauksessa (tuotenumero 618111) on 384 koetta.

4-levyistä kittiä voidaan käyttää ainoastaan automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä. 384 kokeen tekemistä varten 4-levyistä kittiä voidaan käyttää yhteen tai kahteen RCS-ajoon. Jos haluat tehdä useampia ajoja kuin kaksi, kitin kokeiden kokonaismäärä voi pienentyä reagenssien rajallisen tilavuuden vuoksi.

## Kitin sisältö

<b><i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test</b>		
<b>Tuotenumero</b>	<b>5197-1330</b>	<b>618111</b>
<b>Kokeiden</b>	<b>96</b>	<b>384</b>
Indicator Dye (osoitinväri) Sisältää 0,05 % (w/v) natriumatsidia	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent (denaturointireagenssi)* Laimennettu natriumhydroksidiliuos (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent (koettimen laimennin)* Puskuroitu 0,05 % (w/v) natriumatsidia sisältävä liuos	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (korkean riskin HPV:n koetin) HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 RNA-koetin puskuroidussa liuoksessa (punainen korkki)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (pienen riskin HPV:n laatukontrolli) 5 pg/ml (500 000 kopiota/ml) kloonattua HPV 6 DNA:ta ja kantaja-DNA:ta 0,05 % (w/v) natriumatsidia sisältävässä STM:ssa	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (korkean riskin HPV:n laatukontrolli) 5 pg/ml (500 000 kopiota/ml) kloonattua HPV 16 DNA:ta ja kantaja-DNA:ta 0,05 % (w/v) natriumatsidia sisältävässä STM:ssa	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (negatiivinen kalibraattori) Kantaja-DNA:ta 0,05 % (w/v) natriumatsidia sisältävässä STM:ssa	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (korkean riskin HPV:n kalibraattori) 1 pg/ml kloonattua HPV 16 DNA:ta ja kantaja-DNA:ta 0,05 % (w/v) natriumatsidia sisältävässä STM:ssa	1 ml	2 ml
Capture Microplate (sieppauskuoppalevy) Siveltä vuohen polyklonaalisilla anti-RNA-DNA- hybridivasta-aineilla	1	4
Detection Reagent 1 (detekointireagenssi 1) Alkaliseen fosfataasiin konjugoituja RNA-DNA-hybridien vasta-aineita 0,05 % (w/v) natriumatsidia sisältävässä puskuriliuoksessa	12 ml	40 ml



<b><i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test</b>		
<b>Tuotenumero</b>	<b>5197-1330</b>	<b>618111</b>
<b>Kokeiden</b>	<b>96</b>	<b>384</b>
Detection Reagent 2 (detekointireagenssi 2)	12 ml	40 ml
CDP-Star® + Emerald II (kemiluminesenssisubstraatti)		
Wash Buffer Concentrate (pesupuskuritiiviste)*	100 ml	2 x 100 ml
Sisältää 1,5% (w/v) natriumatsidia		

\* Katso terveys- ja turvallisuustiedot kohdasta "Varoitukset ja varotoimenpiteet", sivu 21.

# Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

**Tärkeää:** Varmista, että tässä toimenpiteessä käytetyt laitteet on tarkistettu ja kalibroitu valmistajan suositusten mukaisesti.

## In vitro -diagnostiset laitteet ja materiaalit

QIAGEN toimittaa ainoastaan laitteita ja materiaaleja, jotka on validoitu digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeilla.

- *digene* Hybrid Capture 2 -järjestelmä ("*digene* HC2 -järjestelmä"), joka sisältää QIAGENin hyväksymän luminometrin ("*DML*-laite"), QIAGENin hyväksymän tietokoneen sekä tietokoneen oheislaitteet (näyttö, näppäimistö, hiiri, tulostin ja tulostimen kaapeli), *digene* HC2 -järjestelmän ohjelmiston ("*digene*-analyysimääritysohjelmisto"), *digene* HC2 -järjestelmän analyysiprotokollat HPV:n määrittystä varten, LumiCheck-levyn ohjelmiston ja *digene* HC2 -järjestelmän ohjelmiston käyttöoppaan (*digene HC2 System User Manual*).
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (lisävaruste)\*
- Sekoitusteline ja kansi (lisävaruste)\*
- *digene*-näyteteline ja kansi (lisävaruste)\*
- EXPAND-4-pipetti ja teline (lisävaruste)†
- Putkitiivisteiden annostelija ja leikkuri (lisävaruste, käytetään MST Vortexer 2:n kanssa)
- Rapid Capture System (vaaditaan käyttöön 4-levyisen kitin kanssa; 1-levyisen kitin lisävaruste)
- Pesulaite
- Hybridisaatiokuoppalevyt
- Kuoppalevyjen kannet
- RCS-kuoppalevyn kuoppaliuskat\*
- RCS-reagenssikaukalot\*
- RCS-reagenssikaukaloiden kannet\*

\* Vaaditaan automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä.

† Yleisväline STM-näytteiden siirtoon hybridisaatiokuoppalevyille. Muita yleisiä, laajennettavia, monikanavaisia pipettejä voidaan käyttää, jos laajennetun kärjen koko 3,2 cm on saavutettavissa.

- RCS-kertakäyttökärjet\*
- RCS-korkit\*
- Puskuri N2<sup>†</sup>
- Puskuri D2<sup>†</sup>
- Sininen RCS-pesuri<sup>‡</sup>
- Erikoispitkät pipettikärjet
- Näytteenottoputket
- Näytteenottoputkien teline
- Näytteenottoputkien kierrekorkit
- Kertakäyttöiset reagenssisäiliöt
- DuraSeal™-putkitiivistekalvo
- Hybridisaatiomikroputket<sup>§</sup>
- Mikroputkiteline<sup>§</sup>
- Levytiivisteet<sup>§</sup>

## Yleiset laboratoriossa käytettävät laitteet ja materiaalit

- 65 ± 2 °C:n vesihaude, joka on riittävän suuri näytetelineelle (leveys 21 cm x syvyys 32 cm x korkeus 18 cm)
- Mikrosentrifugi
- Vortexer ja maljakiinnitin
- Yksikanavainen pipetti; tilavuusasetusta voidaan säätää välillä 20–200 µl ja 200–1 000 µl
- Ns. positive displacement -toistopipetti, kuten Eppendorf® Repeater® -pipetti
- 8-kanavainen pipetti: tilavuusasetusta voidaan säätää välillä 25–200 µl
- Ajastin
- Natriumhypokloriittiliuos, 0,5 % v/v
- Parafilm® tai vastaava
- Aerosolilta suojatut kertakäyttöpipettikärjet yksikanavaisiin pipetteihin (20–200 µl ja 200–1000 µl)
- Kertakäyttökärjet nk. positive displacement -toistopipetteihin (12,5, 5, 2,5 ja 1,25 ml)
- Kertakäyttökärjet 8-kanavaisiin pipetteihin (25–200 µl)

\* Vaaditaan automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä.


† Vaaditaan QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmistettujen näytteiden testaukseen.


‡ Vaaditaan QIASymphony DSP HPV Media -kitillä käsiteltävien näytteiden automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä.


§ Vaaditaan hybridisaatioon, jossa käytetään mikroputkia ja vesihaudetta.

- Kimtowels®-pyyhkeitä tai muita nukkaamattomia paperiliinoja
- Kertakäyttösuojus pöydälle
- Puuterittomat kertakäyttökäsineet
- 5 ml:n ja/tai 15 ml:n polypropeenista valmistetut napsautuskorkilliset, pyöreäpohjaiset putket
- Näyteputkeline, johon voidaan asettaa 10 ml:n tai 15 ml:n putkia
- 50 ml:n polypropeenista valmistetut karttioputket


## Lisälaitteita ja -materiaaleja PreservCyt-näytteiden valmisteluun

 Katso lisätietoja automaattisesta näytteiden valmistelusta QIASymphony DSP HPV Media -kitillä QIASymphony DSP HPV Media Kit -käyttöohjeista (käsikirjasta) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

 Katso lisätietoja automaattisesta näytteiden valmistelusta QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä QIASymphony DSP AXpH DNA Kit -käsikirjasta (*QIASymphony DSP AxpH DNA Kit Handbook*).

 Katso lisätietoja näytteiden manuaalisesta valmistelusta *digene* HC2 Sample Conversion -kitin käyttöohjeista.

## Lisälaitteita ja -materiaaleja SurePath-näytteiden valmisteluun

 Katso lisätietoja automaattisesta näytteiden valmistelusta QIASymphony DSP HPV Media -kitillä QIASymphony DSP HPV Media Kit -käyttöohjeista (käsikirjasta) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

SurePath-näytteiden manuaaliseen valmisteluun vaaditaan seuraavat lisälaitteet ja -materiaalit

- Swing-bucket-roottorilla varustettu sentrifugi, joka saavuttaa  $800 \pm 15 \times g$  ja johon voidaan sijoittaa 15 ml:n kartiomaisia polypropeenista valmistettuja sentrifugiputkia\*
- *digene* HC2 Sample Conversion -putket\* tai 15 ml:n VWR®- tai Corning®-polypropeeniputket  
**Tärkeää:** QIAGENin toimittamia *digene* HC2 Sample Conversion -putkia on käytettävä MST Vortexer 2:n tai RCS-järjestelmän kanssa.
- 7 ml:n vakiokärkiset siirtopipetit tai vastaavat
- *digene* Specimen Transport Medium

# Varoitukset ja varotoimenpiteet

In vitro -diagnostiikkaan.

Lue kaikki ohjeet huolellisesti ennen kokeen käyttöä.

## Varoitukset

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on vastaavissa käyttöturvallisuustiedotteissa. Ne ovat saatavana PDF-tiedostoina Internet-osoitteessa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Voit hakea, lukea ja tulostaa kaikkien QIAGEN-tarvikesarjojen ja niiden osien käyttöturvallisuustiedotteet.

## Näytteet

### VAROITUS



#### Tartuntavaarallisten aineiden riski

Näytteet saattavat sisältää tartunnanaiheuttajia, ja näytteitä on käsiteltävä asianmukaisesti. Huomioi tartuntavaara kaikkia näytteitä käsitellessä.

Testimenetelmää, joka takaisi luotettavan tiedon siitä, että näyte ei sisällä tartunnanaiheuttajia, ei ole olemassa. Ihmisperäisten näytteiden käsittelyssä suositellaan noudatettavan asianmukaisia maakohtaisia ja paikallisia bioturvallisuutta koskevia käytäntöjä. Noudata bioturvallisuutta koskevia käytäntöjä käsitellessäsi materiaaleja, jotka sisältävät tai joiden epäillään sisältävän tartunnanaiheuttajia.

Noudatettavia varotoimenpiteitä ovat mm.:

- Älä käytä pipettiä suulla.
- Alueilla, joilla käsitellään reagensseja tai näytteitä, ei saa tupakoida, syödä eikä juoda.
- Käytä reagensseja- tai näytteitä käsitellessäsi kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä. Kokeen suorittamisen jälkeen pese kädet huolellisesti.
- Puhdista kaikki näytteistä peräisin olevat roiskeet tuberkulosidisella (esim. 0,5% v/v natriumhypokloriitilla) tai muulla sopivalla desinfiointiaineella (32, 33).
- Dekontaminoi ja hävitä kaikki näytteet, reagenssit ja muut mahdollisesti saastuneet materiaalit kansallisten ja paikallisten säännösten edellyttämällä tavalla.

Denaturoinnin ja inkubaation jälkeen näytteitä ei enää pidetä tartuntavaarallisina (34). Laboratoriohenkilökunnan on kuitenkin noudatettava maakohtaisia ja paikallisia varotoimenpiteitä.

## Natriumatsidi

Jotkut reagenssit sisältävät natriumatsidia. Natriumatsidin on raportoitu muodostavan lyijy- tai kupariatsidia laboratorion viemäristössä. Iskut, kuten vasarointi, voivat johtaa näiden atsidien räjähtämiseen. Lyijy- tai kupariatsidin muodostumisen välttämiseksi huuhtelee viemärit huolellisesti hävitettyäsi natriumatsidia sisältäviä liuoksia. Jos viemäristöön epäillään muodostuneen atsidikertymiä, Yhdysvaltojen työterveys- ja työturvallisuusvirasto OSHA on suosittelut kontaminaation poistamista seuraavalla tavalla:

1. Juoksuta neste viemäristä kumi- tai muoviletkun avulla.
2. Täytä 10 % v/v natriumhydroksidiliuoksella.
3. Anna vaikuttaa 16 tuntia.
4. Huuhtelee huolellisesti vedellä.

## Puskuri N2

### VAROITUS



### Voimakkaasti reagoivien yhdisteiden riski

Älä lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan mihinkään puskuria N2 sisältävään liukseen tai jätteeseen.

Puskuri N2 sisältää guanidiinihydrokloridia, joka valkaisuaineen kanssa yhdistettynä voi muodostaa herkästi reagoivia aineita.

Jos näitä puskureita sisältävää nestettä läikkyi, puhdista se laboratorionkäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä. Jos läikkyneet neste sisältää mahdollisia tartunnanaiheuttajia, puhdista alue ensin laboratorionkäyttöön sopivalla puhdistusaineella ja vedellä sekä sen jälkeen 1-prosenttisellä (tilavuus/tilavuus) natriumhypokloriitilla.

## Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä

Katso Rapid Capture System -järjestelmän käyttöoppaasta (*Rapid Capture System User Manual*) lisävaroitukset ja varotoimenpiteet, jotka on erityisesti huomioitava järjestelmän käytössä suurten näytemäärien tehokkaassa testauksessa.

## Kitin osien turva- ja vaaralausekkeet

Seuraavat vaara- ja turvalausekkeet koskevat *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koekitin osia:

### Wash Buffer Concentrate (Denaturointireagenssi)



Sisältää: Sodium azide. Varoitus! Haitallista nieltynä. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Sisältö/ astia on toimitettava hävitettäväksi hyväksytyyn jätteenkäsittelylaitokseen

### Denaturation Reagent (Denaturointireagenssi)



Sisältää: sodium hydroxide. Vaara! Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Voi syövyttää metalleja. Käytä suojakäsineitä/ suojavaatetusta/ silmiensuojainta/ kasvonsuojainta. Sisältö/ astia on toimitettava hävitettäväksi hyväksytyyn jätteenkäsittelylaitokseen. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE (tai hiuksiin): Riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhdo/ suihkuta iho vedellä. Ota välittömästi yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Varastoi lukitussa tilassa.

### Probe Diluent (Koettimen laimennin)



Sisältää: acetic acid; Polyacrylic acid. Vaara! Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Sisältö/ astia on toimitettava hävitettäväksi hyväksytyyn jätteenkäsittelylaitokseen. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE (tai hiuksiin): Riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhdo/ suihkuta iho vedellä. Ota välittömästi yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Varastoi lukitussa tilassa. Käytä suojakäsineitä/ suojavaatetusta/ silmiensuojainta/ kasvonsuojainta.

### **High-Risk HPV Calibrator (korkean riskin HPV:n kalibraattori)**

Vaara! Aiheuttaa lievää ihon ärsytystä. Jos ihon ärsytystä esiintyy: Käänny lääkärin puoleen..

### **High-Risk HPV Quality Control (korkean riskin HPV:n laatukontrolli)**

Varoitus! Ärsyttää ihoa lievästi. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin

### **Low-Risk HPV Quality Control (pienen riskin HPV:n laatukontrolli)**


Varoitus! Ärsyttää ihoa lievästi. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.

### **Negative Calibrator (negatiivinen kalibraattori)**

Varoitus! Ärsyttää ihoa lievästi. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.

## Varotoimenpiteet

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta suoritettaessa on aina noudatettava seuraavia varotoimenpiteitä:

- Reagensseja ei saa käyttää ulkopakkauksessa olevan  symbolin viereen merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
- Jos testissä ei noudateta määriteltyjä aikavälejä ja lämpötila-alueita, tulokset voivat olla vääriä. Testit, jotka ovat määriteltyjen aikavälien ja lämpötila-alueiden ulkopuolella, ovat kelvottomia ja on toistettava.
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suoritustapaa, analyysin kalibrointia, laatukontrollia ja näytetulosten tulkintaa koskevia ohjeita on noudatettava tarkasti, jotta koetulokset ovat luotettavia.
- On tärkeää, että reagenssia pipetoidaan täsmälleen osoitettu määrä ja että se sekoitetaan hyvin jokaisen reagenssilisäyksen jälkeen. Muuten testitulokset voivat olla virheellisiä. Värimuutosten ilmeneminen odotetulla tavalla on varmistus siitä, että ao. edellytykset on täytetty.



- Pesupuskurikonsentraattia lukuun ottamatta kitin osat on testattu kokonaisuutena. Älä käytä samalla osia muista lähteistä tai eristä. Samalla eränumerolla merkittyjen sarjojen osien yhdistäminen on kuitenkin sallittua, jotta saadaan tarvittava reagenssimäärä useiden kuoppalevyjen testaukseen yhdessä RCS-ajossa.
- Nukleiinihapot ovat hyvin herkkiä ympäristön nukleasien hajoamiselle. Nukleaseja on ihmisen iholla sekä ihmisen käsittelemillä pinnoilla tai materiaaleilla. Puhdista työpinnat ja peitä ne kertakäyttösuojuksella sekä käytä puuterittomia käsineitä kaikissa kokeen vaiheissa.
- Estä sieppauskuoppalevyn ja detekointireagenssin 2 (DR2) kontaminoituminen eksogeenisellä alkalisella fosfataasilla kokeen aikana. Alkalista fosfataasia voivat mahdollisesti sisältää mm. detekointireagenssi 1 (DR1), bakteerit, sylki, hiukset ja ihon rasvat. On erityisen tärkeää peittää sieppauskuoppalevy pesuvaiheen jälkeen ja DR2-inkubaation aikana, sillä eksogeeniset alkaliset fosfataasit voivat reagoida DR2:n kanssa ja tuottaa vääriä positiivisia tuloksia.
- Suojaa DR2 pitkäaikaiselta altistumiselta suoralle valolle. Käytä DR2 välittömästi alikvoitumisen jälkeen ja suojaa suoralta auringonvalolta.
- Esitäytä toistopipetti ennen reagenssin lisäämistä, ja varmista säännöllisesti, ettei siinä ole suuria ilmakuplia. Jos toistopipetin kärjessä on hyvin paljon suuria ilmakuplia, ne voivat johtaa epätarkkaan annosteluun. Ilmakuplat voidaan välttää täyttämällä pipetti, tyhjentämällä neste kokonaan ja täyttämällä uudelleen. Katso tarkat käyttöohjeet pipetin käyttöoppaasta.
- Käytä DR1:n ja DR2:n annosteluun käännteistä pipetointitekniikkaa monikanavaisella pipetillä (katso "Hybridin osoittaminen", sivu 53).- Varmista, että jokainen monikanavaisen pipetin kärki sopii ja täyttyy kunnolla.
- Varmista, että jokainen sieppauskuoppalevyn kuoppa pestään huolellisesti (katso "Pesu", sivu 54). Puutteellinen pesu lisää taustaa ja voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Sieppauskuoppalevyn kuoppiin jäänyt pesupuskuri saattaa heikentää signaalia tai toistettavuutta

# Reagenssin säilytys ja käsittely

## Kitin osat

Säilytä kittiä toimituksen jälkeen 2–8 °C:n lämpötilassa. Pesupuskurikonsentraattia, denaturointireagenssia ja osoitinväriä voidaan tarvittaessa säilyttää 2–30 °C:n lämpötilassa. Kaikki muut reagenssit ovat käyttövalmiita paitsi denaturointireagenssi (DNR), koetinseos ja pesupuskuri.

## Valmistellut reagenssit

Valmisteltu DNR on stabiili 3 kuukautta 2–8 °C:n lämpötilassa.

Valmis pesupuskuri pysyy stabiilina 3 kuukauden ajan säilytettynä 2–30 °C:n lämpötilassa.

Jos testataan QIASymphony DSP HPV Media -kitillä tai QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä käsiteltyjä PreservCyt-näytteitä, avatut denaturoimattomat kalibraattorit ja laatukontrollit ovat stabiileja 3 kuukautta 2–8 °C:n lämpötilassa.

Jos testataan QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä käsiteltyjä näytteitä, valmisteltu denaturointireagenssi 2 (DNR2) on stabiili 8 tuntia 15–30 °C:n lämpötilassa.

# Näytteiden ottaminen ja valmisteleminen

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella testattaviksi tarkoitettujen kohdunkaulan ja emättimen näytteiden ottamiseen ja kuljettamiseen käytetään seuraavia näytteenottolaitteita:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (koostuu kohdunkaulaharjasta ja STM:stä)
- *digene* STM -näytteenkuljetusaineeseen otetut koepalat
- Harjatyypinen näytteenottoväline tai yhdistetty harja/lasta-näytteenottoväline, jotka on asetettu PreservCyt-liuokseen tai SurePath-säilytysnesteeseen

Näytteitä, jotka otetaan muilla näytteenottovälineillä tai joita kuljetetaan muilla kuljetusvälineillä, ei ole validoitu tässä kokeessa käyttöä varten. Kokeen suoritusominaisuudet on määritelty vain mainittujen näytteenottosarjojen kanssa.

*digene* HC2 DNA Collection Device -näytteenotinta ei saa käyttää raskaana oleville naisille. Kohdunkaulanäytteet on otettava ennen etikkahapon tai jodin käyttöä, jos suoritetaan

kolposkopiatutkimus. Katso digene *digene* HC2 DNA Collection Device -näytteenottimen käyttöohjeista lisätietoja muista näytteenotto- ja käsittelytoimenpiteistä.

STM:llä otettuja kohdunkaulan ja emättimen näytteitä ei tarvitse sekoittaa ennen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta. PreservCyt- ja SurePath-näytteet on sekoitettava ennen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta.

## Kohdunkaulan ja emättimen näytteet STM:ssä

**Tärkeää:** Älä ota kohdunkaulan tai emättimen STM-näytettä, jos näytteenottopaikassa on runsaasti voidemaista sienilääkettä, ehkäisygeeliä tai emätinhuuhteluainetta.

STM-näytteitä voidaan pitää huoneenlämmössä enintään kaksi viikkoa, jona aikana niiden toimittaminen koelaboratorioon ei vaadi kylmäkuljetusta. Näytteet tulee lähettää eristetyssä säiliössä joko yliyön- tai kahden päivän toimituksena.

Koelaboratoriossa näytteet on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa, mikäli analyysi tehdään viikon sisällä. Jos analyysi tehdään 1 viikon kuluessa, näyteputkien korkit on peitettävä Parafilm-kalvolla ja näytteitä on säilytettävä –20 °C:n lämpötilassa enintään 3 kuukautta. Otettuasi näytteet pakkasesta testausta varten vaihda korkkien tilalle välittömästi näytteenottoputkien kierrekorkit.

STM:ään on lisätty suoja-ainetta hidastamaan bakteerikasvua ja säilyttämään DNA:n eheys. Sen tarkoituksena ei ole eliöiden tai solujen elinkyvyn säilyttäminen.

## Kohdunkaulan koepalat

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta voidaan testata juuri otettuja kohdunkaulan koepaloja, joiden poikkileikkaus on 2–5 mm. Älä käytä koepaloja, joiden halkaisija on alle 2 mm. Aseta koepalat viipymättä 1,0 ml:aan STM:ää, peitä näyteputkien korkit Parafilm-kalvolla korkin irtoamisen estämiseksi, ja säilytä koepaloja pakastettuina –20 °C:n lämpötilassa. Toimita koepalanäytteet testauslaboratorioon 2–30 °C:n lämpötilassa seuraavaan päivään mennessä.

Säilytä koepaloja testauslaboratoriossa –20 °C:n lämpötilassa niiden käsittelyyn saakka. Otettuasi näytteet pakkasesta testausta varten vaihda korkkien tilalle välittömästi näytteenottoputkien kierrekorkit.

## Kohdunkaulanäytteet PreservCyt-liuoksessa

**Tärkeää:** Älä ota PreservCyt-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettavaa näytteen valmistelua varten, jos näytteenottoaikassa on runsaasti voidemaista sienilääkettä, emättimen liukastusgeeliä tai verta.

**Tärkeää:** Älä ota PreservCyt-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritettavaa näytteen valmistelua varten, jos näytteenottoaikassa on ehkäisygeeliä.

Ota näytteet rutiininomaisesti ja valmistelee ThinPrep® Pap -koeliuskat valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti.

Näytteiden ottamisen jälkeen säilytä PreservCyt-näytteitä enintään 3 kuukautta 2–30 °C:n lämpötilassa ennen näytteen valmistelua *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta varten. PreservCyt-näytteitä ei saa pakastaa.

Näyte voidaan valmistella seuraavilla menetelmillä:

- Automaattinen näytteen valmistelu QIASymphony SP -laitteella ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä  
Tuloksena on magneettisia hiukkasia, STM:ää ja DNR:ää sisältävä näyteuute, jota voidaan käyttää kokeen denaturointivaiheessa.
- Automaattinen näytteen valmistelu QIASymphony SP -laitteella ja QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä  
Tuloksena on DNA-eluuaatti, joka voidaan siirtää kokeen denaturointivaiheeseen.
- Manuaalinen näytteen valmistelu *digene* HC2 Sample Conversion -kitillä. Manuaalisen näytteen valmistelun tuloksena on denaturoitu näyte, joka voidaan siirtää kokeen hybridisaatiovaiheeseen.

Näytemäärää koskevat vaatimukset perustuvat näytteen valmistelumenetelmään seuraavasti:

- Automaattiseen näytteen valmisteluun QIASymphony DSP HPV Media -kitillä vaaditaan 3 ml näytettä.
- Automaattiseen näytteen valmisteluun QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä vaaditaan 4 ml näytettä.
- Manuaaliseen näytteen valmisteluun *digene* HC2 Sample Conversion -kitillä vaaditaan vähintään 4 ml näytettä.

Jos näytteen määrä Papa-kokeen valmistelun jälkeen on vaadittua määrää pienempi, näyte ei sisällä kokeeseen riittävää määrää materiaalia ja seurauksena voi olla väärä negatiivinen tulos *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa.

## Kohdunkaulanäytteet SurePath-säilytysnesteessä

**Tärkeää:** Älä ota SurePath-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettavaa näytteen valmistelua varten, jos näytteenotto paikassa on ehkäisyvaahdot, voidemaista sienilääkettä tai voidemaista tulehduslääkettä.

Kerää näytteet SurePath-säilytysnesteeseen soveltuvien käyttöohjeiden mukaisesti.

SurePath-näytteiden valmistelu voi tapahtua ennen sytologista käsittelyä tai sytologisen käsittelyn päättymisen jälkeen.

Jos teet valmistelun ennen sytologista käsittelyä, käytä näytettä SurePath-näytemateriaalista, jota ei ole käsitelty millään muulla diagnostisella menetelmällä, mukaan lukien BD PrepMate® -järjestelmä ja BD PrepStain® -liuskakäsittelylaite. Näissä käyttöohjeissa näitä näytteitä kutsutaan sekaannusten välttämiseksi "SurePath-näytteiksi".

Jos teet valmistelun sytologisen käsittelyn jälkeen, käytä jäljellä olevasta postgradientista solupelletistä saatua näytettä, kun SurePath-näyte on valmistettu BD PrepMate -järjestelmän ja BD PrepStain -liuskakäsittelylaitteen soveltuvien ohjeiden mukaisesti. Näissä käyttöohjeissa näitä näytteitä kutsutaan sekaannusten välttämiseksi "postgradienteiksi SurePath-solupellettinäytteiksi".

Näyte voidaan valmistella seuraavilla menetelmillä:

- Automaattinen SurePath-näytteiden valmistelu QIASymphony SP -laitteella ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä.  
Tuloksena on denaturoitu näyteute, joka sisältää magneettisia hiukkasia, STM:ää ja DNR:ää ja jota voidaan käyttää kokeen hybridisaatiovaiheessa.
- Automaattinen postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmistelu QIASymphony SP -laitteella ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä  
Tuloksena on denaturoitu näyteute, joka sisältää magneettisia hiukkasia, STM:ää ja DNR:ää ja jota voidaan käyttää kokeen hybridisaatiovaiheessa.
- Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalinen valmistelu  
Manuaalisen näytteen valmistelun tuloksena on denaturoitu näyte, joka voidaan siirtää kokeen hybridisaatiovaiheeseen.

Näyttemäärää koskevat vaatimukset perustuvat näytteen valmistelumenetelmään seuraavasti:

- Automaattiseen näytteen valmisteluun QIASymphony DSP HPV Media -kitillä tarvitaan 950 µl.
- Postgradientin SurePath-solupellettinäytteen manuaaliseen valmisteluun tarvitaan 2,8 ml.

Tarvittavaa määrää pienemmän määrän käyttäminen voi aiheuttaa virheellisen negatiivisen tuloksen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa.

#### SurePath-näytteiden automaattinen valmistelu

Säilytä SurePath-näytteitä näytteenoton jälkeen enintään 4 viikkoa 5–25 °C:n lämpötilassa ennen näytteiden valmistelua QIASymphony SP -laitteella ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä. Käytettyä SurePath-näytettä ei saa olla käsitelty millään muulla diagnostisella menetelmällä, mukaan lukien BD PrepMate ja BD PrepStain -liuskakäsittelylaitteella. Automaattiseen näytteen valmisteluun tarvitaan 950 µl SurePath-näytettä.

#### Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden automaattinen valmistelu

**Tärkeää:** Pipetoi heti SurePath Pap -koeliuskan valmistelun jälkeen 2,0 ml SurePath-säilytysnestettä sentrifugiputkeen, joka sisältää postgradienttia solupellettiä. Näin säilytetään postgradientin solupelletin eheys *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta varten.

Postgradienttia solupellettiä SurePath-säilytysnesteessä saa säilyttää enintään 4 viikkoa 5–25 °C:n lämpötilassa ennen näytteen valmistelua *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta varten. Automaattiseen näytteen valmisteluun tarvitaan 950 µl postgradienttia SurePath-solupellettiä.

#### Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalinen valmistelu

**Tärkeää:** Pipetoi heti SurePath Pap -koeliuskan valmistelun jälkeen 2,0 ml SurePath-säilytysnestettä sentrifugiputkeen, joka sisältää jäljelle jääneen solupelletin. Näin säilytetään postgradientin solupelletin eheys *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta varten.

Postgradienttia solupellettiä SurePath-säilytysnesteessä saa säilyttää enintään 4 viikkoa 2–30 °C:n lämpötilassa ennen näytteen valmistelua *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta varten.

# Toimenpide

## Ennen käyttöä tehtävät toimenpiteet

- Anna Microplate Heater I -laitteen tasaantua kylmäkäynnistyksen jälkeen vähintään 60 minuutin ajan 65 °C:n ( $\pm 2$  °C) lämpötilaan manuaalista testausta varten. Jos lämpenemisaika laiminlyödään, seurauksena saattaa olla hybridisaatiokuoppalevyn sulaminen. Katso lisätietoja Microplate Heater I -käyttöoppaasta (*Microplate Heater I User Manual*).
- Jos denaturointi- ja hybridisaatiovaiheiden aikana käytetään vesihaudetta, varmista, että vesihauteen lämpötila on 65 °C ja että vesihauteessa on riittävästi vettä upottamaan koko näyteputkien sisältämän näytteen määrä.

## Reagenssin valmistelu

- Ota näytteet ja kaikki tarvittavat reagenssit jääkaapista ennen kokeen aloittamista. Anna niiden lämmitä 20–25 °C:n lämpötilaan 15–30 minuutin ajan. Valmistelee PreservCyt- ja SurePath-näytteet ennen aiemmin denaturoitujen näytteiden ja reagenssien tasapainottamista huoneenlämpötilaan.
- Jos käyttövalmiita reagensseja yhdistetään RCS-ajoon, jossa käsitellään kerralla useita levyjä, sekoita kaikki pullot huolellisesti ja yhdistä sitten tarvittava määrä reagenssia puhtaaseen, kertakäyttöiseen polypropeenista valmistettuun kartioputkeen.
- Manuaalisesta testausta varten pesupuskurin ja koetinseoksen reagenssit valmistellaan testauksen kyseisissä vaiheissa. Automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä kaikki reagenssit valmistellaan ennen RCS-ajon käynnistämistä ja asetetaan RCS-tasolle.
- Valmistelee DNR ja DNR2 asianmukaisesti ennen muiden reagenssien valmistelua.
- Hävitä kaikki valmistellut reagenssit (ellei muuta ole mainittu) ja reagenssialikvootit kokeen päätyttyä.
- Katso alla taulukot 1–5: Määritä jokaisesta reagenssista tarvittava määrä kokeiden/kuoppalevyjen lukumäärän ja testausmenetelmän perusteella. RCS-järjestelmässä suoritettavan automaattisen testauksen määrät sisältävät laitteen tarvitseman reagenssin tyhjän tilavuuden.

**Taulukko 1. Tarvittavat määrät valmisteltuja ja käyttövalmiita reagensseja STM-näytteiden ja manuaalisesti valmisteltujen PreservCyt- ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaaliseen testaukseen**

Kokeiden/liuskojen määrä	Koetinseos	Pesupuskuri	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 litraa	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 litraa	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 litraa	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 litraa	12 ml	12 ml

**Taulukko 2. Tarvittavat määrät valmisteltuja ja käyttövalmiita reagensseja STM-näytteiden, manuaalisesti valmisteltujen PreservCyt- ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden sekä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmisteltujen SurePath- ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä**

Kuoppalevyjen määrä	Koetinseos	Pesupuskuri	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 litraa	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 litraa	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 litraa	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 litraa	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 litraa	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 litraa	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 litraa	34 ml	34 ml

**Taulukko 3. Tarvittavat määrät valmisteltuja ja käyttövalmiita reagensseja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä**

Kuoppalevyjen määrä	DNR	Koetinseos	Pesupuskuri	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 litraa	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 litraa	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 litraa	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 litraa	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 litraa	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 litraa	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 litraa	34 ml	34 ml



**Taulukko 4. Tarvittavat määrät valmisteltuja ja käyttövalmiita reagensseja QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden manuaaliseen testaukseen**

Kokeiden/liuskojen määrä	DNR	DNR2	Koetinseos	Pesupuskuri	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 litraa	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 litraa	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 litraa	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 litraa	12 ml	12 ml

**Taulukko 5. Tarvittavat määrät valmisteltuja ja käyttövalmiita reagensseja QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä**

Kuoppalevyjen määrä	DNR	DNR2	Koetinseos	Pesupuskuri	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 litraa	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 litraa	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 litraa	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 litraa	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 litraa	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 litraa	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 litraa	34 ml	34 ml

## Denaturointireagenssi

1-levyisen kitin mukana toimitetaan 50 ml denaturointireagenssia, ja 4-levyisen kitin mukana toimitetaan 2 x 100 ml denaturointireagenssia. Valmista DNR vastaavassa kitissä toimitetun määrän mukaisesti.

### N Huomautuksia:

- Valmisteltu DNR on stabiili 3 kuukautta 2–8 °C:n lämpötilassa.
- Jos väri haalenee, lisää 3 pisaraa osoitinväriä ja sekoita perusteellisesti ennen käyttöä.

### 50 ml:n pullo

1. Lisää 50 ml:n denaturointireagenssipulloon 5 pisaraa ilmaisinväriä.

2. Sekoita perusteellisesti.  
DNR:n värin on oltava yhtenäisen tummanvioletti.
3. Merkitse DNR:ään uusi viimeinen käyttöpäivämäärä.

### 100 ml:n pullo

1. Lisää 100 ml:n denaturointireagensipulloon 10 pisaraa ilmaisinväriä.
2. Sekoita perusteellisesti.  
DNR:n värin on oltava yhtenäisen tummanvioletti.
3. Merkitse DNR:ään uusi viimeinen käyttöpäivämäärä.

### Denaturointireagensi 2

**Huomautus:** DNR2 vaaditaan ainoastaan QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden testaukseen.

1. Merkitse puhtaaseen kertakäyttöiseen polypropeenista valmistettuun kartioputkeen "DNR2".
2. Lisää tarvittava määrä puskuria N2 (katso alla taulukko 6) merkittyyn astiaan.

### Taulukko 6. DNR2:n valmistelu

Tarvittava DNR2:n määrä	Puskurin N2 määrä	Puskurin D2 määrä	Osoitinväri
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 pisaraa
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1–2 pisaraa
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 pisaraa
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1–2 pisaraa
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 pisaraa
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1–2 pisaraa
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 pisaraa
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1–2 pisaraa
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 pisaraa
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1–2 pisaraa

3. Lisää tarvittava määrä puskuria D2 (katso yllä taulukko 6) merkittyyn astiaan.
4. Lisää tarvittava määrä osoitinväriä (katso yllä taulukko 6) merkittyyn astiaan.

**Huomautus:** Käytä digene HC2 High-Risk HPV DNA -koekitin mukana toimitettua osoitinväriä.

5. Vorteksoi vähintään 10 sekuntia.

**Huomautus:** Valmisteltu DNR2 on stabiili 8 tuntia 15–30 °C:n lämpötilassa.

## Koetinseos

- Manuaalista testausta varten valmistelet koetinseos näytteen denaturoinnin inkubaation aikana (asianmukaisesti, katso "Kalibraattorien, laatukontrollien ja STM-näytteiden denaturointi", sivu 45, tai "Kalibraattorien, laatukontrollien ja DNA-eluvaattien denaturointi manuaalista testausta varten", sivu **Error! Bookmark not defined.**).
  - Toimi äärimmäisen varoen, jotta vältetään RNase-kontaminaatio. Käytä koettimen pipetointiin aerosolilta suojattuja kertakäyttöpipettikärkiä.
  - Koettimen laimennin on viskoosista. Varmista, että koetinseoksen valmistelussa muodostuu näkyvä pyörre. Puutteellinen sekoitus voi heikentää signaalia.
  - Jos automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä yhdistellään useita koetinputkia, yhdistä koetin yhteen putkeen ja sekoita pipetoimalla.
1. Jotta vältetään koettimen tarttuminen putken kanteen, vie neste koetinputken pohjaan sentrifugoimalla jokaista putkea lyhyesti.
  2. Sekoita taputtamalla pulloa varovasti.
  3. Tarvittavan koetinseoksen määrän määrittäminen:  
**Suositus:** Valmista ylimääräinen koetinseos korvaamaan määrän, joka saattaa hävitä pipetin kärkiin tai putken seinämiin. Yllä olevissa taulukoissa 1–5 ilmoitettu määrä sisältää suositellun lisämäärän.  
**Manuaalinen testaus:** Määrittele, kuinka suuri määrä tarvitaan 1:25 koettimen laimennukseen koettimen laimentimessa koetinseoksen valmistelemista varten (25 µl/koe). Määrät käyvät ilmi kohdasta Taulukko 1, sivulla **Error! Bookmark not defined.**, ja Taulukko 4, sivu **Error! Bookmark not defined.**.  
**Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä:** Käytä määriä, jotka on määritetty kohdassa Taulukko 2, sivulla 32, Taulukko 3, sivulla **Error! Bookmark not defined.**, tai Taulukko 5, sivulla **Error! Bookmark not defined.**.
  4. Merkitse uuteen kertakäyttösäiliöön "High-Risk HPV -koetinseos".  
Kokeiden määrästä riippuen suositellaan joko 5 ml:n tai 15 ml:n napsautuskorkillista pyöreäpohjaista polypropeenista valmistettua putkea.
  5. Lisää tarvittava määrä koettimen laimenninta (katso alla taulukko 7) merkittyyn putkeen.
  6. Pipetoi tarvittava määrä High-Risk HPV -koetinta koettimen laimentimeen (katso alla taulukko 7) asettamalla pipetin kärki putken sisäseinämää vasten juuri meniskin yläpuolella ja tyhjentämällä sisällön.  
**Tärkeää:** Älä upota kärkeä koettimen laimentimeen.

**Taulukko 7. Koetinseoksen valmistelu**

Tarvittava koetinseoksen määrä	Koettimen laimentimen määrä	High-Risk HPV -koettimen määrä
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla enimmäisnopeudella vähintään 5 sekuntia.

Näkyvän pyörteen on synnyttävä

#### Pesupuskuri

- Manuaalista testausta varten valmistele pesupuskuri hybridien sieppausvaiheen aikana (katso "Hybridinsieppaus", sivu 51).
- Minimoi altistuminen lisäämällä vettä pesupuskurikonsentraattiin valmistelun aikana.
- Jos käytät manuaalista kuoppalevyn pesumenetelmää, valmista pesulaitteessa 3 litraa pesupuskuria.

**Suositus:** Puhdista pesulaite ja putket 3 kuukauden välein 0,5 %:n natriumhypokloriittiliuoksella ja huuhtelee perusteellisesti tislattulla tai deionisoidulla vedellä, jotta vältetään bakteerien ja homeiden sisältämien alkalisten fosfataasien mahdollisesti aiheuttama kontaminaatio.

- Jos käytät Automated Plate Washer -laitetta, valmista pesupuskuri ja säilytä sitä kannellisessa astiassa tai valmista 1 litra pesupuskuria ja laita se Automated Plate Washer -laitteen pesusäiliöön.
- Valmistele automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä tarvittava määrä (asianmukaisesti, katso Taulukko 2, sivu 32, Taulukko 3, sivu **Error! Bookmark not defined.**, tai Taulukko 5, sivu **Error! Bookmark not defined.**) RCS-pesupullossa.

1. Sekoita pesupuskurikonsentraatin kuoppa ja lisää tarvittava pesupuskurikonsentraatin määrä (katso alla taulukko 8) määritettyyn astiaan.

- Lisää tarvittava määrä tislattua tai deionisoitua vettä (katso alla taulukko 8) määritettyyn astiaan.

**Taulukko 8. Pesupuskurin valmistelu**

Tarvittava pesupuskurimäärä	Pesupuskurikonsentraatin määrä	Tislattun tai deionisoidun veden määrä
1 litraa	33.3 ml	966.7 ml
2 litraa	66.6 ml	1933.4 ml
3 litraa	100.0 ml	2900.0 ml
6 litraa	200.0 ml	5800.0 ml

- Aseta säiliön aukkojen ja sekoituskuopan päälle puhdas ja nukkaamaton paperiliina.
- Sulje säiliö kontaminaation tai haihtumisen estämiseksi tai aseta se tarvittavaan laitteeseen.
- Merkitse pesupuskuriin uusi viimeinen käyttöpäivämäärä.

**Huomautus:** Valmis pesupuskuri pysyy stabiilina 3 kuukauden ajan säilytettynä 2–30 °C:n lämpötilassa.

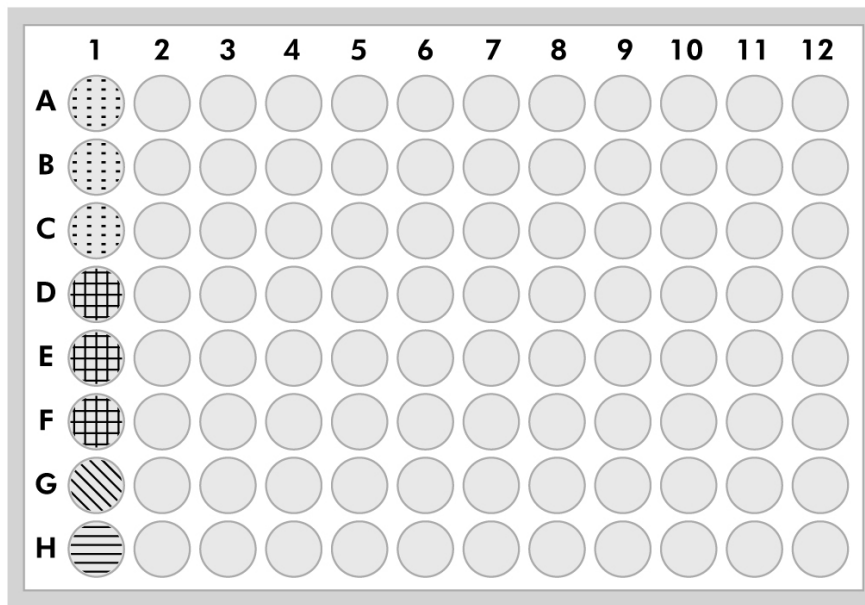
## Levylayoutin luominen

- Luo levylayout *digene*-analyysimääritysohjelmistolla ja HPV:n määrittämiseen tarkoitetuilla *digene*-järjestelmän analyysiprotokollilla.

Katso kyseisen ohjelmiston käyttöoppaasta ohjeet levylayoutin luomisesta asianmukaisin kalibraattorien, laatukontrollien ja näytteiden paikoilla.

### Huomautuksia:

- Kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet käsitellään käyttämällä 8-kuoppaisia levypalstoja.
- kuoppasarakekonfiguraatiossa.
  - Kalibraattorit ja laatukontrollit on testattava kaikissa testeissä seuraavissa kuoppalevyjen paikoissa (katso Kuva 1, sivu 38):
  - Negatiivisen kalibraattorin (NC) replikaatit kuoppalevyn kuopissa A1, B1 ja C1
  - High-Risk HPV -kalibraattorin (HRC) replikaatit kuoppalevyn kuopissa D1, E1 ja F1
  - Low-Risk HPV -laatukontrolli (QC1-LR) kuoppalevyn kuopassa G1
  - High-Risk HPV -laatukontrolli (QC2-HR) kuoppalevyn kuopassa H1



**Kuva 1. Kalibraattorien, laatukontrollien ja näytteiden paikat kuoppalevyllä.**

**Tärkeää:** RCS-järjestelmässä suoritettavassa automaattisessa testauksessa käytä RCS-kohtaisia analyysiprotokollia levylayoutin ja tulosten luomiseen. RCS-kohtaiset analyysiprotokollien määritetyt parametrit poikkeavat manuaalisessa testauksessa käytetyistä analyysiprotokollista (katso "Raja-arvon (cut-off, CO) laskenta", sivu 60).

2. Aseta kalibraattorit, laatukontrollit ja testattavat näytteet näytteenottoputkien telineeseen tai näytetelineeseen siinä järjestyksessä kuin ne testataan.

**Tärkeää:** Automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä on tärkeää, että levylayout vastaa oikeita testattavia näytteitä, jotta raportoidut näytetulokset eivät ole epätarkkoja. Vahvista jokaisen käytetyn näytetelineen ja kannen sarjanumeroiden täsmävän. Merkitse tarvittaessa jokainen näyteteline ja kansi RCS-järjestelmän testausjärjestyksen mukaisesti. Käytä huopakynää ja etikettiä, jotka eivät irtoa 65 °C:n vesihauteessa.


## Näytteen valmistelu

PreservCyt- ja SurePath-näytteet on valmistettava ennen *digene* HC High-Risk HPV DNA -koetta. Näytteen valmistelutyyppistä riippuen valmistellut näytteet ovat valmiit *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen eri vaiheita varten.

Käytettävissä on seuraavat näytteiden valmistelumenetelmät:


- PreservCyt-näytteiden automaattinen valmistelemine n QIASymphony DSP HPV Media -kitillä
- SurePath-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettien automaattinen valmistelemine n QIASymphony DSP HPV Media -kitillä
- PreservCyt-näytteiden automaattinen valmistelemine n QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä
- PreservCyt-näytteiden manuaalinen valmistelemine n
- Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalinen valmistelu

PreservCyt-näytteiden valmistelemine n QIASymphony DSP HPV Media -kitillä


 Katso lisätietoja PreservCyt-näytteiden valmistelusta QIASymphony DSP HPV Media -kitillä QIASymphony DSP HPV Media Kit -käyttöohjeista (käsikirjasta) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

**Tärkeää:** QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelluista PreservCyt-näytteistä muodostuneet näyteuutteet saa testata ainoastaan RCS-järjestelmällä. Testin suorittamista manuaalisesti näyteuutteilla ei ole validoitu.

QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden tuloksena on näyteuutteita hybridisaatiokuoppalevyllä, jonka ensimmäinen sarake on tyhjä. Näyteuutteet sisältävät magneettihiukkasia, STM:ää ja DNR:ää, ja ne ovat valmiita automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä denaturointivaiheessa. Kalibraattorit, laatukontrollit ja näyteuutteet denaturoidaan samanaikaisesti hybridisaatiokuoppalevyllä automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä (katso "QIASymphony SP -laitteella valmisteltujen näytteiden denaturaatio ja hybridisaatio," sivu 43).


 Kun QIASymphony SP -laitteella valmistellut näytteet testataan automaattisesti RCS-järjestelmässä, katso testausohjeet Rapid Capture -järjestelmän käyttöopas — *digene* HC2 DNA -kokeiden suorittaminen QIASymphony SP -laitteella käsiteltyillä näytteillä (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*).

## SurePath-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmisteleminen QIASymphony DSP HPV Media -kitillä


 Katso lisätietoja SurePath-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmistelusta QIASymphony DSP HPV Media -kitillä *QIASymphony DSP HPV Media -kitin käyttöohjeista (käsikirjasta)*.

**Tärkeää:** QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelluista SurePath-näytteistä tuotetut näyteuutteet saa testata ainoastaan RCS-järjestelmällä. Testin suorittamista manuaalisesti näyteuutteilla ei ole validoitu.

SurePath-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritetun valmistelun tuloksena saadaan kalibraattorit, laatukontrollit ja näyteuutteet hybridisaatiokuoppalevyssä, joka on valmis testattavaksi automaattisesti RCS-järjestelmässä testin hybridisaatiovaiheessa.


 Kun QIASymphony SP -laitteella valmistellut näytteet testataan automaattisesti RCS-järjestelmässä, katso testausohjeet Rapid Capture -järjestelmän käyttöopas – *digene HC2 DNA -kokeiden suorittaminen QIASymphony SP -laitteella käsitellyillä näytteillä (Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples)*.

## PreservCyt-näytteiden valmisteleminen QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä

 Lisätietoja PreservCyt-näytteiden valmistelusta, katso QIASymphony DSP AXpH DNA -kitin käsikirja (*QIASymphony DSP AxpH DNA Kit Handbook*).

QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden tuloksena on DNA-eluaatteja hybridisaatiokuoppalevyllä, jonka ensimmäinen sarake on tyhjä. DNA-eluaatit ovat valmiit kokeen denaturointivaihetta varten. Kalibraattorit, laatukontrollit ja DNA-eluaatit denaturoidaan samanaikaisesti hybridisaatiokuoppalevyllä (katso QIASymphony SP -laitteella valmisteltujen näytteiden denaturaatio ja hybridisaatio, sivu 43).

## PreservCyt-näytteiden manuaalinen valmisteleminen

 Katso lisätietoja PreservCyt-näytteiden manuaalisesta valmistelusta *digene HC2 Sample Conversion -kitin käyttöohjeista*.

*digene HC2 Sample Conversion* -kitillä suoritetun PreservCyt-näytteiden manuaalisen valmistelun jälkeen näytteet ovat valmiita kokeen hybridisaatiovaiheeseen. Valmistele kalibraattorit ja



laatukontrollit erikseen (katso "Kalibraattorien, laatukontrollien ja STM-näytteiden denaturointi", sivu 45).

## Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalinen valmistelu

Postgradienttien SurePath-solupellettien manuaalisen valmistelun jälkeen näytteet ovat valmiita kokeen hybridisaatiovaiheeseen. Valmistele kalibraattorit ja laatukontrollit erikseen (katso "Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens", sivu **Error! Bookmark not defined.**).

**Tärkeää:** Jos SurePath-näytteen postgradientti solupellettinäyte vaikuttaa olevan tilavuudeltaan alle 1 ml, postgradientti SurePath-solupelletti ei sovellu testattavaksi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella, sillä SurePath-säilytysnestettä ei lisätty sytologisen käsittelyn jälkeen.

1. Tasapainota postgradientit SurePath-solupelletit huoneenlämpötilaan ja varmista, että havaittu nestemäärä on noin 2,8 ml.
2. Sentrifugoi postgradientteja SurePath-solupellettejä Swing-bucket-roottorilla varustetussa sentrifugissa kiihtyvyydellä  $800 \pm 15 \times g$   $10 \pm 1$  minuutin ajan.
3. Poista putket sentrifugista.
4. Tyhjännä supernatantti välittömästi sentrifugoinnin jälkeen ja poista liika neste taputtelemalla jokainen putki noin 3 kertaa Kimtowels-liinojen tai muiden vastaavien nukkaamattomien paperiliinojen päällä. Tarkista pelletti jokaisessa putkessa.

Tärkeää: Varo, etteivät solupelletit liu'u putken pohjaan taputtelun aikana.

5. Poista putket telineestä.
6. Lisää 200 µl STM:ää jokaiseen pellettiin toistopipetillä tai yksikanavaisella pipetillä.
7. Suspendoi jokainen pelletti uudelleen vorteksoimalla jokaista putkea erikseen 15 sekuntia suurella nopeudella.

Jos pelletin uudelleensuspentointi on hankalaa, vorteksoi vielä 5–30 sekuntia tai kunnes pelletti irtoaa putken pohjasta ja näyttää liukenevan.

**Huomautus:** Putket voivat sekaantua ilman korkkeja.

8. Pipetoi 100 µl DNR:ää jokaiseen SurePath-näytteeseen toistopipetillä tai yksikanavaisella pipetillä.

**Tärkeää:** Varo koskettamasta putken reunoja, sillä se voisi johtaa näytteiden ristikontaminaatioon.

9. Sekoita jokaista putkea erikseen vorteksoimalla suurella nopeudella 5 sekuntia.

**Huomautus:** Putket voivat sekaantua ilman korkkeja.

10. Merkitse *digene* HC2 Sample Conversion -putket tai 15 ml:n kartioputket asianmukaisella näytetunnuksella ja -tyypillä (esim. "SP" SurePath-näytteissä) ja aseta putket putkitelineeseen.

**Huomautus:** Automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä on käytettävä *digene* HC2 Sample Conversion -putkia.

11. Siirrä koko määrä asianmukaiseen 15 ml:n kartioputkeen kertakäyttöisellä 7 ml:n vakiokärkisellä siirtopipetillä tai muulla vastaavalla.

12. Sulje kartioputket korkeilla ja aseta putkitelineeseen.

13. Inkuboi putkia 65 °C:n lämpötilassa ( $\pm 2$  °C) vesihauteessa 90 minuuttia ( $\pm 5$  min).

**Huomautus:** Tämä inkubaatioaika on muille hyväksytyille näytetyypeille vaadittua aikaa pidempi.

Jos testaus suoritetaan samana päivänä, denaturoi kalibraattorit ja laatukontrollit (katso "Kalibraattorien, laatukontrollien ja STM-näytteiden denaturointi", sivu 45).

14. Ota putkiteline vesihauteesta inkubaation jälkeen.

Jos käytät näytetelinettä, älä anna sen jäähtyä ennen telineen kannen poistamista. Jatka testausta viipymättä tai poista telineen kansi ja DuraSeal-putkitiivistekalvo.

**Huomautus:** Jos näyteteline jäähtyy, putket voivat tarttua kiinni telineen kanteen ja ainetta voi läikkyä kantha irrotettaessa.

Valmistellut SurePath-näytteet voidaan:

- testata heti (jatka kohtaan "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" sivulle 48).
- laittaa säilytykseen (katso "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", sivu 47)


## QIAsymphony SP -laitteella valmisteltujen näytteiden denaturaatio ja hybridisaatio

QIAsymphony SP -laitteella suoritettujen näytteiden valmistelun tuloksena on hybridisaatiokuoppalevy, joka sisältää vähintään valmistellut näytteet.

Jos QIAsymphony SP -laitteessa valmisteltiin PreservCyt-näytteitä, hybridisaatiokuoppalevyn ensimmäinen sarake on tyhjä. Kuoppalevyn sisältö on valmis kokeen denaturointivaihetta varten. Kalibraattorit ja laatukontrollit lisätään hybridisaatiokuoppalevylle joko manuaalisesti tai automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä, minkä jälkeen suoritetaan denaturaatiovaihe.

Jos QIAsymphony SP -laitteessa valmisteltiin SurePath-näytteitä tai postgradientteja SurePath-solupellettejä, levy sisältää valmistellut näytteet sekä denaturoidut kalibraattorit ja laatukontrollit, jotka on pipetoitu hybridisaatiokuoppalevyn ensimmäiselle palstalle. Kuoppalevyn sisältö on valmis automaattiseen testaukseen RCS-järjestelmässä kokeen hybridisaatiovaiheessa.

**Tärkeää:** QIAsymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelun tuloksena saadut näyteuutteet voi testata ainoastaan RCS-järjestelmässä. Testin suorittamista manuaalisesti näyteuutteilla ei ole validoitu.

 Kun QIAsymphony SP -laitteella valmistellut näytteet testataan automaattisesti RCS-järjestelmässä, katso testausohjeet Rapid Capture -järjestelmän käyttöopas – *digene HC2 DNA -kokeiden suorittaminen QIAsymphony SP -laitteella käsitellyillä näytteillä (Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAsymphony SP Processed Samples)*.

- Tämä menetelmä on tarkoitettu QIAsymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden manuaaliseen testaukseen. Jos näytteet testataan automaattisesti RCS-järjestelmässä, katso testausohjeet Rapid Capture -järjestelmän käyttöopas – *digene HC2 DNA -kokeiden suorittaminen QIAsymphony SP -laitteella käsitellyillä näytteillä (Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAsymphony SP Processed Samples)*.
- Kalibraattorien ja laatukontrollien denaturointi suoritetaan DNR:llä, kun taas DNA-eluaattien denaturointi suoritetaan DNR2:lla
  1. Vorteksoi kaikkia kalibraattoreita ja laatukontroleja 10 sekuntia enimmäisasetuksella.
  2. Käännä kukin putki, jotta putken korkkiin tarttunut materiaali irtoaa.
  3. Irrota kalibraattori- ja laatukontrolliputkien korkit ja hävitä ne.
  4. Lisää yksikanavaisella pipetillä 50 µl asianmukaista kalibraattoria tai laatukontrollia tyhjän hybridisaatiokuoppalevyn kuopan pohjalle luodun levylayoutin mukaisesti.

Jos lisätestaukseen käytetään kalibraattoria ja laatukontrolleja, sulje putket uusilla kierrettävillä näytteenottoputkien korkeilla, merkitse putkiin uusi viimeinen käyttöpäivämäärä ja säilytä niitä 2–8 °C:n lämpötilassa.

**Huomautus:** Avatut denaturoimattomat kalibraattorit ja laatukontrollit ovat stabiileja 3 kuukautta 2–8 °C:n lämpötilassa.

5. Vorteksoi valmisteltu DNR ja DNR2 perusteellisesti ja alikvoi asianmukaisesti merkittyyn kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön.

**Tärkeää:** Varmista, että eluaattikuoppalevyn oikeaan sarakkeeseen lisätään oikeaa reagenssia.

6. Lisää 25 µl DNR:ää 8-kanavaisella pipetillä kalibraattoreita ja laatukontrolleja sisältävän hybridisaatiokuoppalevyn ensimmäiseen sarakkeeseen.
7. Lisää 25 µl DNR2:ta 8-kanavaisella pipetillä jokaiseen DNA-eluaattia sisältävään hybridisaatiokuoppalevyn kuoppaan.
8. Sulje hybridisaatiokuoppalevy kuoppalevyn kannella ja ravista 30 sekuntia Rotary Shaker I -laitteessa 1100 (± 100) rpm:llä.
9. Aseta kuoppalevy Microplate Heater I -laitteeseen, jonka lämpötila on tasaantunut  $65 \pm 2$  °C:n lämpötilaan. Varo läikkymistä. Inkuboi hybridisaatiokuoppalevyä  $45 \pm 5$  minuuttia. Valmista koetinseos tämän inkubaation aikana (katso "Koetinseos", sivu 35).
10. Poista hybridisaatiokuoppalevy Microplate Heater I -laitteesta.  
Denaturoidut kalibraattorit, laatukontrollit ja DNA-eluaatit voidaan:
  - laittaa säilytykseen (katso "DNA-eluaattien valinnainen pysähtymiskohta", sivu 44).
  - testata heti (jatka kohdasta "DNA-eluaattien hybridisaatio", sivu **Error! Bookmark not defined.**)

## DNA-eluaattien valinnainen pysähtymiskohta

Denaturoituja, kuoppalevyn kannella peitettyjä DNA-eluaatteja, kalibraattoreita ja laatukontrolleja voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa 2 viikkoa.

## Hybridization of DNA eluates

1. Jos denaturoituja kalibraattoreita, laatukontrolleja ja DNA-eluaatteja sisältävää hybridisaatiokuoppalevyä on säilytetty, poista kuoppalevyn kansi ja anna hybridisaatiokuoppalevyn tasaantua 20–25 °C:n lämpötilaan.
2. Vorteksoi koetinseos perusteellisesti ja alikvoi kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön.

3. Pipetoi huolellisesti 25 µl koetinseosta jokaiseen hybridisaatiokuoppalevyn kuoppaan 8-kanavaisella pipetillä. Käytä uutta kärkeä jokaisella koetinseoksen lisäykerralla. Varo nesteen läikkymistä sekä hybridisaatiokuoppalevyn kuoppien reunojen koskettamista.
4. Sulje hybridisaatiokuoppalevy kuoppalevyn kannella ja ravista 3 minuuttia ( $\pm 2$  min) Rotary Shaker I -laitteessa 1100 rpm:llä ( $\pm 100$  rpm). Ravistamisen jälkeen kalibraattorien, laatukontrollien ja DNA-eluaattien pitäisi muuttua keltaisiksi. Violetteina pysyvät näytteet eivät ehkä ole saaneet riittävästi koetinseosta. Lisää vielä 25 µl koetinseosta violeteiksi jääneisiin näytteisiin ja ravista uudelleen. Jos näyte on edelleen violetti, testaa näyte uudelleen.
5. Aseta kuoppalevy Microplate Heater I -laitteeseen, jonka lämpötila on tasaantunut  $65 \pm 2$  °C:n lämpötilaan. Varo läikkymistä. Inkuboi hybridisaatiokuoppalevyä  $60 \pm 5$  minuuttia.
6. Jatka testausta kohdasta "Hybridinsieppaus", sivu 51.

## STM-näytteiden sekä manuaalisesti valmistettujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden denaturointi ja hybridisaatio

- Manuaalisesti valmistettujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden testauksessa näytteitä ei tarvitse denaturoida. Testauksessa tarvittavat kalibraattorit ja laatukontrollit on kuitenkin denaturoitava alla olevien ohjeiden mukaisesti.
- Jotkut STM-näytteet voivat sisältää verta tai muuta biologista materiaalia, jotka voivat peittää värimuutokset DNR:n lisäämisen jälkeen. Oikeaa värimuutosta ei välttämättä huomata tässä vaiheessa näytteistä, jotka ovat tummanvärisiä ennen DNR:n lisäämistä. Näissä tapauksissa oikean värimuutoksen näkymättömyys ei vaikuta koetuloksiin. Asianmukainen sekoittuminen voidaan varmistaa tarkkailemalla kalibraattorien ja laatukontrollien värimuutosta.

### Kalibraattorien, laatukontrollien ja STM-näytteiden denaturointi

- Älä missään vaiheessa poista näytteenottolaitetta näyteputkesta.
- On erittäin tärkeää, että kaikki näytemateriaali on kosketuksessa DNR:n kanssa, sillä muuten tulokset voivat olla väärän positiivisia. Sekoittaminen DNR:n lisäämisen jälkeen on tärkeä vaihe.
- MST Vortexer 2 -menetelmällä denaturoiduille STM-näytteille on käytettävä "Hybridisaatio kuoppalevyllä ja Microplate Heater I -laitteella" -menetelmää, joka kuvataan sivulla **Error! Bookmark not defined.** "Hybridisaatio mikroputkilla ja vesihauteella" -menetelmää (sivu **Error! Bookmark not defined.**) ei ole validoitu MST Vortexer 2 -laitteella denaturoiduille STM-näytteille.

1. Poista ja hävitä putkien korkit.

**Tärkeää:** STM-näytteistä poistetut korkit voivat olla tartuntavaarallisia (lisätietoja, katso "Varoitukset ja varotoimenpiteet", sivu 21).

Pipetoi määrätty DNR-määrä (katso alla taulukko 9) putkiin toistopipetillä tai säädettävällä pipetillä.

2. Varo koskettamasta putkien reunoja, sillä se voisi johtaa näytteiden ristikontaminaatioon.

**Tärkeää:** 1-levyinen kitti ja 4-levyinen kitti sisältävät eri määrän High-Risk HPV -kalibraattoria. Varmista, että lisäät oikean määrän DNR:ää.

**Huomautus:** Lisäty DNR-määrä on puolet putken sisältämästä nesteestä.

### Taulukko 9. DNR:n lisääminen

Kalibraattori, laatu- tai STM-näyte	Tarvittava DNR:n määrä
Negatiivinen kalibraattori, 2 ml	1000 µl
Korkean riskin HPV:n kalibraattori, 1 ml	500 µl
Korkean riskin HPV:n kalibraattori, 2 ml	1000 µl
Pienen riskin HPV:n tai korkean riskin HPV:n laatu- tai STM-näyte, 1 ml	500 µl
STM-näyte, 1 ml	500 µl

3. Sekoita putket joko MST Vortexer 2 -menetelmällä tai manuaalisesti vorteksoimalla jokaista putkea erikseen.

#### MST Vortexer 2 -menetelmä

- a. Peitä putket DuraSeal-putkitiivistekalvolla vetämällä kalvoa putkien päälle näytetelineessä.
- b. Aseta telineen kansi kalvolla peitettyjen putkien päälle ja lukitse kansi paikalleen 2 sivupidikkeellä. Leikkaa kalvo leikkurilla.
- c. Käänä punavartinen vipu vaakatasoon yläasentoon.
- d. Aseta näyteteline tukevasti MST Vortexer 2 -laitteen ohjaimiin ja niin, että telineen suurin lovitettu kulma on oikeassa etukulmassa. Lukitse näyteteline paikalleen kääntämällä punavartinen vipu pystyasentoon ala-asentoon.
- e. Varmista, että nopeusasetus on 100 (enimmäisnopeus). Kytke MST Vortexer 2 sitten päälle.
- f. Vorteksoi putkia 10 sekuntia.
- g. Kytke MST Vortexer 2 -laitteen virta pois päältä.
- h. Poista näyteteline MST Vortexer 2 -laitteesta kääntämällä punavartinen vipu yläasentoon.

#### Manuaalinen yksilöllinen putkien vorteksointimenetelmä

- a. Laita putkiin uudet kierrettävät näytteenottoputkien korkit.
- b. Sekoita jokaista putkea erikseen vorteksoimalla suurella nopeudella 5 sekuntia.  
**Tärkeää:** Sekoituksen aikana putkessa pitää näkyä nesteen pyörre, joka huuhtelee putken koko sisäpinnan.
- c. Käännä kaikki putket kerran, jotta neste huuhtelee putken, korkin ja kehän sisäpinnat.
- d. Aseta putki takaisin telineeseen.

Putken sisältämän nesteen on muututtava violetiksi

4. Inkuboi putkia telineessä 65 °C:n ( $\pm 2$  °C) vesihauteessa 45 minuuttia ( $\pm 5$  min).

Valmista manuaaliseen testaukseen tarvittava koetinseos tämän inkubaation aikana (katso "Koetinseos", sivu 35).

5. Ota putket vesihauteesta inkubaation jälkeen.

Jos käytät näytetelinettä, älä anna sen jäähtyä ennen telineen kannen poistamista. Jatka testausta viipymättä tai poista telineen kansi ja DuraSeal-putkitiivistekalvo.

**Huomautus:** Jos näyteteline jäähtyy, putket voivat tarttua kiinni telineen kanteen ja ainetta voi läikkyä kantha irrotettaessa.

Denaturoidut kalibraattorit, laatukontrollit ja STM-näytteet voidaan

- laittaa säilytykseen (katso "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", sivu 47)
- testata heti (jatka kohtaan "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" sivulle 48).

Valmisteltujen STM-näytteiden sekä manuaalisesti valmisteltujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valinnainen pysähtymiskohta


**Tärkeää:** Älä säilytä tai kuljeta denaturoituja näytteitä kuivajäissä.

Kaikkia valmisteltuja näytteitä, kalibraattoreita ja laatukontrolleja voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa seuraavaan päivään tai –20 °C:ssa enintään 3 kuukautta. Enintään kolme pakastus-/sulatusjaksoa on sallittu siten, että näytteet ovat enintään 2 tuntia huoneenlämpötilassa kunkin sulatusjakson aikana.

Kun näytteitä säilytetään seuraavaan päivään näytetelineessä 2–8 °C:ssa, peitä näytteet DuraSeal-putkitiivistekalvolla ja aseta telineen kansi paikalleen.

Jos näytteitä säilytetään näytetelineessä –20 °C:ssa, poista telineen kansi ja DuraSeal-putkitiivistekalvo ja aseta putkiin asianmukaiset korkit.

Valmisteltujen STM-näytteiden sekä manuaalisesti valmisteltujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden hybridisaatio

 Kun teet STM-näytteiden tai manuaalisesti valmisteltujen PreservCyt-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden automaattista testausta RCS-järjestelmässä, katso lisätietoja *Rapid Capture -järjestelmän käyttöoppaasta*.

Jos denaturoituja kalibraattoreita, laatukontrolleja tai näytteitä on säilytetty, anna niiden tasapainottua 20–25 °C:n lämpötilaan. Jos niitä on säilytetty näytetelineessä, poista ja hävitä putkien korkit.

- STM-näytteille ja manuaalisesti valmistetuille PreservCyt-näytteille ja postgradieniteille SurePath-solupellettinäytteille voidaan käyttää kahta hybridisaatiomenetelmää: "Hybridisaatio kuoppalevyllä ja Microplate Heater I -laitteella" ja "Hybridisaatio mikroputkilla ja vesihauteella".
- MST Vortexer 2 -menetelmällä denaturoiduille STM-näytteille on käytettävä "Hybridisaatio kuoppalevyllä ja Microplate Heater I -laitteella" -menetelmää, joka kuvataan sivulla **Error! Bookmark not defined.** "Hybridisaatio mikroputkilla ja vesihauteella" -menetelmää (sivu **Error! Bookmark not defined.**) ei ole validoitu MST Vortexer 2 -laitteella denaturoiduille STM-näytteille.
- Koetinseos on viskoosista. Varmista, että koetinseos sekoitetaan perusteellisesti ja että koko tarvittava määrä annostellaan jokaiseen hybridisaatiokuoppalevyn kuoppaan tai hybridisaatiomikroputkeen.
- Siirtäessäsi näytteen hybridisaatiokuoppalevyyn tai hybridisaatiomikroputkeen älä koske hybridisaatiokuoppalevyn tai hybridisaatiomikroputkien reunoihin, sillä jos näytteiden siirrossa ei toimita huolellisesti, tulokset voivat olla väärän positiivisia. Vältä ilmakuplien muodostumista. Käytä jokaiseen näytteen siirtoon puhdasta ja erikoispitkää pipettiä ristikontaminaation välttämiseksi.

## Hybridisaatio kuoppalevyllä ja Microplate Heater I -laitteella

1. Ota esille hybridisaatiokuoppalevy ja merkitse se.
2. Vorteksoi jollakin seuraavista menetelmistä:

### Kalibraattorit, laatukontrollit tai STM-näytteet MST Vortexer 2 -laitteessa

- a. Peitä putket DuraSeal-putkitiivistekalvolla ja kiinnitä näytetelineen kansi paikalleen.
- b. Vorteksoi näytetelinettä vähintään 5 sekuntia enimmäisnopeusasetuksella.
- c. Aseta näyteteline heti pöytätasolle ja vapauta irrottimet. Nosta telineen kantta noin 1 cm ja siirrä sitä varovasti vasemmalle ja oikealle, jotta DuraSeal-putkitiivistekalvoon



mahdollisesti kiinnittyneet putket irtoavat. Poista telineen kansi nostamalla sitä suoraan ulospäin, kunnes se on irti näytetelineestä.

- d. Poista DuraSeal-putkikiivistekalvo varovasti telineen kannesta ja hävitä.

#### PreservCyt-näytteet tai postgradientit SurePath-solupellettinäytteet MST Vortexer 2 -laitteella

- a. Peitä putket DuraSeal-putkikiivistekalvolla ja kiinnitä näytetelineen kansi paikalleen.
- b. Vorteksoi sekoitustelineitä vähintään 10 sekuntia enimmäisnopeusasetuksella.
- c. Aseta näyteteline heti pöytätasolle ja vapauta irrottimeet. Nosta telineen kantta noin 1 cm ja siirrä sitä varovasti vasemmalle ja oikealle, jotta DuraSeal-putkikiivistekalvoon mahdollisesti kiinnittyneet putket irtoavat. Poista telineen kansi nostamalla sitä suoraan ulospäin, kunnes se on irti näytetelineestä.
- d. Poista DuraSeal-putkikiivistekalvo varovasti telineen kannesta ja hävitä

#### Kaikki näytetyypit vortexer-laitteessa

- a. Vorteksoi jokaista putkea erikseen vähintään 5 sekuntia.
3. Siirrä EXPAND-4-pipetillä tai yksikanavaisella pipetillä ja erikoispitkillä pipetin kärjillä 75 µl jokaista kalibraattoria, laatukontrollia tai näytettä tyhjän hybridisaatiokuoppalevyn kuopan pohjalle luodun levylayoutin mukaisesti.

Jos näytteitä on tarkoitus säilyttää, sulje denaturoidut kalibraattorit, laatukontrollit ja STM-näytteet uusilla kierrettävillä näytteenottoputkien korkeilla ja aseta kunkin näytteen alkuperäinen korkki PreservCyt-näytteisiin ja postgradientteihin SurePath-solupellettinäytteisiin.

**Huomautus:** Säilytä näytteitä kohdassa "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" sivulla 47 mainittujen rajojen mukaisesti.

4. Siirrettyäsi viimeisen näytteen sulje hybridisaatiokuoppalevy kuoppalevyn kannella ja inkuboi 10 minuuttia 20–25 °C:n lämpötilassa.
5. Vorteksoi koetinseos perusteellisesti ja alikvoi kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön.
6. Pipetoi huolellisesti 25 µl koetinseosta jokaiseen hybridisaatiokuoppalevyn kuoppaan 8-kanavaisella pipetillä. Käytä uutta kärkeä jokaisella koetinseoksen lisäskerralla. Varo nesteen läikkymistä sekä hybridisaatiokuoppalevyn kuoppien reunojen koskettamista.
7. Sulje hybridisaatiokuoppalevy kuoppalevyn kannella ja ravista 3 minuuttia (± 2 min) Rotary Shaker I-laitteessa 1100 rpm:llä (± 100 rpm)..

Ravistamisen jälkeen kalibraattorien, laatukontrollien, STM-näytteiden ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden pitäisi muuttua keltaisiksi ja PreservCyt-näytteiden vaaleanpunaisiksi.

Violetteina pysyvät näytteet eivät ehkä ole saaneet riittävästi koetinseosta. Lisää vielä 25 µl koetinseosta violeteiksi jääneisiin näytteisiin ja ravista uudelleen. Jos näyte on edelleen violetti, testaa näyte uudelleen.

8. Aseta kuoppalevy Microplate Heater I -laitteeseen, jonka lämpötila on tasaantunut  $65 \pm 2$  °C:n lämpötilaan. Varo läikkymistä. Inkuboi hybridisaatiokuoppalevyä  $60 \pm 5$  minuuttia.
9. Jatka testausta kohdasta "Hybridinsieppaus", sivu 51.

### Hybridisaatio mikroputkilla ja vesihauteella

1. Merkitse tarvittava määrä puhtaita hybridisaatiomikroputkia ja aseta ne mikroputkitelineeseen.
2. Vorteksoi jokaista kalibraattoria, laatukontrollia ja näyteputkea erikseen vähintään 5 sekuntia ennen näytteen poistamista.
3. Siirrä yksikanavaisella pipetillä ja erikoispitkillä pipetin kärjillä 75 µl jokaista kalibraattoria, laatukontrollia tai näytettä tyhjän hybridisaatiomikroputken pohjalle luodun levylayoutin mukaisesti.

Jos näytteitä on tarkoitus säilyttää, sulje denaturoidut kalibraattorit, laatukontrollit ja STM-näytteet uusilla kierrettävillä näytteenottoputkien korkeilla ja aseta kunkin näytteen alkuperäinen korkki PreservCyt- ja SurePath-näytteisiin.

**Huomautus:** Säilytä näytteitä kohdassa "Valmisteltujen STM-näytteiden sekä manuaalisesti valmisteltujen PreservCyt- ja SurePath-näytteiden valinnainen pysähtymiskohta", sivu 56, mainittujen rajojen mukaisesti.

4. Siirrettyäsi viimeisen näytteen inkuboi hybridisaatiomikroputkia 10 minuuttia 20–25 °C:n lämpötilassa.
5. Vorteksoi koetinseos perusteellisesti ja alikvoi kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön.
6. Pipetoi huolellisesti 25 µl koetinseosta jokaiseen hybridisaatiomikroputkeen 8-kanavaisella pipetillä. Käytä uutta kärkeä jokaiselle riville.

Varo nesteen läikkymistä sekä hybridisaatiomikroputkien reunojen koskettamista.

Varmista telineen alapuolelta, että kaikissa hybridisaatiomikroputkissa on riittävä määrä koetinseosta.

7. Peitä hybridisaatiomikroputket levytiivisteellä. Aseta telineen kansi telineen päälle. Ravista mikroputkitelinettä 3 ( $\pm 2$ ) minuuttia Rotary Shaker I -laitteessa 1100 ( $\pm 100$ ) rpm:llä.

Ravistamisen jälkeen kalibraattorien, laatukontrollien, STM-näytteiden ja SurePath-näytteiden pitäisi muuttua keltaisiksi ja PreservCyt-näytteiden vaaleanpunaisiksi.

Violetteina pysyvät näytteet eivät ehkä ole saaneet riittävästi koetinseosta. Lisää vielä 25 µl koetinseosta violeteiksi jääneisiin näytteisiin ja ravista uudelleen. Jos näyte on edelleen violetti, testaa näyte uudelleen.

8. Inkuboi putkia telineessä 60 minuuttia ( $\pm 5$  minuuttia) vesihauteessa

65 °C:n lämpötilassa ( $\pm 2$  °C).

Varmista, että vesihauteessa on riittävästi vettä peittämään koko hybridisaatiomikroputkien sisältämän määrän.

**Huomautus:** Mikroputkiteline kelluu vesihauteessa.

9. Jatka testausta kohdasta "Hybridinsieppaus", sivu 61.

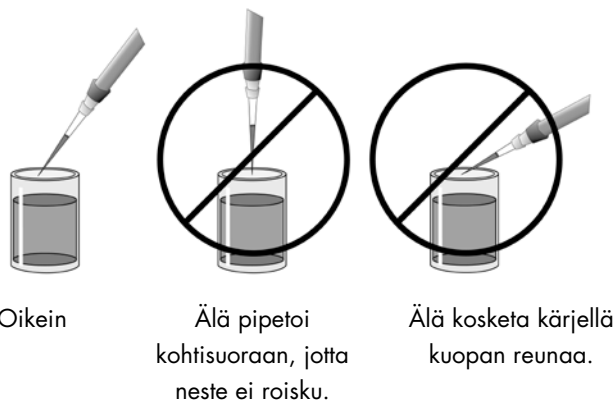
## Hybridinsieppaus

1. Poista sieppauskuoppalevykehikosta kaikki ylimääräiset kaivot.
2. Palauta käyttämättömät kuoppalevykaivot niiden alkuperäiseen pussiin ja sulje se.
3. Merkitse sarakkeet numeroimalla ja varusta kuoppalevy asianmukaisella tunnisteella.  
Näytteet lisätään sieppauskuoppalevyn kuoppiin luodun levylayoutin mukaisesti.
4. Poista varovasti hybridisaatiokuoppalevy Microplate Heater I -laitteesta tai mikroputkiteline vesihauteesta.

Poista kuoppalevyn kansi viipymättä ja aseta se puhtaalle pinnalle tai poista telineen kansi ja vedä levytiivistettä hitaasti ylöspäin mikroputkitelineen yli.

5. Siirrä 8-kanavaisella pipetillä hybridisaatiokuoppalevyn kuoppien tai hybridisaatiomikroputkien koko sisältö (noin 100  $\mu$ l) vastaavien sieppauskuoppalevyn kuoppien pohjalle.

Käytä jokaisessa siirrossa uusia pipetin kärkiä, ja anna jokaisen pipetin kärjen tyhjentyä kokonaan, jotta koko näyte siirretään varmasti. Tarvittaessa pipettiä voidaan tukea pitämällä pipetin kärjen keskiosaa sieppauskuoppalevyn kuoppien yläreunaa vasten (katso Kuva 2, alla).



**Kuva 2. Oikea pipetointi.**

6. Sulje sieppauskuoppalevy kuoppalevyn kannella tai uudella levytiivisteellä ja ravista 60 ( $\pm$  5) minuuttia Rotary Shaker I -laitteessa 1100 ( $\pm$  100) rpm:llä 20–25 °C:n lämpötilassa.  
Valmista pesupuskuri tämän inkubaation aikana (katso "Pesupuskuri", sivu 36).
7. Kun inkubaatio on päättynyt, ota sieppauskuoppalevy Rotary Shaker I -laitteesta ja poista kuoppalevyn kansi tai levytiivistin varovasti.
8. Poista neste sieppauskuoppalevyn kuopista kaatamalla altaaseen; käännä sieppauskuoppalevy kokonaan ylösalaisin altaan yläpuolella ja ravistele kunnolla alaspäin.  
**Tärkeää:** Älä käännä kuoppalevyä takaisin ylöspäin.  
Estä nesteen roiskuminen kaatamalla lähellä altaan pohjaa.
9. Kuivaa taputtelemalla lujasti 2–3 kertaa puhtaan Kimtowels-liinan tai vastaavan nukkaamattoman paperiliinan päällä.  
Varmista, että sieppauskuoppalevyn kuopissa ei ole nestettä ja sieppauskuoppalevyn päällysosa on kuiva.
10. Jatka testausta kohdasta "Hybridin osoittaminen", sivu 53.

## Hybridin osoittaminen

- Lisää reagenssia koko sieppauskuoppalevyille vasemmalta oikealle 8-kanavaisella pipetillä. Poista liika reagenssi kärjistä pyyhkimällä ne kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön ennen reagenssin annostelua kuoppalevyille.
  - 8-kanavaisen pipetin sijaan voidaan käyttää toistopipettiä. Alikvoi DR1 polypropyleeniputkeen, joka on riittävän suuri koko määrälle.
  - Tehokkaan ja yhtenäisen reagenssiannostelun aikaansaamiseksi suositellaan käytettäväksi käänteispipetointimenetelmää. Toimenpide kuvataan jäljempänä.
  - Tarvittaessa pipettiä voidaan tukea pitämällä pipetin kärjen keskiosaa sieppauskuoppalevyn kuoppien yläreunaa vasten. Varo koskettamasta sieppauskuoppalevyn kuoppien seinämiin näytteiden ristikontaminaation välttämiseksi (katso Kuva 2, sivu **Error! Bookmark not defined.**).
1. Sekoita DR1 perusteellisesti ja siirrä tarvittava määrä huolellisesti (tarpeen mukaan, katso Taulukko 1, sivu **Error! Bookmark not defined.**, tai Taulukko 4, sivu **Error! Bookmark not defined.**) puhtaaseen, kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön.
  2. Pipetoi huolellisesti 75 µl DR1:tä jokaiseen sieppauskuoppalevyn kuoppaan käänteistä pipetointitekniikkaa käyttäen seuraavalla tavalla:
    - a. Kiinnitä kärjet 8-kanavaisen pipettiin. Varmista, että kärjet ovat tiukasti paikoillaan.
    - b. Paina pipetin mäntää ensimmäisen vasteen yli toiseen vasteeseen.
    - c. Upota kärjet reagenssiin.
    - d. Vapauta mäntä hitaasti ja anna kärkien täytyä reagenssilla.
    - e. Annostele reagenssi kuoppalevyn kuoppiin painamalla männän ensimmäiseen vasteeseen. Älä vapauta mäntää ennen kuin pipetin kärjet on upotettu reagenssiin.
    - f. Täytä kärjet uudelleen ja toista toimenpide, kunnes kaikki kuoppalevyn kuopat ovat täynnä..

Varmista, että kaikki sieppauskuoppalevyn kuopat ovat täynnä, tarkkailemalla vaaleanpunaisen värin voimakkuutta. Vaaleanpunaisen värin pitäisi olla yhtä voimakasta kaikissa sieppauskuoppalevyn kuopissa
  3. Sulje sieppauskuoppalevy kuoppalevyn kannella, puhtaalla Parafilm-kalvolla tai muulla vastaavalla ja inkuboi 30–45 minuuttia 20–25 °C:n lämpötilassa.
  4. Jatka testausta kohdasta "Pesu", sivu 54.

## Pesu

Pese sieppauskuoppalevy jollakin alla kuvatuista menetelmistä.

### Levyn pesu levykonepesurilla

Pidä Automated Plate Washer aina päälle kytkettynä. Tarkista, että huuhteluallas on täysi ja jätesäiliö on tyhjä. Automated Plate Washer huuhtelee järjestelmän säännöllisesti puhdistusta varten. Katso lisätietoja Automated Plate Washer –käyttöoppaasta (*Automated Plate Washer User Manual*).

- Varmista, että pesusäiliöön on täytetty pesupuskuria vähintään 1 litran merkkiin saakka. Jos näin ei ole, valmista pesupuskuri (katso "Pesupuskuri", sivu 36).
  - Varmista, että huuhtelusäiliössä on deionisoitua tai tislattua vettä.
  - Varmista, että jätesäiliö on tyhjä ja kansi on kunnolla kiinni.
  - Automated Plate Washer esikäsittelee levyt automaattisesti ennen pesua ja huuhtelee ne aina pesun jälkeen.
  - Jos käytössä on vain osittainen sieppauskuoppalevyn liuska, aseta ennen pesua tyhjät kuoppalevyn kuopat sieppauskuoppalevyyn niin, että koko sarake on täynnä.
1. Poista kuoppalevyn kansi ja aseta sieppauskuoppalevy Automated Plate Washer -laitteen pohjaosaan.
  2. Varmista, että Automated Plate Washer -laitteen virta on kytketty ja että näytössä lukee **Digene Wash Ready** (Digene-pesu valmis) tai **P1**.
  3. Valitse pestävien liuskojen määrä painamalla **Rows** (Rivit) -näppäintä ja säätämällä määrää painikkeilla + ja –.
  4. Painamalla **Rows**-näppäintä palaat **Digene Wash Ready**- tai **P1**-näyttöön.
  5. Aloita painamalla **Start/Stop** (Käynnistys/sammutus) -painiketta.  
Automated Plate Washer suorittaa kuusi täyttö- ja aspirointijaksoa, joihin kuluu noin 10 minuuttia. Koska ohjelmassa tapahtuu lyhyt tauko, varo poistamasta kuoppalevyä liian aikaisin.  
Kun Automated Plate Washer on päättänyt pesun, näyttöön tulee teksti "**Digene Wash Ready**" tai "**P1**".
  6. Kun pesuohjelma on valmis, ota sieppauskuoppalevy levykonepesurin pohjaosasta.  
Kuoppalevyn tulee näyttää valkoiselta eikä kuoppalevyn kaivoissa saa olla vaaleanpunaisia nestejäämiä.
  7. Jatka testausta kohdasta "Signaalin monistuminen", sivu 56

## Manuaalinen pesumenetelmä

1. Poista DR1 sieppauskuoppalevyn kuopista asettamalla puhdas Kimtowels-liina tai vastaava nukkaamaton paperiliina sieppauskuoppalevyn päälle.
2. Varmista, että paperiliinat peittävät koko sieppauskuoppalevyn alan ja käännä levy varovasti ylösalaisin.
3. Anna sieppauskuoppalevyn kuivua 1–2 minuuttia.
4. Taputtele kuivaksi puhtaan Kimtowels-liinan tai vastaavan nukkaamattoman paperiliinan päällä.  
Hävitä käytetyt paperiliinat huolellisesti, jotta alkalinen fosfataasi ei aiheuta kontaminaatiota.
5. Pese sieppauskuoppalevy käsin pesulaitteella 6 kertaa.  
Huuhtelee sieppauskuoppalevyt runsaalla pesupuskurilla. Näin poistetaan DR1 sieppauskuoppalevyn kuoppien yläosista. Pesu aloitetaan sieppauskuoppalevyn kuopasta A1, ja sitä jatketaan kieputtelemalla oikealle ja alaspäin. Kun kaikki sieppauskuoppalevyn kuopat ovat täynnä, tyhjennä neste pesualtaaseen voimakkaalla alaspäinliikkeellä. Toinen pesu aloitetaan sieppauskuoppalevyn kuopasta H12, ja sitä jatketaan kieputtelemalla vasemmalle ja ylöspäin. Tämä 2 pesukerrasta koostuva pesusekvenssi toistetaan vielä 2 kertaa niin, että sieppauskuoppalevy pestään yhteensä 6 kertaa.
6. Pesun jälkeen anna sieppauskuoppalevyn kuivua ylösalaisin puhtaan Kimtowels-liinan tai vastaavan nukkaamattoman paperiliinan päällä taputtelemalla sitä voimakkaasti 3–4 kertaa. Vaihda paperiliina ja taputtele uudelleen.
7. Jätä ylösalaisin oleva sieppauskuoppalevy kuivumaan 5 minuutiksi. Taputtele sieppauskuoppalevy kuivaksi vielä kerran.  
Sieppauskuoppalevyn kuoppien on oltava valkoisia, ja niissä ei saa olla jäämiä vaaleanpunaisesta nesteestä.
8. Jatka testausta kohdasta "Signaalin monistuminen", sivu 56.

## Signaalin monistuminen

- Käytä uusia suojakäsineitä DR2:n käsittelyssä.
  - Lisää reagenssia koko sieppauskuoppalevylle vasemmalta oikealle 8-kanavaisella pipetillä.
  - 8-kanavaisen pipetin sijaan voidaan käyttää toistopipettiä. Alikvoi DR2 polypropyleeniputkeen, joka on riittävän suuri koko määrälle.
  - Lisää DR2 keskeytyksettä. Inkubaatioajan on oltava mahdollisimman tarkasti sama kaikissa sieppauskuoppalevyn kuopissa.
  - Varo koskettamasta sieppauskuoppalevyn kuoppien reunoja tai läikyttämästä reagenssia pipetin kärkiin, sillä se voisi johtaa näytteiden ristikontaminaation (katso Kuva 2, sivu **Error! Bookmark not defined.**).
1. Sekoita DR2 perusteellisesti ja siirrä tarvittava määrä (tarpeen mukaan, katso Taulukko 1, sivu **Error! Bookmark not defined.**, tai Taulukko 4, sivu **Error! Bookmark not defined.**) puhtaaseen, kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön.
  2. Pipetoi varovasti 75 µl DR2:ta kuhunkin sieppauskuoppalevyn kuoppaan aiemmin kuvattua käänteistä pipetointitekniikkaa käyttäen (katso "Hybridin osoittaminen", sivu 53).  
Varmista, että kaikki sieppauskuoppalevyn kuopat on täytetty tarkasti tarkkailemalla keltaisen värin voimakkuutta. Keltaisen värin pitäisi olla yhtä voimakasta kaikissa sieppauskuoppalevyn kuopissa.
  3. Sulje sieppauskuoppalevy kuoppalevyn kannella ja inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia (inkubaatioaika enintään 30 minuuttia).  
**Tärkeää:** Suojaa suoralta auringonvalolta.
  4. Jatka testausta kohdasta "Sieppauskuoppalevyn mittaus ja tulosten laatiminen", sivu 57.



---

## Sieppauskuoppalevyn mittaus ja tulosten laatiminen

1. Mittaa sieppauskuoppalevy DML-laitteella.  
Katso kyseisen ohjelmiston käyttöoppaasta tarkemmat tiedot sieppauskuoppalevyn mittaamisesta ja testituloraporttien laatimisesta. Koetiedot voidaan syöttää *digene*-analyysimäärittelyohjelmistoon.
2. Jos kokeessa ei käytetty täyttä sieppauskuoppalevyä, poista käytetyt sieppauskuoppalevyn kuopat kuoppalevykehystä, huuhtelee kuoppalevykehys huolellisesti tislattulla tai deionisoidulla vedellä, kuivaa ja laita säilöön seuraavaa koetta varten.
3. Hävitä kaikki reagenssialikvootit ja valmistetut reagenssit ellei muuta ole määritetty.  
Laimenna jäljelle jäänyt DNR pullossa ennen sen hävittämistä maakohtaisten ja paikallisten laboratoriokäytäntöjen mukaisesti.

# Tulosten tulkinta

1 pg/ml:n raja-arvo *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa vastaa 100 000 HPV-kopiota/ml tai 5 000 HPV-kopiota/analyysi.

## STM-näytteiden koetulokset

STM-näytteitä, joiden RLU/CO:n suhde on  $\geq 1,0$ , pidetään "positiivisina" ("positive") yhdelle tai useammalle testatulle HPV-tyypille 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68.

STM-näytteitä, joiden RLU/CO:n suhde on  $< 1,0$ , pidetään "negatiivisina" ("negative") tai "ei HPV-DNA:ta detekoitu" ("no HPV DNA detected") 13 testatulle HPV-tyypille. Korkean riskin HPV:n DNA-sekvenssit joko puuttuvat tai HPV:n DNA:n määrä jää analyysin detekointirajan alapuolella.

## SurePath-näytteiden koetulokset

SurePath-näytteitä, joiden RLU/CO:n suhde on  $\geq 1,0$ , pidetään "positiivisina" ("positive") yhdelle tai useammalle testatulle HPV-tyypille 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68.

SurePath-näytteitä, joiden RLU/CO:n suhde on  $< 1,0$ , pidetään "negatiivisina" ("negative") tai "ei HPV-DNA:ta detekoitu" ("no HPV DNA detected") 13 testatulle HPV-tyypille. HPV:n DNA-sekvenssit joko puuttuvat tai HPV:n DNA:n määrä jää analyysin detekointirajan alapuolelle.

## PreservCyt-näytteiden koetulokset

PreservCyt-näytteitä, joiden RLU/CO:n suhde on  $\geq 1,0$ , pidetään "positiivisina" ("positive") yhdelle tai useammalle testatulle HPV-tyypille 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68.

PreservCyt-näytteitä, joiden RLU/CO:n suhde on  $< 1,0$ , pidetään "negatiivisina" ("negative") tai "ei HPV-DNA:ta detekoitu" ("no HPV DNA detected") 13 testatulle HPV-tyypille. HPV:n DNA-sekvenssit joko puuttuvat tai HPV:n DNA:n määrä jää analyysin detekointirajan alapuolelle.

QIAGEN suosittelee testaamaan uudelleen PreservCyt-näytteet, joiden RLU/CO-arvo on  $\geq 1,0$  ja  $< 2,5$ , seuraavalla tavalla:

- Jos ensimmäisessä uudelleentestissä RLU/CO on  $\geq 1,0$ , raportoi näyte "positiiviseksi" ("positive"). Lisättestaus ei ole tarpeen.

- Jos ensimmäisessä uudelleentestissä RLU/CO on  $<1,0$ , toinen uudelleentestaus (kolmas tulos) on tarpeen. Toinen tulos on lopullinen tulos ( $<1,0$  on negatiivinen,  $\geq 1,0$  on positiivinen), joka raportoidaan.

RLU/CO-arvo on lähes 1,0

Jos näytteen RLU/CO-arvo on lähes, mutta alle 1,0, ja epäillään korkean riskin HPV-infektiota, on harkittava vaihtoehtoisia testausmenetelmiä ja/tai uutta näytettä.

## Muut HPV-tyypit

Koska tällä analyysillä detekoidaan ainoastaan korkean riskin HPV-tyypit 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68, muista, että näytteissä voi olla muita pienen riskin HPV-tyyppejä. Käytä sukupuoliteitse leviävän pienen riskin HPV:n esiintymisen testaukseen *digene* HC2 HPV DNA -koetta, joka detekoi pienen riskin ja korkean riskin HPV DNA -tyypit..

## Analyysin kalibroinnin verifiointi

Analyysin kalibroinnin verifiointilla varmistetaan, että reagenssit, kalibraattorit ja laatuksentrollit toimivat moitteettomasti ja mahdollistavat analyysin raja-arvon tarkan määrityksen. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa analyysin kalibrointi on tehtävä jokaisessa kokeessa; sen vuoksi on jokainen koe on verifiointi. Tätä verifiointimenettelyä ei ole tarkoitettu korvaamaan sisäisiä laaduntarkkailutestejä. Analyysin kalibroinnin ja laatuksentrollien vahvistuksen hyväksyttävät vaihteluvälit on määritetty ainoastaan QIAGENin hyväksymille DML-laitteille.

*digene*-analyysimääritysohjelmisto suorittaa analyysin kalibroinnin automaattisesti, ja se tulostetaan tietanalyysiraporttiin. *digene* kvalitatiivisen ohjelmiston versiota 1.03 tai aiempaa versiota käytettäessä analyysin kalibroinnin verifiointi on suoritettava manuaalisesti ennen kuin potilasnäytteiden tulokset saa raportoida. Kysy lisätietoja QIAGENin teknisestä palvelupisteestä.

Kokeen on vastattava määritettyjä analyysin kalibrointikriteerejä. Jos jokin seuraavista kriteereistä on epäkelpo, ohjelmisto ei tulkitse näytetuloksia.

## Negatiivinen kalibraattori

Negatiivinen kalibraattori (NC) tulee testata kussakin analyysissä kolme rinnakkain. Jotta voidaan edetä, negatiivisen kalibraattorin keskiarvon pitää olla  $\geq 10$  ja  $\leq 250$  RLU. Negatiivisen kalibraattorin tulosten osoittaman variaatiokertoimen (CV) pitäisi olla  $\leq 25$  %. Jos CV on  $>25$  %,

ohjelmisto poistaa keskiarvosta kauimpana olevan RLU-arvon poikkeavana tuloksena ja laskee keskiarvon ja CV:n uudelleen jäljelle jääneistä arvoista.

Jos CV on edelleen >25 %, analyysin kalibroinnin verifiointi on virheellinen ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

## Positiivinen kalibraattori

HRC tulee testata kussakin analyysissä kolme rinnakkain. HRC:n CV:n pitäisi olla  $\leq 15\%$ . Jos CV on >15%, ohjelmisto poistaa keskiarvosta kauimpana olevan RLU-arvon poikkeavana tuloksena ja laskee keskiarvon ja CV:n uudelleen jäljelle jääneistä arvoista.

Jos CV on edelleen >15%, analyysin kalibroinnin verifiointi on virheellinen ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

## Positiivisen kalibraattorin keskiarvo / negatiivisen kalibraattorin keskiarvo

Ohjelmisto käyttää  $HRC\bar{X}$ :aa ja  $NC\bar{X}$ :aa  $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ :n laskemiseen. Kelvollisen  $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ :n määritelmä on  $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$ .

Jos  $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$  on <2,0 tai >15, analyysin kalibroinnin verifiointi on virheellinen ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

## Raja-arvon (cut-off, CO) laskenta

*digene*-analyysimääritysohjelma laskee ja raportoi RLU/CO-arvon sekä positiiviset/negatiiviset tulokset kaikille näytteille. Positiivisten näytteiden määrittelyn raja-arvona käytetään  $HRC\bar{X}$ :tä. *digene*-analyysimääritysohjelma käyttää näytteen RLU-arvoja ilmaistakseen tulokset näytteen RLU/CO-arvona.

RCS-järjestelmän laitesovelluksessa RCS HPV -ohjelmistoprotokolla soveltaa Calibration Adjustment Factor (CAF) -korjauskerrointa 0,8 validiin  $HRC\bar{X}$ :aan. CAF-korjauskerroin on välttämätön, jotta analyysin suoritusarvot vastaisivat manuaalisen koemenettelyn suoritusarvoja. Tämä muutos koskee vain niitä analyysijä, jotka tehdään RCS:n laitesovelluksella. Siksi tarkkojen koetulosten saamiseksi on ratkaisevan tärkeää, että kuhunkin tiettyyn koemenetelmään valitaan oikea ohjelmistoprotokolla.

## Laaduntarkkailu

Laaduntarkkailunäytteet toimitetaan *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen mukana, ja niitä on käytettävä sisäiseen laaduntarkkailuun. Toimitetut laatukontrollit ovat kloonattuja HPV DNA -kohteita, ja niitä ei ole johdettu villin tyyppin HPV:stä. Kyseessä on samantyyppinen materiaali, jota käytetään toimitetuille kalibraattoreille. Muita laatukontrolleja voidaan testata maakohtaisten tai paikallisten säädösten tai valtuuttavien järjestöjen määräysten mukaisesti. Toimitetut laatukontrollit eivät ole sopivia PreservCyt-liuoksen tai SurePath-säilytysnesteeseen käsittelyyn.

Katso kyseisen *digene*-analyysimääritysohjelmiston käyttöoppaasta laatukontrollien eränumeroiden ja viimeisten käyttöpäivämäärien syöttöohjeet. Jotta analyysi on hyväksyttävä, jokaisen laatukontrollin RLU/CO-arvon on oltava alla olevassa taulukossa 10 määritettyjen kriteerien mukainen.

Jos jokin laatukontrolleista ei ole kyseisellä vaihteluvälillä, analyysin kalibroinnin verifiointi on virheellinen ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

**Taulukko 10. Laatukontrollin analyysin hyväksyttävyysskriteerit**

Laatukontrolli	Minimi (RLU/CO)	Maksimi (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

## Limitations

- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta ei suositella käytettäväksi ihmisen papilloomavirustyyppien 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 testaamiseen epäillyn seksuaalisen hyväksikäytön evaluoinnissa.
- HPV-infektion prevalenssi populaatioissa voi vaikuttaa suoritukseen. Positiiviset ennustearvot alenevat kun testataan populaatioita, joissa prevalenssi on vähäinen, tai yksilöitä, joilla ei ole infektioriskiä.
- Negatiivinen tulos ei sulje pois HPV-infektion mahdollisuutta, sillä hyvin vähäinen infektiota tai näytteenotossa tapahtunut virhe voi aiheuttaa väärän negatiivisen tuloksen. Tämä koe ei myöskään detekoi matalan riskin HPV-tyyppien (6, 11, 42, 43 ja 44) DNA:ta.
- HPV-infektio ei ole varma indikaattori merkittävästä kohdunkaulan sairaudesta eikä se kaikissa tapauksissa viittaa siihen, että merkittävä kohdunkaulan sairaus tai syöpä kehittyy.
- Pieni määrä ristiin hybridisaatiota on olemassa HPV-tyyppien 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ja MM9 ja pienen riskin HPV-koettimen välillä. Potilaita, joilla ilmenee runsaasti näitä HPV-tyyppejä, voidaan virheellisesti lähettää kolposkopiaan (15, 35).
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tarkoitus on osoittaa korkean riskin HPV-tyypit, mukaan lukien 39, 58, 59 ja 68. QIAGENin suorittamat analyttiset tutkimukset, joissa käytettiin kloonattua HPV:n plasmidi-DNA:ta, osoittivat, että koe detekoi ao. tyyppit 0,62–1,39 pg/ml:n pitoisuuksista. Tämä tulos vastaa täysin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen detekointiominaisuuksia muiden HPV-tyyppien kohdalla. QIAGEN on kyennyt validoimaan näiden HPV-tyyppien detekoinnin vain vähäisessä määrässä kliinisiä näytteitä. Koska näiden tyyppien vallitsevuus yleisväestössä on alhainen (28), *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suoritusarvoja HPV-tyyppien 39, 58, 59 ja 68 detekoinnissa ei ole tilastollisesti vahvistettu.
- Jos testaukseen tarkoitetun STM-näytteen ottamispaikassa on runsaasti voidemaista sienilääkettä, ehkäisygeeliä tai emätinhuuhteluainetta, väärän negatiivisen tuloksen mahdollisuus on olemassa, mikäli näytteiden HPV DNA -pitoisuuksien RLU/CO-arvot lähentelevät analyysin raja-arvoa.
- Jos QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettavaan testaukseen tarkoitetun PreservCyt-kohdunkaulanäytteen ottamispaikassa on runsaasti voidemaista sienilääkettä, emättimen liukastusgeeliä tai verta, väärän negatiivisen tuloksen mahdollisuus on olemassa, mikäli näytteiden HPV DNA -pitoisuuksien RLU/CO-arvot lähentelevät analyysin raja-arvoa.
- Jos QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltavan PreservCyt-kohdunkaulanäytteen ottamispaikassa on ehkäisygeeliä, seurauksena saattaa olla väärä negatiivinen koetulos.

- Jos QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistettavan SurePath-kohdunkaulanäytteen ottamispaikassa on ehkäisyvaahtoa, voidemaista sienilääkettä tai voidemaista tulehduslääkettä, seurauksena saattaa olla väärä negatiivinen koetulos.
- Ristireagointi High-Risk HPV -koettimen ja plasmidin pBR322 välillä on mahdollista. pBR322:n homologisten sekvenssien olemassaolo on todettu ihmisen sukupuolielimistä otetuissa näytteissä, ja vääriä positiivisia tuloksia voi ilmetä tilanteissa, joissa mukana on suuria määriä bakteeriperäistä plasmidiainesta.
- Automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä on hybridisaatiolevyn visuaalisella seurannalla varmistettava asianmukainen näytteen siirto sekä tarvittaessa korjattava puutteellinen näytteen siirto, sillä muuten seurauksena voi olla väärä negatiivinen tulos.

## Suorituksen ominaispiirteet

Kliiniset suoritusominaisuudet seulottaessa potilaita, joilla Papa-koetulos on normaali, riskin arvioinnin apuvälineenä potilashallinnassa

Seuraavassa kuvataan tulokset 8 riippumattomasta kliinisestä tutkimuksesta, jotka suoritettiin tunnetuissa lääketieteellisissä, akateemisissa ja julkisissa laitoksissa Yhdysvalloissa ja muissa maissa. Tutkimuksissa käytettiin niissä maissa vakiintuneita Papa-koemenetelmiä, joissa tutkimus suoritettiin. Kaikissa muissa paitsi kahdessa tutkimuksessa Papa-koetulosten tulkintaan käytettiin Bethesda-järjestelmää. Euroopan yhteisössä käytössä oleva kohdunkaulan syövän seulonnan terminologia löytyy julkaisusta "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening" (36). Lisäksi merkittävä kohdunkaulan sairaus diagnosoitiin kolposkopiassa otetun koepalan avulla jokaisessa tutkimuksessa. Näissä tutkimuksissa arvioitiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen kliinistä hyötyä verrattuna Papa-kokeeseen vanhemmilla naisilla (yleensä yli 30-vuotiailla). Kaikissa muissa paitsi yhdessä tutkimuksessa suoritettiin prospektiivinen HPV-koe *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella.

Tutkimukset olivat poikkileikkauksellisia yleisen populaation seulontatutkimuksia, joissa käytettiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta, ellei muuta mainita seuraavassa. Kaksi tutkimusta suoritettiin Yhdysvalloissa, kaksi Euroopassa, kaksi Latinalaisessa Amerikassa, yksi Afrikassa ja yksi Aasiassa.

Kuudessa poikkileikkaustutkimuksessa havaitusta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskyvystä on tehty yhteenveto (katso alla taulukot 11 ja 12) 30-vuotiailla ja vanhemmilla naisilla, joilla on diagnosoitu histologisesti vahvistettu merkittävä kohdunkaulan neoplasia, joka on määritetty kohdunkaulan epiteelin neoplasiaksi (CIN) 3 tai pahemmaksi



**Taulukko 11. Suorituskyvyn arviointi – herkkyys ja tarkkuus**

Tutkimuspopulaatio	n	Herkkyys (%)			Tarkkuus (%)		
		(n/N)			(n/N)		
		95 % luottamusväli (CI)			95 % CI		
		Vain Papa-koe	Vain HPV	HPV + Papa	Vain Papa-koe	Vain HPV	HPV + Papa
Länsi-Eurooppa 1	7592	51.6	96.3	100.0	98.5	96.2	95.1
		(14/27)	(26/27)	(27/27)	(7453/7565)	(7275/7565)	(7193/7565)
		32.0–71.3	81.0–99.9	87.2–100.0	98.2–98.8	95.7–96.6	94.6–95.6
Latin. Amerikka 1	6115	58.4	94.8	97.4	98.7	93.9	93.4
		(45/77)	(73/77)	(75/77)	(5962/6038)	(5669/6038)	(5637/6038)
		46.68–69.6	87.2–98.6	90.9–99.7	98.4–99.0	93.3–94.5	92.7–94.0
Latin. Amerikka 2*	6176	77.9	89.7	94.1	94.1	94.0	89.9
		(53/68)	(61/68)	(64/68)	(5745/6108)	(5742/6108)	(5490/6108)
		66.2–87.1	79.9–95.8	85.6–98.4	93.4–94.6	93.4–94.6	89.1–90.6
Afrikka	2925	84.1	89.7	92.5	86.4	80.0	76.4
		(90/107)	(96/107)	(99/107)	(2436/2818)	(2253/2818)	(2152/2818)
		75.8–90.5	82.4–94.8	85.8–96.7	85.1–87.7	78.4–81.4	74.8–77.9
Aasia	1936	97.6	100.0	100.0	76.3	83.0	68.0
		(41/42)	(42/42)	(42/42)	(1445/1894)	(1572/1894)	(1287/1894)
		87.4–99.9	91.6–100.0	91.6–100.0	74.3–78.2	81.2–85.0	65.8–70.1
USA 1	1040	50.0	100.0	100.0	97.6	96.2	95.5
		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1013/1038)	(999/1038)	(991/1038)
		1.26–98.7	15.8–100.0	15.8–100.0	96.5–98.4	94.9–97.3	94.0–96.7

\* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tiedot käytettävissä olevista tapauksista, muuten käytetty HCS-tietoja; yhdistetyt tiedot.

**Taulukko 12. Suorituskyvyn arviointi – positiivinen ja negatiivinen ennustearvo**

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

\* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tiedot käytettävissä olevista tapauksista, muuten käytetty HCS-tietoja; yhdistetyt tiedot.

Kaikissa tutkimuksissa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen herkkyuden on todettu yhtenäisesti ja usein hyvin merkittävästi olevan herkempi kuin pelkän Papa-kokeen. Herkkyuden osalta HPV:n negatiivinen ennustearvo ylittää Papa-kokeen vastaavan arvon kaikissa tapauksissa ja lähentelee 100 %:a. Tämä negatiivinen ennustearvo osoittaa, että merkittävä kohdunkaulan sairaus tai syöpä voidaan suurella todennäköisyydellä sulkea pois naisilla, joilla on normaali sytologia ilman HPV-infektiota.

Vaikka *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tarkkuus on pienempi kuin pelkän Papa-kokeen, todennäköisyysuhteen analyysi on osoittanut, että havaitun tarkkuuden väheneminen ei ole tarpeeksi merkittävä, jotta se vaikuttaisi kokeen käytön kliiniseen hyötyyn niiden naisten tunnistamiseksi, joilla ei ole kohdunkaulan sairauden kehittymisriskiä tai joilla tämä riski on pieni. Tästä huolimatta on tärkeää, että päätös potilaan lähettämisestä kolposkopiaan perustuu kaikkiin kliinisiin ja riskejä koskeviin tietoihin sekä lääkärin käytettävissä oleviin potilaan esitietoihin.

---

Tärkeitä muuttujia ovat mm. aiempi HPV-infektio ja/tai poikkeva Papa-koetulos, ikä ensimmäisessä yhdynnässä, sukupuolikumppanien lukumäärä sekä ajankohtaiset sukupuolitaudit (37, 38).

Vaikka merkittävän sairauden esiintyminen ei poikkea huomattavasti tutkimuksissa, joita käytettiin suorituskyvyn määrittämiseen, HPV-infektion esiintyminen tutkimuspopulaatiossa voi vaikuttaa suorituskykyyn ja vaihtelee yleensä potilaspopulaation keskuudessa. Lisäksi HPV-infektion esiintyvyyden on osoitettu vähenevän huomattavasti iän myötä (17, 24–29, 38–40). Positiiviset ennustearvot laskevat testattaessa tutkimuspopulaatioita, joissa esiintyminen on vähäistä tai henkilöillä on pieni infektoriski.

Suoritetussa pitkittäisanalyysissä käytettiin tuloksia kahdesta tutkimuksesta, joista yksi suoritettiin Yhdysvalloissa National Cancer Institute (NCI) -instituutissa (Yhdysvaltojen syöpäinstituutti) Portlandissa, Oregonissa, ja toinen Ranskassa Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims -laboratoriossa (Reimsin yliopistollisen keskussairaalan Pol Bouin -laboratorio). Näiden pitkittäisanalyysien tarkoituksena oli osoittaa, että potilailla, joiden Papa-kokeen/HPV-kokeen tulokset olivat negatiiviset, on pienempi kohdunkaulan sairauden riski verrattuna perinteisellä tavalla määritettyihin matalan riskin naisiin, joiden HPV-tilaa ei tiedetä, ja verrattuna potilaisiin, joiden Papa-kokeen tulos on negatiivinen ja HPV-kokeen tulos positiivinen (katso alla taulukot 13 ja 14).

**Taulukko 13. Pitkittäisanalyysi — merkittävän sairauden suhteellinen riski**

Tutkimusryhmä	Ikä	Matalan riskin luokitus	n	Tapaukset CIN 3+	Määrä (100 potilasvuotta kohden)	Suht. riski 95 % CI
NCI	30 ja yli	Papa normaali, HPV negatiivinen	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet*	9429	19	0.048	1.000
	Kaikki	Papa normaali, HPV negatiivinen	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet*	13,392	44	0.082	1.000
Ranska	30 ja yli	Papa normaali, HPV negatiivinen	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet†	2026	4	0.099	1.000
	Kaikki	Papa normaali, HPV negatiivinen	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet†	2650	7	0.136	1.000

\* Kolme normaalia Papa-koetta noin 2 vuoden ajalla.

† Kaksi normaalia Papa-koetta noin 2 vuoden ajalla

**Taulukko 14. Pitkittäisanalyysi — sairausmäärä ositettuna lähtötason HPV-statuksen mukaan**

Tutkimusryhmä	Ikä	Lähtötason status	n	Tapaukset CIN 3+	Määrä (100 potilasvuotta kohden)	Suht. riski 95 % CI
NCI	30 ja yli	Papa normaali, HPV positiivinen	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Papa normaali, HPV negatiivinen	12,054	28	0.043	1.00
	Kaikki	Papa normaali, HPV positiivinen	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Papa normaali, HPV negatiivinen	17,594	48	0.056	1.00
Ranska	30 ja yli	Papa normaali, HPV positiivinen	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Papa normaali, HPV negatiivinen	1696	3	0.084	1.00
	Kaikki	Papa normaali, HPV positiivinen	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Papa normaali, HPV negatiivinen	2180	3	0.066	1.00

Lisäksi kohdunkaulan sairauden lisääntynyt riski HPV-positiivisilla naisilla verrattuna HPV-negatiivisiin naisiin osoittaa HPV-koetuloksen klinisen hyödyn.

### Kliininen suoritus Papa-koetuloksen ASC-US saaneiden potilaiden seulonnassa kolposkopia-lähetteen tarpeen määrittämistä varten

Yhdysvalloissa suoritettiin vuonna 1996 Kaiser Foundation Research Instituten (Kaiser-säätiön tutkimusinstituutti) ja Kaiser Permanente Medical Groupin (Kaiser Permanente -tutkimusasema) johdolla tutkimus HPV DNA -kokeiden hyödyllisyydestä naisilla, joilla oli todettu borderline papatulos (Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears). Kaiser-klinikoilla tutkimuksissa käyville naisilta otettiin kohdunkaulanäytteet rutiinomaista papa-koetta sekä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta varten. Alkuiset papa-näytteet evaluoitiin Bethesdan luokituksen mukaan. Euroopan yhteisössä käytössä oleva kohdunkaulan syövän

seulonnan terminologia löytyy julkaisusta "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening" (42). Naiset (15-vuotiaat ja sitä vanhemmat), joiden papa-tulos oli ASC-US-tulos (merkitykseltään määrittelemättömiä epätyypillisiä soluja), palasivat kolposkopia- ja koepalatutkimukseen. Kolposkooppisesti ohjatut histologiset näytteet tutkittiin patologistesti ja tehtiin initiaalinen diagnoosi. Kunkin histologisen näytteen tarkasti myös puolueeton patologi ja initiaalisen tarkastuksen ja puolueettoman tarkastuksen välillä ilmenneet eriävyydet ratkaisi kolmas patologi.

Initiaalinen näyte tutkittiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen prototyypillä jossa oli koettimet yhteentoista 13 HPV-typistä (poislukien HPV-typit 59 ja 68). Tämän eron ei oleteta vaikuttavan merkittävästi näiden kahden analyysin suoritusprofileihin.

Käytettävissä olivat korkean riskin HPV-tulokset ja histologiset diagnoosit 885 testatulta naiselta, joiden papa-tulos oli ASC-US. Useimmat potilaat tutkittiin ottamalla näytteet sekä STM:ään että PreservCyt-liuokseen. Koska *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskykyominaisuudet ovat samanlaiset sekä STM:ssä että PreservCyt-liuoksessa, analyysin suorituskyky esitetään vain PreservCyt-liuoksen osalta.

Potilailla, joilla Papa-kokeen tulos oli ASC-US, *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen negatiivinen ennustearvo HSIL:lle tai merkittävämmälle sairaudelle kolposkopiassa oli 99 % (katso alla taulukko 15).

**Taulukko 15. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen ja yksimielisen histologian vertailu; Papa-kokeen ASC-US-tulos; Kaiser-tutkimus, PreservCyt-näytteet**

		HSIL tai suurempi kolposkopian ajankohtana		Yhteensä
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA -koe	+	66	317	383
	-	5	497	502
Yhteensä		71	814	885

Herkkyys [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)  
 95 % CI = 84,3–97,7  
 Tarkkuus [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)  
 95 % CI = 57,7–64,4  
 Sairauden esiintyminen = 8,0 % (71/885)  
 Analyysin positiivinen ennustearvo = 17,2 % (66/383)  
 Analyysin negatiivinen ennustearvo = 99,0 % (497/502)

Tutkimuksessa määritettiin teoreettiset positiiviset ja negatiiviset ennustearvot perustuen eri esiintymisiin aluksi todetulle ASC-US:lle, jonka todettiin olevan HSIL tai korkeampi perustuen korkean riskin HPV-kokeen tuloksiin (katso alla taulukko 16).

**Taulukko 16. Teoreettinen positiivinen ja negatiivinen ennustearvo Papa-kokeen ASC-US-tuloksen korkean riskin HPV:n testauksessa**

HSIL:n teoreettinen esiintyvyys	Papa-kokeen initiaalinen ASC-US-tulos	
	Analyyysin positiivinen ennustearvo	Analyyysin negatiivinen ennustearvo
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

Tutkimuksen eri ikäryhmien väliset vaihtelut määritettiin (katso alla taulukko 17).

**Taulukko 17. Kaiser-tutkimuksen tiedot: digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen toimivuus verrattuna yksimielisen histologian tuloksiin (HSIL) – ikäkohtaiset ominaisuudet**

	Ikä <30	Ikä 30–39	Ikä >39
<b>n</b>	287	233	365
<b>Sairauden esiintyminen (%)</b>	12.2	11.2	2.7
<b>Herkkyys (%)</b>	100	88.46	80.0
<b>(n/N)</b>	(35/35)	(23/26)	(8/10)
<b>95 % CI</b>	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
<b>Tarkkuus (%)</b>	31.4	66.2	79.15
<b>(n/N)</b>	(79/252)	(132/207)	(281/355)
<b>95 % CI</b>	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
<b>Negatiivinen ennustearvo (%)</b>	100.0	97.86	99.29
<b>(n/N)</b>	(79/79)	(137/140)	(281/283)
<b>Positiivinen ennustearvo (%)</b>	16.83	24.73	9.76
<b>(n/N)</b>	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Kliininen herkkyys ja spesifisyys korkea-asteisen sairauden riskin määrittämiseksi naisilla, joiden papa-tuloksena on LSIL tai HSIL

Kliininen monikeskustutkimus, jossa käytettiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta ja jota varten kerättiin aineistoa useasta USA:n länsi- ja eteläosissa sijaitsevasta sairaalasta, joissa gynekologisten sairauksien ja HPV-tapausten prevalenssi on korkea, sekä hoitokeskusten kolposkopiaklinikoilta (3 paikkaa). HPV-testaus suoritettiin kolmessa tutkimuspaikassa, joilla ei ole yhteyttä niihin kolposkopiaklinikoihin, joista näytteet oli hankittu. Tutkimuspopulaatio koostui

naisista, joilla oli äskettäin otetun papa-näytteen perusteella diagnosoitu joko LSIL tai HSIL ja jotka oli lähetetty kolposkooppiseen jatkotoimenpiteeseen. Tutkimukseen kuuluneista 702 potilaasta 327 kohdalla papa-tulos oli korkeampi kuin ASC-US ja heitä informoitiin asiaan kuuluvasti; heistä 96:lla lopullinen status oli HSIL tai korkeampi.

Irtoisolunäytteiden ottamiseen kohdunkaulan kanavasta käytettiin joko *digene* HC2 DNA Collection Device -näytteenotinta, joka pantiin STM:iin, taikka luudan tyyppistä välinettä, joka huuhdottiin PreservCyt-liuoksessa. Näytteet otettiin kolposkopian yhteydessä. Näytteet tutkittiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella, ja tuloksia verrattiin kunkin potilaan kohdalla määritettyyn taudin statukseen. Sairauden status perustui histologisen arvioinnin tuloksiin. Jos histologia oli negatiivinen tai jos histologiset tulokset puuttuivat, sairauden status määritettiin sytologisesti kolposkopiatutkimuksen yhteydessä (katso alla taulukko 18).

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koe suoritettiin kolmessa isossa suurkaupunkialueen hoitokeskuksessa, joilla ei ole yhteyttä kolposkopiassa kerättyjen näytteiden ottopaikkoihin. Sytologinen tutkimus tehtiin patologisessa referenssilaboratoriossa ja histologia suoritettiin kolposkopian tehneissä laitoksissa. Koetuloksia verrattiin taudin statukseen arvioitaessa kokeen herkkyyttä, spesifisyyttä sekä negatiivista ja positiivista ennustearvoa korkean asteen kohdunkaulan neoplasian osoittamiseksi. Koska *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorittaminen on samankaltaista sekä STM:ssä että PreservCyt-liuoksessa, analyysin suoritus esitetään vain PreservCyt-liuoksen osalta. Mitään eroa ei havaittu korkean riskin HPV-koettimen tuloksissa STM-näytteistä ja PreservCyt-näytteistä.



**Taulukko 18. Potilaan sairauden statuksen algoritmi**

Sytologinen tulos	Histologinen tulos	Sairauden status
Negatiivinen	Negatiivinen tai ei suoritettu*	Negatiivinen
LSIL	Negatiivinen	LSIL
HSIL	Negatiivinen	HSIL
Syöpä	Negatiivinen	HSIL+
Negatiivinen	LSIL	LSIL
LSIL	Ei suoritettu*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Syöpä	LSIL	LSIL
Negatiivinen	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ei suoritettu*	HSIL
Syöpä	HSIL	HSIL
Negatiivinen	Syöpä	HSIL+
LSIL	Syöpä	HSIL+
HSIL	Syöpä	HSIL+
Syöpä	Ei suoritettu*	HSIL+
Syöpä	Syöpä	HSIL+

\*Biopsiaa ja/tai endoserviksen kaavintaa ei suoritettu, koska kolposkopiassa ei havaittu poikkeavuuksia tai histologinen tulos ei ollut käytettävissä

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -toimivuuden määrittämiseen käytettiin 327 PreservCyt-näytettä, joista 96 otettiin naisilta, joilla oli diagnosoitu merkittävä kohdunkaulan sairaus (katso alla taulukot 19 ja 20). Vertailuissa käytettiin kaikkia tutkimukseen osallistuneita potilaita, joilla Papakokeen tulos oli poikkeava.

**Taulukko 19. Korkean riskin HPV-kokeen tulokset**

		Korkean riskin HPV:n tulokset		Lopullinen sairauden status HSIL		Lopullinen sairauden status LSIL		Lopullinen sairauden status negatiivinen		Yhteensä
		+	-	+	-	+	-			
Papa-kokeen tulos	LSIL	44	4	78	33	28	37			224
	HSIL	45	3	29	14	5	7			103
	Yhteensä	89	7	107	47	33	44			327
	Yhteensä	96		154		77				327

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koe osoitti noin 93 %:n kokonaisherkkyyden niiden naisten tunnistamiseen, joilla on merkittävä neoplasia, tutkimuspopulaatiosta, joka oli lähetetty kolposkopiaan Papa-kokeen diagnoosiin LSIL, HSIL tai muuhun vastaavaan perustuen (katso alla taulukko 20). Koe osoitti myös lähes 95 %:n negatiivisen ennustearvon tässä tutkimuspopulaatiossa.

**Taulukko 20. Korkean riskin HPV DNA -kokeen suoritusominaisuudet potilailla, joilla Papa-kokeen tulos on LSIL tai suurempi ja lopullinen sairauden tila HSIL**

		Lopullinen sairauden tila		Yhteensä
		HSIL	LSIL tai negatiivinen	
Korkean riskin HPV DNA -kokeen tulos	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Yhteensä	96	231	327

Herkkyys [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)  
 95 % CI = 85,6–97,0  
 Tarkkuus [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)  
 95 % CI = 33,1–46,0  
 Sairauden esiintyminen lähetteen LSIL:stä lopulliseen HSIL:ään = 21,4 %  
 Sairauden esiintyminen lähetteen HSIL:stä lopulliseen HSIL:ään = 46,6 %  
 Yleinen positiivinen ennustearvo = 38,9 % (89/229)  
 Yleinen negatiivinen ennustearvo = 92,8 % (91/98)

Vaikka *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tarkkuus vaikutti olevan melko matala, neoplasian poissulkemisen ja negatiivisen HPV-tuloksen välillä ei odoteta olevan tiivistä korrelaatiota. HPV-DNA:ta voi esiintyä naisilla, joilla sairaus ei ole edennyt merkittäväksi. Kun näytteille, joiden *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetulos oli positiivinen ja joiden vastaava

sairauden status oli pienempi kuin lievä neoplasia, suoritettiin HPV:n polymeraasiketjureaktiotesti (tutkimuksessa käytetään ainoastaan analyysiä), lähes 75 % näytteistä oli positiivisia.

Tutkimuksessa määritettiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen teoreettiset positiiviset ja negatiiviset ennustearvot Papa-kokeen aluksi todetulle LSIL- tai HSIL-tulokselle, jonka kolposkopiassa todettiin olevan HSIL tai vakavampi sairaus (katso alla taulukko 21).

**Taulukko 21. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen teoreettinen positiivinen ja negatiivinen ennustearvo Papa-kokeessa aluksi todetulle LSIL- tai HSIL-tulokselle**

HSIL:n teoreettinen esiintyvyys	Papa-kokeessa aluksi todettu LSIL tai HSIL	
	Analyysin positiivinen ennustearvo	Analyysin negatiivinen ennustearvo
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

## Emätinnäytteiden ja potilaiden itse ottamien näytteiden toimivuus

Tutkimuksissa on tutkittu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskykyä itse kerättyjen vaginanäytteiden määrittämisessä. Näihin tutkimuksiin osallistui yli 141 000 naista, joiden ikä oli 16–54. Tutkimuskohortteihin kuului kiinalaisia (41, 42), meksikolaisia (43, 44) ja isobritannialaisia (45) naisia. Tutkimusasetelmat vaihtelivat hieman, mutta yleensä positiivisen tuloksen saaneille naisille tarjottiin jatkotutkimusta kolposkopialla, ja tulokset ilmoitettiin vertailtavaan menetelmään verrattavan herkkyden ja spesifisyyden suhteen.

Kahdessa tutkimuksessa, joiden tietojen perusteella voitiin verrata itse kerättyjä ja lääkärin keräämiä näytteitä, tulokset viittaavat korkeaan CIN2+-herkkyteen kummankin menetelmän tapauksessa (42, 45): 81–85 % itse kerättyjen näytteiden ja 96–100 % lääkärin keräämien näytteiden osalta. Spesifisyystulokset olivat vastaavia CIN2+:n suhteen kummassakin menetelmässä (42, 45): 81–82 % itse kerättyjen ja 83–85 % lääkärin keräämien näytteiden osalta. Muissa tutkimuksissa, joista oli saatavissa vain itse kerättyjen näytteiden suorituskykyä

koskevia tietoja, *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen herkkyys CIN2+:n suhteen oli 3,4 kertaa suurempi kuin sytologisella määrityksellä (43) ja sen herkkyys oli 98 % ennen vahvistusharhan korjaamista (44).

## Analyyttinen herkkyys

Ei-kliininen, kloonattua HPV-plasmidi-DNA:ta sisältävä paneeli testattiin sen määrittämiseksi, voidaanko kaikki 13 HPV-tyyppiä osoittaa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella sekä voidaanko kokeen analyttinen herkkyys määrittää kullekin HPV-tyypille. Kunkin 13 HPV:n DNA-tyypin (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68) kaikki HPV-kohdepitoisuudet (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml ja 0,2 pg/ml) ajettiin kolme rinnakkain. Signaalin keskiarvo (relatiivisina valoyksikköinä, RLU) laskettiin kunkin HPV-tyypin kaikille pitoisuuksille ja verrattiin korkean riskin positiiviseen kalibraattoriin.

Kunkin HPV-tyypin detekointiraja STM:ssä määritettiin (katso alla taulukko 22). Detekointirajat vaihtelivat 0,62 pg/ml:n ja 1,39 pg/ml:n välillä testattavasta HPV-tyypistä riippuen. Kaikkien 13 HPV-DNA-tyypin keskimääräinen detekointiraja oli 1,08 pg/ml ja standardipoikkeama 0,05 pg/ml.

**Taulukko 22. Yhteenveto kunkin HPV-DNA-tyypin herkkyysrajoista STM-laitteessa**

HPV-DNA-tyyppi	Detekoitava HPV-DNA-pitoisuus (pg/ml)	Vakio-poikkeama	95 % CI
16	1.09	0.06	0.94–1.29
18	1.05	0.05	0.88–1.29
31	1.01	0.05	0.91–1.15
33	1.35	0.02	1.26–1.45
35	1.11	0.05	0.95–1.31
39	1.39	0.09	1.16–1.71
45	1.14	0.04	0.99–1.35
51	0.78	0.10	0.70–0.88
52	1.37	0.06	1.21–1.58
56	0.62	0.04	0.58–0.67
58	0.82	0.04	0.73–0.94
59	1.10	0.06	1.00–1.21
68	1.19	0.04	1.03–1.39
<b>Keskiarvo (kaikki tyypit)</b>	<b>1.08</b>	<b>0.05</b>	<b>0.95–1.25</b>

## Näytteiden välinen ekvivalenssi

### STM- ja PreservCyt-näytteiden olevien näytteiden välinen ekvivalenssi

STM- ja PreservCyt-näytteiden välistä ekvivalenssia tutkittiin niiden kyvyllä löytää HPV 18 DNA. STM:ään ja PreservCytin negatiiviseen solupooliin lisättiin noin  $10^6$  positiivisia HeLa-soluja, jotka sisälsivät integroitua HPV 18:n genomeja. Kukin näytetyyppi prosessoitiin sille tarkoitettujen, vastaavissa käyttöohjeissa kuvattujen valmistelu-/denaturointimenetelmien mukaisesti ja testattiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. Tulokset osoittivat, että kyky löytää HPV 18 DNA:ta ihmisen syöpäsoluista oli samanarvoinen näissä kahdessa alustassa ja että PreservCyt-näytteen valmistusmenetelmä ei vaikuta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen analyttiseen herkkyteen.

### PreservCyt-näytteiden manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen PreservCyt-näytteiden valmistelun välinen ekvivalenssi

Tutkimuksissa käytettiin PreservCyt-näytteitä, jotka otettiin normaalin sytologian omaavien naisten alatutkimuspopulaatiosta (n=1276) sekä ASC-US-sytologian tai ASC-US:ää suuremman sytologian omaavien naisten alatutkimuspopulaatiosta (n=402). Jokainen näyte valmisteltiin manuaalisesti ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä, minkä jälkeen näytteet testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella (katso alla oleva taulukko 23).

**Taulukko 23. PreservCyt-näytteiden yhtäpitävyys manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen valmistelun välillä (n=1678)**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
Voimakkaan positiivinen alue		Voimakkaan negatiivinen alue	
Kaikki positiiviset	(RLU/CO $\geq 2,5$ )	Kaikki negatiiviset	(RLU/CO $< 0,8$ )
96.0	97.6	96.2	99.1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistettujen PreservCyt-näytteiden suhteellinen analyysierkkyys ja -tarkkuus korreloi voimakkaasti manuaalisen valmistelumenetelmän jälkeen saatujen tulosten kanssa. Tästä osoituksena on 95 %:n luottamusvälin alaraja sekä positiivisessa että negatiivisessa yhtäpitävyydessä.

PreservCyt-näytteiden manuaalisen valmistelun ja PreservCyt-näytteiden QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritetun valmistelun välinen ekvivalenssi

Tutkimuksissa käytettiin PreservCyt-näytteitä, jotka otettiin 30-vuotiaiden ja sitä vanhempien, normaalin sytologian omaavien naisten alatutkimuspopulaatiosta (n=1901) ja ASC-US-sytologian omaavien naisten alatutkimuspopulaatiosta (n=398). Jokainen näyte valmisteltiin manuaalisesti ja QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä, minkä jälkeen näytteet testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella (katso alla oleva taulukko 24).

**Taulukko 24. PreservCyt-näytteiden yhtäpitävyys manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritetun valmistelun välillä (n=2299)**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI Voimakkaan positiivinen alue		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI Voimakkaan negatiivinen alue	
Kaikki positiiviset	(RLU/CO $\geq$ 2,5)	Kaikki negatiiviset	(RLU/CO $<$ 0,8)
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden suhteellinen analyysierkkyyys ja -tarkkuus korreloi voimakkaasti manuaalisen valmistelumenetelmän jälkeen saatujen tulosten kanssa. Tästä osoituksena on 95 %:n luottamusvälin alaraja sekä positiivisessa että negatiivisessa yhtäpitävyydessä.

STM-käsittelyn ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalisen valmistelun välinen yhtäpitävyys

Kaksivaiheinen kliininen arviointi suoritettiin 6 näytteenottokeskuksessa ja 3 testauspaikassa Yhdysvalloissa. Tutkimukseen saivat rekisteröityä potilaat sukupuolitautien klinikoilla, synnytys- ja gynekologisilla klinikoilla, kolposkopian klinikoilla sekä sairaaloissa tai perhesuunnittelukeskuksissa ennalta määritettyjen mukaanottamis- ja poisjättämiskriteerien mukaisesti. Esitutkimusvaiheeseen, jonka tarkoituksena oli määrittää asianmukainen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen raja-arvo postradianteille SurePath-solupellettinäytteille, osallistui noin 400 potilasta. Kliininen validointivaihe, johon osallistui noin 1 500 potilasta ja jonka tarkoituksena oli valitun raja-arvon validointi, aloitettiin esitutkimusvaiheen välianalyysin osoitettua, että raja-arvo 1,0 RLU/CO postgradientteja SurePath-solupellettinäytteitä käytettäessä tuotti hyväksyttävän yhtäpitävyyden STM-näytteiden tulosten kanssa.

Kohdunkaulan SurePath- ja STM-parinäytteet otettiin jokaiselta suostumuksen antaneelta naiselta. SurePath-näyte lähetettiin sitten sytologiseen laboratorioon liuskan valmistelua varten. SurePath-näyte lähetettiin sen jälkeen sytologiseen laboratorioon liuskan valmistelua varten. Sytologisen valmistelun jälkeen jäljelle jäänyt postgradientti SurePath-solupellettinäyte ja vastaava STM-näyte testattiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella käyttäen raja-arvona 1,0 RLU/CO (katso alla oleva taulukko 25).

**Taulukko 25. Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden ja STM-näytteiden tulosten yhtäpitävyys (kaikki iät ja sytologinen luokitus) (n=1 490)**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
Voimakkaan positiivinen alue		Voimakkaan negatiivinen alue	
Kaikki positiiviset	(RLU/CO $\geq 2,5$ )	Kaikki negatiiviset	(RLU/CO $< 0,80$ )
93.5	96.4	95.3	96.0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden testauksen suhteellinen analyysierkkyys ja -tarkkuus korreloi voimakkaasti STM-näytteiden tulosten kanssa. Tästä on osoituksena 95 %:n luottamusvälin alaraja sekä positiivisessa että negatiivisessa yhtäpitävyydessä.

Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen valmistelun yhtäpitävyys

Tutkimukset suoritettiin seuraavista alatutkimuspopulaatioista kerätyistä SurePath-näytteistä:

- naiset, joiden sytologia on normaali (n=1189)
- naiset, joiden sytologia on ASC-US tai ASC-US:ää suurempi (n=199)

Kullekin SurePath-näytteelle suoritettiin SurePath-näytteen valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä ja postgradientin solupellettinäytteen manuaalinen valmistelu. Kullekin valmistelluista näytteistä suoritettiin automaattinen testaus RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta käyttäen (katso alla oleva taulukko 26).

**Taulukko 26. SurePath-näytteiden manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen näytteen valmistelun tulosten yhtäpitävyys (n = 1 388)**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
Kaikki positiiviset	Voimakkaan positiivinen alue (RLU/CO $\geq$ 2,5)	Kaikki negatiiviset	Voimakkaan negatiivinen alue (RLU/CO $<$ 0,8)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistettujen SurePath-näytteiden suhteellinen analyysiherkkyys ja -tarkkuus korreloi voimakkaasti manuaalisen valmistelumenetelmän jälkeen saatujen tulosten kanssa. Tästä osoituksena on 95 %:n luottamusvälin alaraja sekä positiivisessa että negatiivisessa yhtäpitävyydessä.

Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden manuaalisen valmistelun ja postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen valmistelun yhtäpitävyys

Tutkimukset suoritettiin seuraavista alatutkimuspopulaatioista kerätyistä SurePath-näytteistä:

- Naiset, joiden sytologia on normaali (n = 1 200)
- Naiset, joiden sytologia on ASC-US tai ASC-US:ää suurempi (n = 183)

Jokainen postgradientti solupellettinäyte valmisteltiin manuaalisesti ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä, minkä jälkeen näytteet testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella (katso alla oleva taulukko 27).



**Taulukko 27. Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden tulosten yhtäpitävyys manuaalisen valmistelun ja QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettun valmistelun kanssa (n = 1 383)**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
Kaikki positiiviset	Vahvasti positiivinen alue RLU/CO $\geq$ 2,5	Kaikki negatiiviset	Vahvasti negatiivinen alue RLU/CO < 0,8
92.6	97.4	94.4	99.3
(188/203)	(147/151)	(1114/1180)	(1078/1086)
88.2–95.5	93.4–99.0	92.9–95.6	98.6–99.6

QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistettujen postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden suhteellinen analyysierkkyys ja -tarkkuus korreloivat voimakkaasti manuaalisen valmistelumenetelmän jälkeen saatujen tulosten kanssa. Tästä osoituksena on 95 %:n luottamusvälin alaraja sekä positiivisessa että negatiivisessa yhtäpitävyydessä.

## Koemenetelmien välinen yhtäpitävyys

Monikeskustutkimus (n=2270) suoritettiin tarkoituksena arvioida RCS-järjestelmän kliinisiä koetuloksia verrattuna manuaalisella menetelmällä saatuihin koetuloksiin. Testaus suoritettiin 3 QIAGENin ulkopuolisessa testauspaikassa. Potilasnäytteet otettiin 5 näytteenottoaikassa. Tietosarja koostui 1269 PreservCyt-liuokseen otetusta kohdunkaulanäytteestä ja 1001 STM:ään otetusta näytteestä.

Tälle tutkimuspopulaatiolle laskettiin tilastolliset yhtäpitävyydet RCS:llä testattujen ja manuaalisesti testattujen täsmäviiden näytteiden välille (katso alla taulukot 28 ja 28).

**Taulukko 28. Yhteenveto automaattisesti RCS-järjestelmällä testattujen ja manuaalisesti testattujen näytteiden yhtäpitävyydestä – STM-näytteet (n=1001)**

Sytologinen luokitus	HPV:n esiintyminen (%)	Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
		Kaikki positiiviset	Voimakkaan positiivinen alue (RLU/CO >2,5)	Kaikki negatiiviset	Voimakkaan negatiivinen alue (RLU/CO <0,8)
WNL* <30 vuotta	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥30 vuotta	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Muu	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Kaikki STM-näytteet	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

\* WNL = normaalin rajoissa (within normal limits).

**Taulukko 29. Yhteenveto automaattisesti RCS-järjestelmällä testattujen ja manuaalisesti testattujen näytteiden yhtäpitävyydestä – PreservCyt-näytteet (n=1269)**

Sytologinen luokitus	HPV Esiintyminen (%)	Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
		Kaikki positiiviset	Voimakkaan positiivinen alue (RLU/CO >2,5)	Kaikki negatiiviset	Voimakkaan negatiivinen alue (RLU/CO <0,8)
WNL <30 vuotta	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL ≥30 vuotta	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Muu sytologia	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Kaikki PreservCyt-näytteet*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

\*WNL = normaalin rajoissa (within normal limits).

† Sytologiatiedot puuttuvat 4 potilaalta

Täydentävässä kliinisessä tutkimuksessa käytettiin arkistoituja jäljelle jääneitä PreservCyt-näytteitä, jotka oli otettu 30-vuotiaiden ja vanhempien, normaalin sytologian omaavien naisten alatutkimusryhmästä (katso alla taulukko 30), jossa HPV:n esiintyvyys oli 4,8 %

**Taulukko 30. Yhteenveto automaattisesti RCS-järjestelmällä testattujen ja manuaalisesti testattujen näytteiden yhtäpitävyydestä – WNL 30-vuotiaat ja vanhemmat naiset (n=2077)**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	
Kaikki positiiviset	Voimakkaan positiivinen alue (RLU/CO >2,5)	Kaikki negatiiviset	Voimakkaan negatiivinen alue (RLU/CO <0,8)
92.0 (92/100) 84.84–96.48	91.8 (78/85) 83.77–96.62	99.3 (1964/1977) 98.88–99.65	99.7 (1944/1949) 99.40–99.92

Manuaalisen ja RCS-järjestelmässä suoritettujen automaattisten testauksen tulosten välillä oli 7 diskordanttia tulosta voimakkaan positiivisella alueella. Näiden 7 näytteen manuaalisen testauksen ensitulokset olivat suositellun PreservCyt-näytteiden uudelleentestauksen algoritmin ulkopuolella. Koska tutkimusasetelma edellytti kuitenkin kaikkien näytteiden testausta kolminkertaisesti, uudelleentestauksen tulokset olivat käytettävissä poikkeavuuksien ratkaisemista varten.

Jokaisen 7 diskordantin näytteen uudelleentestauksen tiedot viittaavat siihen, että kaikki diskordantit näytteet ovat HPV DNA -negatiivisia (katso alla taulukko 31). Kummallekin replikaatille saatuihin toistuviin negatiivisiin tuloksiin perustuen kaikki manuaalisen testauksen alunperin positiiviset tulokset olivat todennäköisesti väärä positiivisia.

**Taulukko 31. Diskordantit PreservCyt-näytteet WNL 30-vuotiaille ja vanhemmille naisille (n=7)**

Näyte	Paikka	Manuaalinen testaus (RLU/CO)			Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä (RLU/CO)		
		Aluksi	Toisto 1	Toisto 2	Aluksi	Toisto 1	Toisto 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Tämän klinisen tutkimuksen tulokset osoittavat yleisen yhtäpitävyyden RCS-järjestelmällä suoritettujen automaattisen sekä manuaalisen testauksen välillä käytettäessä joko STM- tai PreservCyt-näytteitä.

## Toistettavuus

### Manuaalisen testauksen yleinen toistettavuus

Toistettavuudesta suoritettiin monikeskustutkimus tarkoituksena määrittää *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen toistettavuus päivien välillä ja tutkimuspaikkojen välillä sekä yleinen toistettavuus. Kokeessa käytettiin HPV-DNA -kohteiden paneelia sekä HPV-positiivisia ja HPV-negatiivisia kliinisiä STM-näytteitä.

Kolme ulkoista laboratoriota suoritti kokeen samalla *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koekittierällä 3 eri päivänä käyttäen identtistä toistettavuuspaneelia. Toistettavuuspaneeli sisälsi seuraavat näytteet:

- 12 denaturoitua kliinistä STM-näytekokoelmaa
- 3 denaturoimatonta kliinistä PreservCyt-näytekokoelmaa
- Negatiivinen kalibraattori
- Positiivinen High-Risk HPV -kalibraattori pitoisuuksina 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml ja 10 pg/ml.

Kaikki paneelin jäsenet testattiin joka päivä kolminkertaisesti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. Tulokset osoittivat, että *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen toistettavuus kliinisillä näytteillä on erittäin hyvä (katso alla taulukko 32).

**Taulukko 32. Yleinen toistettavuus – monikeskus/toistettavuus (kaikki kokeet kaikissa testauspaikoissa)**

Tilastollinen suure	Tulos
Odotetut positiiviset ja havaittu positiivinen tulos (95 % CI)	100.0% (99.0–100.0)
Odotetut negatiiviset ja havaittu negatiivinen tulos (95 % CI)	99.0% (97.49–99.73)
Yhtäpitävyys (95 % CI)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

### Toistettavuus kliinisillä STM-näytteillä

#### Manuaalinen testaus.

Tutkimus suoritettiin tarkoituksena selvittää *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella testattujen kliinisten STM-näytteiden manuaalisen testauksen toistettavuus. Kliinisistä kokoelmista

koostuva 20-jäseninen paneeli (10 positiivista ja 10 negatiivista) valmisteltiin yhdistelemällä aiemmin testatut STM-näytteet. Näytteet testattiin 4 replikaateissa jokaisena 5 päivänä yhteensä 20 replikaatille näytettä kohti. Koe suoritettiin käyttäen yhdistettyä koetinseosta, joka koostui High-Risk HPV -koettimesta ja Low-Risk HPV -koettimesta. Kokeen toistettavuuden ei odotettaisi poikkeavan käytettäessä ainoastaan koetinseosta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa. RLU/CO-keskiarvo ja keskiarvon 95 % CI laskettiin (katso alla taulukko 33).

**Taulukko 33. STM-näytteiden toistettavuus – manuaalinen testaus (vähenevässä järjestyksessä RLU/CO-keskiarvon mukaan)**

Näytteen tunnus	RLU/CO-keskiarvo	95 % CI	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
10	3.18	3.02–3.35	100 (20/20)
20	1.43	1.36–1.50	100 (20/20)
11	1.25	1.20–1.28	100 (20/20)
12	1.21	1.15–1.27	100 (20/20)
15	1.20	1.14–1.25	100 (20/20)
13	1.07	1.01–1.11	80 (16/20)
16	1.06	1.01–1.09	75 (15/20)
17	1.04	1.00–1.06	80 (16/20)
14	0.98	0.92–1.02	45 (9/20)
18	0.92	0.87–0.96	20 (4/20)
19	0.72	0.68–0.75	0 (0/20)
7	0.40	0.33–0.46	0 (0/20)
4	0.38	0.35–0.39	0 (0/20)
9	0.37	0.32–0.41	0 (0/20)
1	0.35	0.32–0.36	0 (0/20)
2	0.35	0.31–0.37	0 (0/20)
8	0.32	0.29–0.34	0 (0/20)
3	0.30	0.27–0.31	0 (0/20)
6	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
5	0.26	0.23–0.28	0 (0/20)

Niissä viidessä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, 100 toistoa 100:sta (100,0 %) oli positiivisia. Niissä viidessä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin kokeen raja-arvo, 60 toistoa 100:sta (60 %; 95 % CI = 49,7–69,6) oli positiivisia ja 40 toista 100:sta (40 %) oli negatiivisia. Niissä 10:ssä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % pienempi kuin kokeen raja-arvo, 200 toistoa 200:sta (100 %) oli negatiivisia.

Tulokset osoittavat, että näytteiden, jotka ovat 20 %:ssa tai kauempana raja-arvosta, voidaan odottaa tuottavan yhdenmukaiset tulokset. Raja-arvon läheiset näytteet tuottivat lähestulkoon yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että STM-näytteiden manuaalinen testaus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella tuotti toistettavat tulokset.

#### **Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä.**

Tutkimus suoritettiin tarkoituksena arvioida kokeensisäinen, päivienvälinen ja laboratoriodenvälinen toistettavuus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella testattujen STM-näytteiden automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä. 16-jäseninen paneeli kootuista kliinisistä näytteistä (katso alla taulukko 34) testattiin käyttäen yhtä reagenssierää, kahdesti päivässä 3 eri päivänä. Jokainen paneelin jäsen testattiin nelinkertaisesti.

**Taulukko 34. STM-näytteiden toistettavuus — paneelin koostumus automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä**

Paneelin jäsen	RLU/CO, noin	Odotettu koetulos
1N	<0.4	Negatiivinen
2N	0.4–0.8	Negatiivinen
3P	0.8–1.2	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
4P	0.8–1.2	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
5P	0.8–1.2	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
6P	1.2–2.0	Matala-positiivinen
7P	1.2–2.0	Matala-positiivinen
8P	1.2–2.0	Matala-positiivinen
9P	2.0–5.0	Matala-positiivinen
10P	5.0–10.0	Keskipositiivinen
11N	<0.4	Negatiivinen
12N	<0.4	Negatiivinen
13N	<0.4	Negatiivinen
14XR	Pienen riskin HPV-DNA:n positiivinen kliininen materiaali STM:n kliinisessä negatiivisessa kokoelmassa	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
15XR	Pienen riskin HPV-DNA:n plasmidi STM:n kliinisessä negatiivisessa kokoelmassa	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
16XR	Plasmidivektorin DNA-kontrolli STM:n kliinisessä negatiivisessa kokoelmassa	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen

Kaksi paneelin jäsentä (14XR ja 15XR) sisällytettiin arvioitaessa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen koetinseoksen ristihybridisaation mahdollisuutta ainoastaan pienen riskin HPV-DNA-typpejä 6, 11, 42, 43 ja 44 sisältävien näytteiden kanssa. Paneelin jäsen 16XR koostui pGEM® DNA:sta pitoisuudella 1,49 ng/ml, ja sitä käytettiin paneelin jäsenen 15XR vektorikontrollina. Tämän kokeen tuloksissa ei todettu vääriä positiivisia tuloksia johtuen pienen riskin HPV-DNA-tyyppien esiintymisestä kliinisissä näytteissä. Nämä tulokset ovat yhdenmukaiset manuaalisen testauksen kanssa.

Toistettavuus laskettiin NCCLS E5-A:ssa\* kuvatulla menetelmällä (katso alla taulukko 35). Tämä menetelmä vaatii varianssikomponenttien laskemista jokaiselle variabiliteetin lähteelle: laboratorio, päivä, koekerta ja virhe (määritetty analyysinsisäisenä ja analyysinvälisenä variaationa).



**Taulukko 35. STM-näytteiden toistettavuus — automaattinen testaus RCS-järjestelmässä; kvantitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama				Yhteensä	Kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Kokeiden välillä	Päivien välillä	Laboratorioiden välillä		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P <sup>†</sup>	70	1.95	N/A <sup>‡</sup>	N/A <sup>‡</sup>	N/A <sup>‡</sup>	N/A <sup>‡</sup>	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

<sup>†</sup> Negatiiviset varianssikomponentit asetetaan yhtäsuuriksi nollan kanssa.

<sup>‡</sup> Kaksi epäkelvää replikaattia paneelin jäsenelle 8P estivät varianssikomponenttianalyysin erisuorien ryhmäkokojen vuoksi vertailussa.

<sup>§</sup> Ei tied.: Varianssianalyysi ei ole mahdollinen, koska replikaatteja on vähemmän kuin muita paneelin jäseniä.

## Kliinisten PreservCyt-näytteiden toistettavuus

### Manuaalinen testaus

Toistettavuus PreservCyt-näytteiden manuaalisessa testauksessa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella määritettiin tutkimuksessa, jossa käytettiin 24 mallinäytettä useilla HPV DNA -pitoisuuksilla. Näytteet koostuivat PreservCyt-liuksesta ja valkosoluista, joissa oli ja ei ollut HPV 16 -plasmidia sisältäviä bakteereja.

Näytteet testattiin 4 replikaateissa jokaisena 5 päivänä, tarkoittaen yhteensä 20 replikaattia näytettä kohti. Jokaisena 5 tutkimuspäivänä jokaisesta näytteestä valmistettiin 8 ml:n näyte *digene* HC2 Sample Conversion -kitin ohjeiden mukaisesti, minkä jälkeen näyte testattiin. Keskiarvo ja 95 % CI laskettiin (katso alla taulukko 36).

**Taulukko 36. PreservCyt-näytteiden toistettavuus — manuaalinen testaus manuaalisella näytteen valmistelulla; kvalitatiivinen toistettavuus (vähenevässä järjestyksessä RLU/CO-keskiarvon mukaan)**

Näytteen tunnus	RLU/CO-keskiarvo	95 % CI	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
21	3.51	3.19–3.83	100 (20/20)
12	1.58	1.48–1.69	100 (20/20)
13	1.42	1.32–1.52	100 (20/20)
17	1.38	1.23–1.53	90 (18/20)
18	1.36	1.23–1.48	95 (19/20)
15	1.32	1.16–1.49	85 (17/20)
23	1.17	1.06–1.27	75 (15/20)
16	1.14	1.07–1.20	75 (15/20)
20	1.10	0.96–1.21	85 (17/20)
19	1.06	0.95–1.17	45 (9/19)
22	1.05	0.99–1.10	70 (14/20)
11	1.04	0.96–1.11	65 (13/20)
14	0.94	0.86–1.01	25 (5/20)
24	0.77	0.73–0.81	0 (0/20)
3	0.28	0.25–0.30	0 (0/20)
1	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
7	0.27	0.25–0.30	0 (0/20)
2	0.27	0.25–0.28	0 (0/20)
5	0.26	0.24–0.28	0 (0/20)
4	0.24	0.22–0.25	0 (0/20)
9	0.23	0.21–0.25	0 (0/20)
8	0.22	0.18–0.27	0 (0/20)
10	0.22	0.20–0.25	0 (0/20)
6	0.19	0.17–0.21	0 (0/20)

Niissä kuudessa näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, 114 toistoa 120:stä (95,0%) oli positiivisia. Niissä seitsemässä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin raja-arvo, 88 toistoa 139:stä (63,3 %; 95 % CI = 54,3–70,9) oli positiivisia ja 51 toistoa 139:stä (36,7 %) oli negatiivisia. Niissä neljässä näytteessä, jotka olivat enintään 10 % raja-arvon ylä- tai alapuolella, 41 toistoa 79:stä (51,9 %) oli positiivisia ja 38 toistoa 79:stä (48,1 %) oli negatiivisia. Niissä 11:ssä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % pienempi kuin kokeen raja-arvo, 220 toistoa 220:sta (100 %) oli negatiivisia.

Tulokset osoittavat, että näytteiden, jotka ovat 20 %:ssa tai kauempana raja-arvosta, voidaan odottaa tuottavan yhdenmukaiset tulokset. Raja-arvon läheiset näytteet tuottivat lähestulkoon yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että PreservCyt-näytteiden manuaalinen testaus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella tuottaa toistettavat tulokset.

### **Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä manuaalisella näytteen valmistelulla**

Sisäinen tutkimus automaattisesta testauksesta RCS-järjestelmässä suoritettiin käyttäen kliinisiä PreservCyt-näytteitä, jotka saatiin pääasiassa naisilta, joiden sytologinen tulos oli ASC-US tai ASC-US:ää suurempi (HPV:n esiintyvyys 57 %). Näytteet jaettiin 2 alikvoottiin; kumpikin alikvootti käsiteltiin sitten erikseen *digene* HC2 Sample Conversion -kitillä ja testattiin kaksinkertaisesti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella.

Muiden kvalitatiivisten IVD-kokeiden tavoin variabiliteetti kliinisten näytteiden *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetuloksissa liittyy pääasiassa yhteen tai useampaan seuraavaan tekijään: näytteenotto, näytteen valmistelu ja testaustoimenpide. Koska verratut koetulokset saatiin samasta kliinisestä näytteestä, tutkimusasetelmalla kontrolloitiin näytteenottamisesta johtuvaa variabiliteettia. Toistettavuus tuloksissa, jotka on saatu 2 erikseen valmistellusta näytealiquootista samasta kliinisestä näytteestä (viitataan alla "valmisteltujen alikvoottien välillä") heijastaa variaatiota, joka johtuu näytteen valmistelemisen ja testaustoimenpiteen yhdistelmästä. Toistettavuus näytteissä, jotka on saatu samasta näytealiquootista (viitataan alla "valmistellun alikvoottin sisällä") heijastaa ainoastaan testaustoimenpiteestä johtuvaa variaatiota (katso alla taulukko 37).

**Taulukko 37. PreservCyt-näytteiden toistettavuus — automaattinen testaus RCS-järjestelmässä manuaalisella näytteen valmistelulla; kvalitatiivinen toistettavuus**

Analyysi	Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Yhteensä yhtäpitävyys (%)	
	(n/N) 95 % CI	(n/N) 95 % CI	(n/N) 95 % CI	
Valmistellun alivootin sisällä	Kaikki tiedot	99.62 (261/262)	94.7 (160/169)	97.7 (421/431)
		97.9–100.0	90.1–97.5	95.8–98.9
	Voimakkaan positiiviset ja voimakkaan negatiiviset alueet	100.0 (249/249)	98.2 (160/163)	99.3 (409/412)
	98.5–100.0	94.7–99.6	97.9–99.9	
Valmistellun alivootin välillä	Kaikki tiedot	99.6 (264/265)	98.2 (163/166)	99.1 (427/431)
		97.9–100.0	94.8–99.6	97.6–99.8
	Voimakkaan positiiviset ja voimakkaan negatiiviset alueet	100.0 (249/249)	99.4 (161/162)	99.8 (410/411)
	98.5–100.0	96.6–100.0	98.7–100.0	

Lisätutkimus suoritettiin tarkoituksena arvioida kvantitatiivista toistettavuutta tuloksissa, jotka saatiin simuloitujen PreservCyt-näytteiden automaattisessa testauksessa RCS-järjestelmässä. Tutkimukseen osallistui kolme testauspaikkaa, mukaan lukien QIAGEN.

Jokainen testauslaboratorio suoritti sekä automaattisen RCS-testauksen että manuaalisen testauksen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella kahdesti päivässä 5 eri päivänä toimitetulla 6-jäsenisellä toistettavuuspaneelilla. Jokainen paneelin jäsen koostui viljellyistä soluista, jotka lisättiin PreservCyt-liuokseen tarkoituksena saada likimääräinen RLU/CO-arvo (katso alla taulukko 38).

HPV-DNA-positiiviset paneelin jäsenet valmisteltiin lisäämällä eri määriä HPV-DNA-positiivisia SiHa-soluja (laboratorion solulinjasta). Negatiiviset paneelin jäsenet koostuivat HPV-negatiivisista Jurkat-soluista (eri laboratorion solulinjasta). Jokaisen 6 paneelin jäsenen lopullinen solupitoisuus oli noin  $5 \times 10^4$  solua/ml.

**Taulukko 38. PreservCyt-näytteiden toistettavuus — automaattinen testaus RCS-järjestelmässä manuaalisella näytteen valmistelulla; kvantitatiivisen toistettavuuden paneelin jäsenet**

Paneelin jäsen	Solutyyppi	RLU/CO, noin	Odotettu tulos
1N	Jurkat	<1.0	Negatiivinen
2N	Jurkat	<1.0	Negatiivinen
3P	SiHa ja Jurkat	5.0–8.0	Matala-positiivinen
4P	SiHa ja Jurkat	5.0–8.0	Matala-positiivinen
5P	SiHa	30.0–50.0	Keskipositiivinen
6P	SiHa	200.0	Korkea-positiivinen

Toistettavuus laskettiin NCCLS E5-A:ssa\* kuvatulla menetelmällä (katso alla taulukko 39). Tämä menetelmä vaatii varianssikomponenttien laskemista jokaiselle variabiliteetin lähteelle: laboratorio, päivä, koekerta ja virhe (määritetty analyysinsisäisenä ja analyysinvälisenä variaationa). Kaikki 6 paneelin jäsentä testattiin nelinkertaisesti jokaisella 10 koekerralla (2 koekertaa päivässä 5 testauspäivän aikana) jokaisessa 3 testauslaboratoriossa.

**Taulukko 39. PreservCyt-näytteiden toistettavuus — automaattinen testaus RCS-järjestelmässä manuaalisella näytteen valmistelulla; kvantitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama				Yhteensä	Kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Kokeiden välillä	Päivien välillä	Laboratorioiden välillä		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

\* Negatiiviset varianssikomponentit asetetaan yhtäsuuriksi nollan kanssa.

Tämän ensimmäisen toistettavuustutkimuksen täydentämiseksi tiedoilla näytteistä, jotka olivat hyvin lähellä analyysin raja-arvoa, suoritettiin lisätarkkuustutkimus QIAGENin ulkoisessa testauspaikassa RCS-järjestelmällä.

Paneeli koostui 1 negatiivisesta, 2 negatiivisesta tai matala-positiivisesta sekä 2 matala-positiivisesta jäsenestä. Jokainen paneelin jäsen valmisteltiin lisäämällä viljeltyjä Jurkat- ja SiHa-soluja PreservCyt-liuokseen tarkoituksena saada RLU/CO-kohdearvot (katso alla taulukko 40).

Tässä ulkoisessa testauspaikassa suoritettiin automaattinen testaus RCS-järjestelmällä käyttäen yhtä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koereagenssieriä jokaisella testauskerralla. Koe suoritettiin 2 kertaa päivässä 3 eri päivänä toimitetulla simuloituja PreservCyt-näytteitä sisältävällä 5-jäsenisellä paneelilla. Jokainen paneelin jäsen jaettiin 4 näytteeseen, ja kaikki 4 näytettä testattiin samalla kuoppalevyllä (katso alla taulukko 41).

**Taulukko 40. PreservCyt-näytteiden toistettavuus — automaattinen testaus RCS-järjestelmässä manuaalisella näytteen valmistelulla; kvantitatiivinen toistettavuus lähellä analyysin raja-arvoa olevilla paneelin jäsenillä**

Paneelin jäsen	RLU/CO-arvo, noin	Odotettu tulos
1N	0.2	Negatiivinen
2N	0.8–1.2	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
3P	0.8–1.2	Korkea-negatiivinen / matala-positiivinen
4P	1.2–2.0	Matala-positiivinen
5P	1.2–2.0	Matala-positiivinen

**Taulukko 41. PreservCyt-näytteiden toistettavuus — automaattinen testaus RCS-järjestelmässä manuaalisella näytteen valmistelulla; kvantitatiivinen toistettavuus lähellä analyysin raja-arvoa**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama			Yhteensä	CV (%)
			Kokeen sisällä	Kokeiden välillä	Päivien välillä		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

\* Negatiiviset varianssikomponentit asetetaan yhtäsuuriksi nollan kanssa.

#### Näytteen valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä.

Sisäinen tutkimus näytteiden valmistelusta QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettiin kliinisillä PreservCyt-näytteillä, jotka saatiin naisilta, joiden sytologinen tulos oli jokin seuraavista:

- ASC-US tai suurempi kuin ASC-US
- Negatiivinen intraepiteeliaalisen leesio- tai maligniteetin (NILM) tulos

Jokaisesta potilasnäytteestä otettiin kaksi näytettä. Jokainen näyte valmisteltiin erikseen QIASymphony DSP HPV Media -kitillä, ja tulokset määritettiin käyttäen automaattista testausta RCS-järjestelmällä ja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta.

Muiden kvalitatiivisten IVD-kokeiden tavoin variabiliteetti kliinisten näytteiden *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetuloksissa liittyy pääasiassa yhteen tai useampaan seuraavaan tekijään: näytteenotto, näytteen valmistelu ja testaustoimenpide. Koska verratut koetulokset on saatu samasta kliinisestä näytteestä (viitataan "näytteiden välillä"), tutkimusasetelmalla kontrolloitiin näytteenottamisesta johtuvaa variabiliteettiä. Toistettavuus tuloksissa (katso alla taulukko 42), jotka on saatu 2 erikseen valmistellusta näytteestä samasta kliinisestä potilasnäytteestä, heijastaa variaatiota, joka johtuu näytteen valmistelemisestä ja testaustoimenpiteestä.

**Taulukko 42. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; näytteiden tulosten kvalitatiivinen toistettavuus**

Positiivinen yhtäpitävyys (%)	Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	Kokonaisyhtäpitävyys (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95 % CI	95 % CI	95 % CI
99.0	96.4	97.3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94.3–99.8	92.4–98.3	94.6–98.7

Lisätutkimus suoritettiin tarkoituksena arvioida toistettavuutta tuloksissa, jotka saatiin simuloituista PreservCyt-näytteistä. Näytteet valmisteltiin QIASymphony DSP HPV Media -kitillä, minkä jälkeen ne testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. 8 positiivista paneelin jäsentä valmisteltiin lisäämällä joko HPV DNA -positiivisia SiHa- tai HeLa-soluja HPV DNA-negatiivisiin C-33 A -soluihin PreservCyt-liuoksessa, ja 2 HPV DNA -negatiivista paneelin jäsentä sisälsi ainoastaan HPV DNA -negatiivisia C-33 A -soluja.

Kolme eri käyttäjää testasi samana päivänä paneelin jäsenet 2N, 3E, 5P, 7P ja 9P kolmella eri QIASymphony SP -laitteella ja kolmella eri QIASymphony DSP HPV Media -kittierällä. Paneelin jäsenet 2N, 3E, 5P ja 7P testattiin 18 replikaatissa 3 eri testauskerralla. Näin jokaiselle paneelin jäsenelle saatiin 54 datapistettä. Paneelin jäsen 9P testattiin 16 replikaatissa 3 eri testauskerralla. Tuloksena saatiin 48 datapistettä.

Yksi käyttäjä suoritti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen paneelin jäsenille 1N, 4E, 6P, 8P ja 10P kolmena eri päivänä kolmella eri QIASymphony SP -laitteella ja yhdellä QIASymphony DSP HPV Media -kittierällä. Paneelin jäsenet 1N, 4E, 6P ja 8P testattiin 18 replikaatissa 8 eri testauskerralla. Näin jokaiselle paneelin jäsenelle saatiin 144 datapistettä. Paneelin jäsen 10P testattiin 16 replikaatissa 8 eri testauskerralla. Tuloksena saatiin 128 datapistettä.

Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, 572 tulosta 572 tuloksesta (100,0 %) oli positiivisia. Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin raja-arvo, 98 tulosta 198 tuloksesta (49,5 %) oli positiivisia ja 100 tulosta 198 tuloksesta (50,5 %) oli negatiivisia. Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % raja-arvon alapuolella, 198 tulosta 198 tuloksesta (100,0 %) oli negatiivisia (katso alla taulukko 43).

**Taulukko 43. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä; kvalitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	Solutyyppi	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa ja C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa ja C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa ja C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa ja C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa ja C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa ja C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa ja C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa ja C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Tulokset osoittavat, että näytteiden, jotka ovat 20 %:ssa tai kauempana raja-arvosta, voidaan odottaa tuottavan yhdenmukaiset tulokset. Raja-arvoa lähellä olevat näytteet tuottivat suurinpiirtein yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että PreservCyt-näytteiden valmistelu QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä ja sen jälkeinen testaus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella tuottaa toistettavat tulokset.

Sisäisen tutkimuksen tuloksia käytettiin myös arvioitaessa QIAasymphony DSP HPV Media -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden tulosten kvantitatiivista toistettavuutta (katso alla taulukko 44 ja taulukko 45).



**Taulukko 44. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; kvantitatiivinen toistettavuus samalla käyttäjällä**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama			Arvioitu kokonaisvakiopoikkeama	Arvioitu kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Kokeiden välillä	Yhdistelmien välillä*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

\* QIASymphony SP -laitteiden ja eri päivien yhdistelmien välillä.

**Taulukko 45. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; kvantitatiivinen toistettavuus samana päivänä**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama			Arvioitu kokonaisvakiopoikkeama	Arvioitu kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Kokeiden välillä†			
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86	
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48	
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72	
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73	
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01	

† Testauskerta koostuu QIASymphony DSP HPV Media -kitin, QIASymphony SP -laitteen ja käyttäjän yhdistelmästä

Kvantitatiivinen toistettavuus on hyvin korkea, sillä kaikki CV-arvot ovat alle 25 %. Testauskertojen väliset vakiopoikkeamat ovat verrattavissa vastaaviin testauskertojen sisäisiin arvoihin, mikä osoittaa tulosten olevan yhdenmukaiset käytetystä laitteesta tai kittierästä riippumatta.

#### Näytteen valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä

Sisäinen tutkimus näytteiden valmistelusta QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritettiin kliinisillä PreservCyt-näytteillä, jotka saatiin naisilta, joiden sytologinen tulos oli ASC-US tai NILM. Jokaisesta potilasnäytteestä otettiin kaksi näytettä. Jokainen näyte valmisteltiin erikseen QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä, ja tulokset määritettiin käyttäen automaattista testausta RCS-järjestelmällä ja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta.

Muiden kvalitatiivisten IVD-kokeiden tavoin variabiliteetti klinisten näytteiden *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetuloksissa liittyy pääasiassa yhteen tai useampaan seuraavaan tekijään: näytteenotto, näytteen valmistelu ja testaustoimenpide. Koska verratut koetulokset on saatu samasta kliinisestä näytteestä (viitataan "näytteiden välillä"), tutkimusasetelmalla kontrolloitiin näytteenottamisesta johtuvaa variabiliteettia. Toistettavuus tuloksissa (katso alla taulukko 46), jotka on saatu 2 erikseen valmistellusta näytteestä samasta kliinisestä potilasnäytteestä, heijastaa variaatiota, joka johtuu näytteen valmisteleminen ja testaustoimenpiteestä.

**Taulukko 46. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä; näytteiden tulosten kvalitatiivinen toistettavuus**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI	Kokonaisyhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI
95.3 (101/106) 89.4–98.0	96.7 (176/182) 92.3–98.5	96.2 (277/288) 93.3–97.9

Lisätutkimus suoritettiin tarkoituksena arvioida toistettavuutta tuloksissa, jotka saatiin simuloiduista PreservCyt-näytteistä. Näytteet valmistettiin QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä, minkä jälkeen ne testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella.

Kolme eri käyttäjää suoritti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen eri päivinä käyttäen eri instrumentteja ja eri reagenssieriä 9 -jäsenisellä paneelilla. Jokainen paneelin jäsen testattiin kahdesti 24 eri testauskerralla. Näin jokaiselle paneelin jäsenelle saatiin 48 datapistettä. 8 positiivista paneelin jäsentä valmistettiin lisäämällä joko HPV DNA -positiivisia SiHa- tai HeLa-soluja HPV DNA -negatiivisiin H9-soluihin PreservCyt-liuoksessa, ja HPV DNA -negatiivinen paneelin jäsen sisälsi ainoastaan HPV DNA -negatiivisia H9-soluja.

Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, 237 tulosta 240 tuloksesta (98,8 %) oli positiivisia. Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin raja-arvo, 95 tulosta 144 tuloksesta (66,0 %) oli positiivisia ja 49 tulosta 144 tuloksesta (34,0 %) oli negatiivisia. Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % raja-arvon alapuolella, 48 tulosta 48 tuloksesta (100,0 %) oli negatiivisia (katso alla taulukko 47).

**Taulukko 47. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä; kvalitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	Solutyyppi	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 ja HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 ja HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 ja SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 ja SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 ja HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 ja SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 ja HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 ja SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Tulokset osoittavat, että näytteiden, jotka ovat 20 %:ssa tai kauempana raja-arvosta, voidaan odottaa tuottavan yhdenmukaiset tulokset. Raja-arvoa lähellä olevat näytteet tuottivat suurinpiirtein yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että PreservCyt-näytteiden valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä ja sen jälkeinen testaus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella tuottaa toistettavat tulokset.

Sisäisen tutkimuksen tuloksia käytettiin myös arvioitaessa QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä valmisteltujen PreservCyt-näytteiden tulosten kvantitatiivista toistettavuutta (katso alla taulukko 48).

**Taulukko 48. PreservCyt-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä; kvantitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama				Arvioitu kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Kokeiden välillä	Yhdistelmien välillä*	Arvioitu kokonaisvakiopoikkeama	
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

\* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koesarjojen, QIASymphony DSP AXpH DNA -sarjojen, käytetyn RCS-järjestelmän, käytetyn QIASymphony SP -laitteen ja käyttäjän yhdistelmien välillä.

## Kliinisten SurePath-näytteiden toistettavuus

### Manuaalinen testaus

Toistettavuus postgradienttien SurePath-solupelletinnäytteiden manuaalisessa testauksessa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella määritettiin tutkimuksessa, jossa käytettiin kolmea eri laboratoriota. Testisarjan jäsenten testauksen raja-arvo oli 1,0 RLU/CO. Näytteet testattiin eri päivinä ja eri testausajoissa käyttäen identtisiä testisarjoja näytteillä, joiden HPV-statuksen tiedettiin olevan positiivinen tai negatiivinen. Testisarja koostui 5 positiivisesta, 2 korkeasta negatiivisesta / matalasta positiivisesta ja 5 negatiivisesta näytteestä.

Jokainen paneelin jäsen valmisteltiin yhdistämällä ainutkertaiset kliiniset näytteet, jotka oli otettu SurePath-säilytysnesteeseen ja joiden HPV-statuksen tiedettiin olevan negatiivinen tai positiivinen, tavoiteltujen RLU/CO-kohdearvojen saamiseksi. Jokainen paneelin jäsen testattiin kaksinkertaisesti kahdesti päivässä 5 päivän jaksolla jokaisessa 3 osallistuvassa laboratoriossa (katso alla taulukko 49).

**Taulukko 49. Postgradienttien SurePath-solupelletinäytteiden toistettavuus – manuaalinen testaus; kvalitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	RLU/CO-keskiarvo	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

#### Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä

Automaattisesti RCS-järjestelmässä testattujen postgradienttien SurePath-solupelletinäytteiden tulosten toistettavuutta verrattiin manuaalisessa testauksessa saatuihin tuloksiin. Kaksi erillistä alikvoottia samasta käsittelystä postgradientista SurePath-solupelletinäytteestä (samasta potilasnäytteestä) testattiin (katso alla oleva taulukko 50).

**Taulukko 50. Postgradienttien SurePath-solupelletinäytteiden toistettavuus – automaattinen testaus RCS-järjestelmässä; tulosten yhtäpitävyys RCS-järjestelmässä suoritettuna automaattisen testauksen sekä manuaalisen testauksen välillä**

Positiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI Voimakkaan positiivinen alue		Negatiivinen yhtäpitävyys (%) (n/N) 95 % CI Voimakkaan negatiivinen alue	
Kaikki positiiviset	(RLU/CO ≥2,5)	Kaikki negatiiviset	(RLU/CO <0,80)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

## SurePath-näytteiden valmisteleminen QIASymphony DSP HPV Media -kitillä

Tutkimus suoritettiin tarkoituksena arvioida toistettavuutta tuloksissa, jotka saatiin simuloituista SurePath-näytteistä. Näytteet valmisteltiin QIASymphony DSP HPV Media -kitillä, minkä jälkeen ne testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. 4 positiivista paneelin jäsentä valmisteltiin lisäämällä joko HPV DNA -positiivisia SiHa-soluja HPV DNA -negatiivisiin H-9-soluihin SurePath-säilytysnesteessä, kun taas HPV DNA -negatiivinen paneelin jäsen sisälsi ainoastaan HPV DNA -negatiivisia H-9-soluja SurePath-säilytysnesteessä.

Kolme eri käyttäjää testasi kuutena eri päivänä paneelin jäsenet 1N, 2E, 3P, 4P ja 5P kolmella eri QIASymphony SP -laitteella ja kolmella eri QIASymphony DSP HPV Media -kittierällä. Paneelin jäsenet 1N, 2E, 3P ja 4P testattiin 18 replikaatissa 37 eri testauskerralla. Tuloksena paneelin jäsenille 2E ja 3P saatiin 666 datapistettä ja paneelin jäsenille 1N ja 4P 665 datapistettä. Paneelin jäsen 5P testattiin 16 replikaatissa 37 eri testauskerralla. Tuloksena saatiin 590 datapistettä. Neljä datapistettä hylättiin riittämättömän tilavuuden vuoksi QIASymphony SP -laitteen näytteen valmistelun aikana tekemän merkinnän mukaisesti.

Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, 1921 tulosta 1921 tuloksesta (100,0 %) oli positiivisia. Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin raja-arvo, 410 tulosta 666 tuloksesta (61,6 %) oli positiivisia ja 256 tulosta 666 tuloksesta (38,4 %) oli negatiivisia. Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % raja-arvon alapuolella, 664 tulosta 665 tuloksesta (99,8 %) oli negatiivisia (katso alla taulukko 51).

**Taulukko 51. SurePath-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; kvalitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	Solutyyppi	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa ja H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa ja H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa ja H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa ja H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Tulokset osoittavat, että SurePath-näytteiden, jotka ovat 20 % tai kauempana raja-arvosta, voidaan odottaa tuottavan yhdenmukaiset tulokset. Raja-arvoa lähellä olevat SurePath-näytteet tuottivat likimäärin yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat,

että SurePath-näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä ja sen jälkeinen testaus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella tuottavat toistettavat tulokset.

Sisäisen tutkimuksen tuloksia käytettiin myös arvioitaessa QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettujen SurePath-näytteiden valmistelun tulosten kvantitatiivista toistettavuutta (katso alla taulukko 51).

Kolme eri käyttäjää testasi kuutena eri päivänä paneelin jäsenet 1N, 2E, 3P, 4P ja 5P kolmella eri QIASymphony SP -laitteella ja kolmella eri QIASymphony DSP HPV Media -kittierällä. Paneelin jäsenet 1N, 2E, 3P ja 4P testattiin 18 replikaatissa. Näin jokaiselle paneelin jäsenelle saatiin 162 datapistettä. Paneelin jäsen 5P testattiin 16 replikaatissa, ja sille saatiin 144 datapistettä (katso alla taulukko 52).

**Taulukko 52. SurePath-näytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; kvantitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama				Arvioitu kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Päivien välillä	Yhdistelmien välillä*	Arvioitu kokonaisvakio poikkeama	
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

\* Testauskerta koostuu QIASymphony DSP HPV Media -kitin, QIASymphony SP -laitteen ja käyttäjän yhdistelmästä tietynä päivänä.

Kvantitatiivinen toistettavuus on hyvin korkea, sillä kaikki CV-arvot ovat alle 26 %. Testauskertojen väliset vakio poikkeamat ovat verrattavissa vastaaviin testauskertojen sisäisiin arvoihin, mikä osoittaa tulosten olevan yhdenmukaiset käytetystä laitteesta tai kittierästä riippumatta.

### Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmisteleminen QIASymphony DSP HPV Media -kitillä

Tutkimus suoritettiin tarkoituksena arvioida toistettavuutta tuloksissa, jotka saatiin simuloituista postgraduateista SurePath-solupellettinäytteistä. Näytteet valmisteltiin QIASymphony DSP HPV Media -kitillä, minkä jälkeen ne testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. 70-prosenttisessa SurePath-säilytysnesteessä oleva soluviljelymateriaalia käytettiin jäljittelemään postgraduateja solupellettinäytteitä. 4 positiivista testisarjan jäsentä

valmisteltiin lisäämällä joko HPV DNA -positiivisia SiHa-soluja HPV DNA -negatiivisiin SurePath-säilytysnesteessä oleviin H-9-soluihin, kun taas HPV DNA -negatiivinen testisarjan jäsen sisälsi ainoastaan HPV DNA -negatiivisia H-9-soluja SurePath-säilytysnesteessä.

Neljä eri käyttäjää testasi kuutena eri päivänä testisarjan jäsenet 1, 2, 3, 4 ja 5 kolmella eri QIASymphony SP -laitteella ja kolmella eri QIASymphony DSP HPV Media -kittierällä. Testisarjan jäsenet 1, 2, 3 ja 4 testattiin 18 replikaatilla 37 eri ajossa, millä saatiin 666 datapistettä testisarjan jäsenille 1 ja 3 sekä 665 datapistettä testisarjan jäsenille 2 ja 4. Kaksi datapistettä hylättiin riittämättömän tilavuuden vuoksi QIASymphony SP -laitteen näytteen valmistelun aikana tekemän merkinnän mukaisesti. Testisarjan jäsen 5 testattiin 16 replikaatilla 37 eri ajossa. Tuloksena saatiin 592 datapistettä.

Niissä paneelin jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, 1923 tulosta 1923 tuloksesta (100,0%) oli positiivisia. Niissä testisarjan jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin raja-arvo, 416 tulosta 665 tuloksesta (62,6 %) oli positiivisia ja 249 tulosta 665 tuloksesta (37,4 %) negatiivisia. Niissä testisarjan jäsenissä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % raja-arvon alapuolella, 666 tulosta 666 tuloksesta (100 %) oli negatiivisia (katso alla oleva taulukko 53).

**Taulukko 53. Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; kvalitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	Solutyyppi	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama	CV (%)	Positiivinen koetulos (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa ja H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa ja H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa ja H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa ja H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

Tulokset osoittavat, että postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden, jotka ovat 20 % tai kauempana raja-arvosta, voidaan odottaa tuottavan yhdenmukaiset tulokset. Raja-arvoa lähellä olevat postgradientit SurePath-solupellettinäytteet tuottivat likimäärin yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä ja sen jälkeinen testaus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella tuottavat toistettavat tulokset.



Sisäisen tutkimuksen tuloksia käytettiin myös arvioitaessa QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritetun postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmistelun tulosten kvantitatiivista toistettavuutta.

Neljä eri käyttäjää testasi kuutena eri päivänä testisarjan jäsenet 1, 2, 3, 4 ja 5 kolmella eri QIASymphony SP -laitteella ja kolmella eri QIASymphony DSP HPV Media -kittierällä. Testisarjan jäsenet 1, 2, 3 ja 4 testattiin 18 replikaatilla, jolloin kullekin testisarjan jäsenelle saatiin 162 datapistettä. Testisarjan jäsen 5 testattiin 16 replikaatilla, ja sille saatiin 144 datapistettä (katso alla oleva taulukko 54).

**Taulukko 54. Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden toistettavuus – näytteiden valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä; kvantitatiivinen toistettavuus**

Paneelin jäsen	n	RLU/CO-keskiarvo	Vakio poikkeama				Arvioitu kokonais-CV (%)
			Kokeen sisällä	Päivien välillä	Yhdistelmien välillä*	Arvioitu kokonaisvakiopoikkeama	
1	162	0.12	0.02	0.00	0.01	0.02	19.80
2	162	1.00	0.08	0.02	0.06	0.10	10.27
3	162	4.99	0.37	0.13	0.38	0.55	11.00
4	162	9.78	0.61	0.23	0.54	0.85	8.72
5	144	26.40	2.19	0.70	1.51	2.75	10.41

\* Eri päivien, käyttäjien, QIASymphony DSP HPV Media -kittierien ja QIASymphony SP -laitteiden yhdistelmien välillä.

Kvantitatiivinen toistettavuus on hyvin korkea, sillä kaikki CV-arvot ovat alle 20%. Testauskertojen väliset vakiopoikkeamat ovat verrattavissa vastaaviin testauskertojen sisäisiin arvoihin, mikä osoittaa tulosten olevan yhdenmukaiset käytetystä laitteesta tai kittierästä riippumatta

## Ristireagointi

Joukko naisen anogenitaalialueella yleisesti esiintyviä bakteereita, viruksia ja plasmideja, sekä joukko iholla eläviä HPV-tyyppejä, joista oli käytettävissä klooneja, tutkittiin niiden ristireaktion määrittämiseksi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. Mikro-organismien pitoisuudet analyysissä olivat  $1 \times 10^5$  ja  $1 \times 10^7$  organismia yhtä millilitraa kohti. Virusten ja plasmidien puhdistetun DNA:n analysoitava pitoisuus oli 4 ng/ml.

Alla on luettelo testatuista bakteereista, Kaikkien bakteerien tulos *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa oli negatiivinen:

- *Acinetobacter anitratus*

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

\* Analyysissä analysoitiin sekä plasmidien kasvattamiseen käytetty *E. coli* -kanta (HB101) että *E. coli* klininen isolaatti.

Seuraavat virus- tai plasmidi-DNA:t tai ihmisseerumit testattiin kaikki negatiivisella tuloksella *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella:

- Adenovirus 2
- Sytomegalovirus
- Epstein-Barrin virus
- Hepatiitti B -viruksen pinta-antigeenille positiivinen seerumi
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Immunikatovirus (HIV, RT DNA)
- HPV-tyypit 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 ja 30
- Apinan virus SV40

Ainoa plasmidi, jolla havaittiin ristiin reagointia *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa, oli pBR322. Ristireaktio pBR322:n ja koettimen välillä ei ole yllättävää, sillä kaiken vektori pBR322 DNA:n poistaminen on vaikeaa HPV-inserttiä eristettäessä. pBR322:n homologisten sekvenssien olemassaolo on todettu ihmisen sukupuolielimistä otetuissa näytteissä, ja vääriä positiivisia tuloksia voi ilmetä tilanteissa, joissa mukana on suuria määriä bakteeriperäistä plasmidiainesta. 298 kliinistä näytettä, joiden tulos *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa oli positiivinen, eivät kuitenkaan olleet positiivisia pBR322:n vuoksi pBR322-koettimella suoritettussa kokeessa. Mahdollisuus, että *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen väärä positiivinen tulos aiheutuisi kliinisissä näytteissä olevista pBR322-sekvensseistä, vaikuttaa näin ollen pieneltä.

## Ristihybridisaatio

Kahdeksantoista eri HPV-tyyppiä (korkean riskin ja matalan riskin) tutkittiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella 4 ng/ml HPV DNA -pitoisuuksina. Kaikki korkean riskin HPV-kohteet olivat positiiviset korkean riskin HPV-koettimella. Kokeessa ilmeni myös, että HPV-tyyppien 6 ja 42 ja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen välillä tapahtuu pieni määrä ristihybridisaatiota. . Potilasnäytteet, joissa oli runsaasti (4 ng/ml tai enemmän) HPV 6- tai HPV 42 -DNA:ta, saattavat olla virheellisesti positiiviset *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa. Kliinisesti tässä on merkittävää se, että potilaat, joiden HPV 6- tai HPV 42 -DNA on 4 ng/ml tai suurempi, voidaan tarpeettomasti ohjata kolposkopiaan.

Lisäksi on havaittu, että *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koe reagoi ristiin HPV-tyyppien 40, 53 ja 66 kanssa. Nämä tyypit ovat harvinaisia eikä näyttöä ole tarpeeksi sen osoittamiseksi, että näiden tyyppien tulehduksella ja korkean asteen sairauden kehittymisen välillä olisi eksakti korrelaatio (15). Myös kirjallisuudessa on raportoitu, että kompleksiset, tässä kokeessa käytetyt

kaltaiset koettimet saattavat antaa väärä positiivisia tuloksia siksi, että niillä on ristihybridisaatiota HPV-tyyppien 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 tai MM9 kanssa (35). Vaikka useat näistä HPV-tyypeistä ovat harvinaisia tai uuden tyyppisiä, jollaisia ei usein havaita korkean asteen sairaudessa, voidaan kolposkopiaan ohjata väärin perustein potilaita, joiden näytteissä on runsaasti näitä HPV DNA -tyyppejä.

## Veren ja muiden aineiden vaikutus STM-näytteisiin

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa arvioitiin veren ja muiden potentiaalisesti häiritsevien, määritelyjen tai määrittelemättömien aineiden vaikutusta. Kokoverta, emätinhuuhteluainetta, voidemaista sienilääkettä ja ehkäisygeeliä (aineita, joita voidaan yleisesti havaita kohdunkaulanäytteissä) lisättiin STM-negatiivisiin ja -positiivisiin näytteisiin (kliininen näytepooli ja ei-kliiniset näytteet) sellaisina pitoisuuksina kuin niitä voi ilmetä kohdunkaulanäytteissä.

Yhtään väärää positiivista tulosta ei havaittu näiden neljän aineen kohdalla millään pitoisuudella. Mutta väärä negatiivinen tulos saatettiin raportoida kliinisissä näytteissä, joissa HPV DNA:n määrät olivat lähellä analyysin raja-arvoa (1 pg/ml), jos näytteissä esiintyi runsaasti voidemaista sienilääkettä tai ehkäisygeeliä. On kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että kliininen näyte koostuisi lähes kokonaan jostain näistä aineista, sillä kohdunkaula puhdistetaan rutiininomaisesti ennen papa-näytteen ottoa sekä HPV-testausta varten.

## Veren ja muiden aineiden vaikutus PreservCyt-näytteisiin

### Manuaalinen näytteen valmistelu

*digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa arvioitiin kliinisissä PreservCyt Solution -näytteissä mahdollisesti ilmenevän veren ja muiden potentiaalisesti häiritsevien, määritelyjen tai määrittelemättömien aineiden vaikutusta. Kokoverta, emätinhuuhteluainetta, voidemaista sienilääkettä ja ehkäisygeeliä (aineita, joita voidaan yleisesti havaita kohdunkaulanäytteissä) lisättiin PreservCyt-liuoksen negatiivisiin ja positiivisiin kliinisiin näytepooleihin sellaisina pitoisuuksina kuin niitä saattaa ilmetä kohdunkaulanäytteissä. Yhtään väärää positiivista tai väärää negatiivista tulosta ei havaittu näiden neljän aineen kohdalla millään pitoisuudella. Lisäksi joidenkin kliinisten näytteiden sisältämät niille ominaiset aineet eivät inhiboi HPV DNA:n detekointia *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa.

### Näytteen valmistelu QIASymphony DSP HPV Media -kitillä

Veren ja muiden mahdollisesti häiritsevien aineiden vaikutusta PreservCyt-näytteisiin arvioitiin QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelluissa näytteissä, jotka testattiin automaattisesti

RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella. Seuraavien potentiaalisesti häiritsevien aineiden vaikutusta testattiin:

- Voidemainen sienilääke
- Voidemainen tulehduslääke
- Veri
- Ehkäisygeeli
- Emätinhuuhteluaine
- Hajustetut emätinpuikot
- Liukastusgeeli
- Spermidisi

Jokaista ainetta lisättiin negatiivisiin ja positiivisiin kliinisiin näytepooleihin. Millään aineella ei havaittu vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia pitoisuuksilla, joita saattaa löytyä kohdunkaulanäytteistä. Väärä negatiivinen tulos saatettiin kuitenkin raportoida kliinisissä näytteissä, joissa HPV DNA:n määrät olivat lähellä kokeen raja-arvoa, jos näytteissä esiintyi runsaasti voidemaista sienilääkettä, emättimen liukastusgeeliä tai verta. On kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että kliininen näyte koostuisi lähes kokonaan jostain näistä aineista, sillä kohdunkaula puhdistetaan rutiininomaisesti ennen papa-näytteen ottoa sekä HPV-testausta varten..

#### Näytteen valmistelu QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä

Kokoveren vaikutusta PreservCyt-näytteissä arvioitiin käyttäen näytteen valmisteluun QIASymphony DSP AXpH DNA -kittiä ja testaukseen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta. Nähtävästi verta sisältävät kliiniset näytteet valittiin ja testattiin käyttäen näytteelle sekä manuaalista valmistelumenetelmää että automaattista valmistelumenetelmää QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä. Tuloksia verrattiin 238 näytteelle. Kokonaisyhtäpitävyys oli 94,12%, ja McNemarin p-arvo oli 0,2850. Tämä osoittaa, että manuaalisen näytteen valmistelumenetelmän ja automaattisen QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritettujen valmistelun välillä ei ole tilastollisesti merkittäviä eroja kliinisessä toimivuudessa.

Seuraavien potentiaalisesti häiritsevien aineiden vaikutusta testattiin:

- Emätinhuuhteluaine
- Voidemainen sienilääke
- Ehkäisygeeli
- Perifeeriset mononuklearisolut (PBMC)
- Liukastusgeeli

- Hygieniasuihke
- Spermidisi
- Magneettiset hiukkaset
- TopElute-neste

Kaikkia aineita lisättiin negatiivisiin ja positiivisiin solukokoelmiin pitoisuuksilla, joita saattaa löytyä kohdunkaulanäytteistä tai joita on saatettu lisätä näytteen valmistelun aikana. Minkään aineen ja pitoisuuden osalta ei todettu vääriä positiivisia tuloksia. Vääriä negatiivisia tuloksia ei todettu ehkäisygeeliä lukuun ottamatta. Älä ota PreservCyt-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP AXpH DNA -kitillä suoritettavaa automaattista näytteen valmistelua varten, jos näytteenottoaikassa on ehkäisygeeliä.

## Veren ja muiden aineiden vaikutus SurePath-näytteisiin

### SurePath-näytteiden valmisteleminen QIASymphony DSP HPV Media -kitillä

Veren ja muiden mahdollisesti häiritsevien aineiden vaikutusta SurePath-näytteisiin arvioitiin QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelluissa näytteissä, jotka testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella.

- Voidemainen sienilääke
- Voidemainen tulehduslääke
- Veri
- Ehkäisygeeli
- Emätinhuuhteluaine
- Hajustetut emätinpuikot
- Liukastusgeeli
- Spermidisi

Jokaista ainetta lisättiin negatiivisiin ja positiivisiin kliinisiin näytepooleihin. Millään aineella ei havaittu vääriä positiivisia tuloksia pitoisuuksilla, joita saattaa löytyä kohdunkaulanäytteistä.

Vääriä negatiivisia tuloksia ei todettu seuraavia aineita lukuun ottamatta:

- Ehkäisygeeli aiheutti vääriä negatiivisia tuloksia hyvin pienissä pitoisuuksissa.
- Jos näyte sisältää runsaasti voidemaista sienilääkettä, väärä negatiivinen tulos saatetaan raportoida kliinisissä näytteissä, joissa HPV DNA:n määrät olivat lähellä kokeen raja-arvoa. On kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että kliininen näyte koostuisi lähes kokonaan voidemaisesta sienilääkkeestä, sillä kohdunkaula puhdistetaan rutiininomaisesti ennen Papanäytteen ottoa sekä HPV-testausta varten.

Älä ota SurePath-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettavaa automaattista näytteen valmistelua varten, jos näytteenottoaikassa on ehkäisyvaahtoa tai voidemaista sienilääkettä.

Älä ota SurePath-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettavaa automaattista näytteen valmistelua varten, jos näytteenottoaikassa on ehkäisyvaahtoa tai voidemaista sienilääkettä.

## Postgradienttien SurePath-solupellettinäytteiden valmisteleminen QIASymphony DSP HPV Media -kitillä

Veren ja muiden mahdollisesti häiritsevien aineiden vaikutusta postgradientteihin SurePath-solupellettinäytteisiin arvioitiin QIASymphony DSP HPV Media -kitillä valmistelluissa näytteissä, jotka testattiin automaattisesti RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella.

Seuraavien potentiaalisesti häiritsevien aineiden vaikutusta testattiin:

- Voidemainen sienilääke
- Voidemainen tulehduslääke
- Veri
- Ehkäisygeeli
- Emätinhuuhteluaine
- Hajustetut emätinpuikot
- Liukastusgeeli
- Spermidiisi

Jokaista ainetta lisättiin negatiivisiin ja positiivisiin kliinisiin näytepooleihin, jotka käsiteltiin sen jälkeen BD PrepMate -järjestelmällä postgradientin solupellettinäytteen jäljittämiseksi. Sekä veren että voidemaisen sienilääkkeen tapauksessa havaittiin yksi virheellisesti positiivinen tulos, mutta tilastollisessa analyysissä ei huomattu merkittäviä häiriöitä. Millään muulla aineella ei havaittu vääriä positiivisia tuloksia pitoisuuksilla, joita saattaa löytyä kohdunkaulanäytteistä.

Voidemaisen sienilääkkeen, voidemaisen tulehduslääkkeen ja ehkäisyvaahdon osalta havaittiin virheellisesti negatiivisia tuloksia. Älä ota SurePath-kohdunkaulanäytettä QIASymphony DSP HPV Media -kitillä suoritettavaa automaattista näytteen valmistelua varten, jos näytteenottoaikassa on voidemaista sienilääkettä, voidemaista tulehduslääkettä tai ehkäisyvaahtoa.

## Siirtyminen

RCS-järjestelmän tarkoituksena on minimoida näytteiden kontaminoituminen tai jäljelle jääneiden alkaliesten fosfataasien siirtyminen käyttämällä kertakäyttökärkiä reagenssien ja näytteiden

aspirointiin. Tämän vahvistamiseksi QIAGEN suoritti useita tutkimuksia tarkoituksena arvioida sitä, lisääkö RCS-järjestelmän käyttö näytteiden siirtymisen tai ristikontaminaation riskiä manuaaliseen menetelmään verrattuna. Siirtymispotentiaalia järjestelmästä järjestelmään arvioitiin useilla RCS-järjestelmillä.

Yhdessä tutkimuksessa negatiiviseen kontrollimateriaaliin lisättiin 2 ng ja 20 ng HPV-DNA-plasmidia korkea-positiivisten STM-näytteiden valmistelua varten. 20 ng/ml:n pitoisuudella saadut RLU-arvot olivat noin 3–5 kertaa korkeampia kuin rutiininomaisessa kliinisessä testauksessa odotettu suurimman positiivisen kliinisen näytteen vastaava arvo. Nämä simuloitua korkea-positiiviset näytteet asetettiin kuoppalevyn kuoppiin tammipelilautakuvion mukaan vuorotellen ainoastaan negatiivista kontrollia sisältävien kuoppien kanssa (testikuopat). Tämä malli ottaa huomioon sekventiaalisten korkeasti positiivisten näytteiden mahdolliset additiiviset vaikutukset. Kuoppalevyt testattiin sitten sekä manuaalisella että RCS-järjestelmässä suoritettulla automaattisella testauksella. Väärän positiivisten testikuoppien määrää verrattiin testauksen jälkeen. RCS-järjestelmässä suoritettu automaattinen testaus ei tuottanut enempää vääriä positiivisia testikuoppia kuin manuaalinen testaus näillä simuloituilla STM-näytteillä, vaikka kuoppalevy sisälsi erittäin suuren sekvenssin positiivisia näytteitä.

Toisessa siirtymisen arvioinnissa HPV-positiivisen potilaan PreservCyt-näytteet yhdistettiin tarkoituksena luoda paneeli eri kemiluminesenssitasoisista näytteistä. Näin haluttiin saada RLU/CO-arvot, jotka vastaisivat rutiininomaisessa RCS-järjestelmällä suoritettussa automaattisessa testauksessa odotettavissa olevaa vaihteluväliä. Positiivisten näytteiden vaihteluväli oli noin 200–1800 RLU/CO. Siirtymispotentiaalain sekä sekventiaalisesti korkeiden positiivisten mahdollisten additiivisten vaikutusten arviointia varten nämä positiiviset paneelin jäsenet asetettiin kuoppalevyille tammilautakuvion mukaisesti negatiivisten kontrollikuoppien viereen. Nämä levyt testattiin sitten RCS-järjestelmässä suoritettulla automaattisella testauksella.

Arvioinnista, jossa käytettiin koottuja potilasnäytteitä, saadut tulokset viittaavat siirtymisvaikutuksista johtuvia mahdollisia vääriä positiivisia tuloksia olevan 0,3 % käytettäessä automaattista testausta RCS-järjestelmässä *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen kanssa.

QIAGENin kokemus kootuilla PreservCyt-näytteillä suoritetuista testeistä viittaa siihen, että kootuista PreservCyt-potilasnäytteistä saatujen näytteiden ominaisuudet eivät vastaa yksittäisten potilasnäytteiden ominaisuuksia. Vaikka kokoamisen vaikutuksia RCS-järjestelmässä suoritettua automaattisen testauksen siirtymispotentiaaliin ei tunneta, RCS-järjestelmässä suoritettua automaattisen testauksen esikliininen lisättestaus ei osoittanut siirtymisestä johtuvien väärin positiivisten näytteiden potentiaalain lisääntyneen. Arvioinnit suoritettiin keinotekoisilla plasmidinäytteillä, joiden DNA-pitoisuudet olivat lähes 5 kertaa korkeammat kuin kliinisessä ympäristössä havaitut pitoisuudet.



Kolmannessa siirtymisen arvioinnissa luotiin koenäytteet lisäämällä fluoresoivaa väriä pitoisuuksilla, jotka edustivat analyysin dynaamista RLU-vaihteluväliä, taustamatriiseihin, jotka olivat lähellä kliinisten näytteiden viskositeettia ja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen reagensseja. Koenäytteet käsiteltiin sitten 3 eri RCS-järjestelmässä. Siirtymispotentialiaali arvioitiin kaikkien seuraavien tärkeiden RCS-järjestelmän toimenpidevaiheiden osalta:

- näytteen siirtäminen
- siirto levytä levyille
- koettimen lisääminen
- kuoppalevyn ravistaminen
- kuoppalevyn huuhtelu.

Fluoresenssi mitattiin 485 nm:n heräteallonpituudella ja 535 nm:n emissioallonpituudella. Se oli riittävän herkkä detekoimaan siirtymistapahtuman arvolla 1:20 000, mikä vastaa värien positiivisten tulosten arvoa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeessa (ts. 1 pg / 20 ng). Arvioinnin tulokset eivät osoittaneet siirtymistä missään tärkeässä RCS-järjestelmän toimenpidevaiheessa siten, että seurauksena olisi väärä positiivinen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tulos.

## Reagenssien stabiliteetti laitteessa

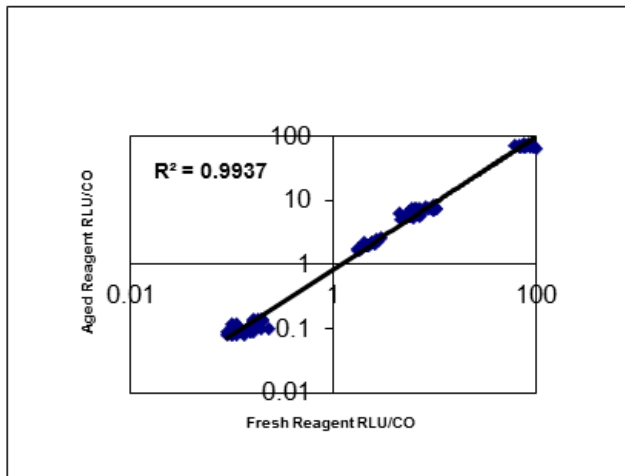
QIAGEN arvioi RCS-järjestelmässä suoritettujen automaattisten testauksen suoritusominaisuuksia, kun reagenssit jätettiin järjestelmään pidemmäksi ajaksi. Reagensseja, jotka todennäköisimmin jätettiin pidemmäksi ajaksi järjestelmään, olivat mm. koetinseos, DR1, DR2 ja sieppauskuoppalevy.

Kokeen toimivuus arvioitiin käyttäen sekä juuri valmistettuja reagensseja että reagensseja, joiden oli annettu olla RCS-järjestelmässä huoneenlämpötilassa 16 tuntia (tämä simuloi 2 työvuorota laboratoriossa). Simuloitujen kliinisten näytteiden testaus suoritettiin 2 RCS-järjestelmässä kumpanakin 2 testauspäivänä määritetyllä reagenssimatriisilla (katso alla taulukko 55).

**Taulukko 55. Tutkimusasetelma järjestelmään jätettyjen reagenssien stabiliteetille**

RCS-järjestelmä	Päivä 1	Päivä 2
1	Vanhat reagenssit	Uudet reagenssit
2	Uudet reagenssit	Vanhat reagenssit

Alla olevassa kuvassa 3 esitetään kaavio kaikista RLU/CO-datapisteistä. Vanhojen ja uusien reagenssien kaavio ja regressioanalyysi osoittavat yhtäpitävyyden vanhojen ja uusien reagenssien välillä.



**Kuva 3. Sirontakaavio, jossa verrataan analyysin kalibraattorin ja kontrollin arvoja vanhojen ja uusien reagenssien välillä.**

Yhtäpitävyytulosten lisätarkastelu osoittaa, että kvalitatiiviset tulokset eivät muuttuneet käytettäessä vanhoja reagensseja (katso alla taulukko 56).

**Taulukko 56. Yhtäpitävyys uusien ja vanhojen reagenssien välillä**

Tilastollinen suure	Tulos
Kokonaisyhtäpitävyys (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
95 % CI	97.97–100.0
Positiivinen yhtäpitävyys (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
95 % CI	97.97–100.0
Negatiivinen yhtäpitävyys (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
95 % CI	97.97–100.0
R <sup>2</sup>	0.9937
Kaltevuus	0.97
Leikkaus	0.47
Kappa	1.0

---

Datan analyysi osoittaa, että uusien ja vanhojen reagenssien tulokset ovat tilastollisesti identtiset. Tämän perusteella reagenssit ovat riittävän stabiileja, kun niitä säilytetään laitteessa enintään 16 tuntia.

## Viitteet

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

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

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










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

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



# Symbolit

Näissä käyttöohjeissa käytetään seuraavan taulukon merkintöjä.

Symbol	Symbol definition
 96	Sisältö riittää 96 kokeeseen
 384	Sisältö riittää 384 kokeeseen
	In vitro diagnostinen lääkinällinen laite
	Tuotenumero
	Valmistaja
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisön alueella
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Noudata käyttöohjeita
	Maailmanlaajuinen kauppanimikkeiden yksilöintinumero (GTIN)

# Vianetsintä

## Huomautuksia ja ehdotuksia

### Denaturaation aikana on havaittu väärä värimuutos tai ei lainkaan värimuutosta.

- a) DNR on valmisteltu väärin. Tarkista, että DNR sisältää osoitinväriä ja on väriltään tumman violetti.
- b) DNR:ää ei ole lisätty. Mittaa näytteen tilavuus ja varmista, että näytteeseen lisättiin DNR:ää (tulisi olla 1,5 ml). Jos määrän perusteella ilmenee, että DNR:ää ei lisätty, lisää oikea määrä, sekoita ja suorita analyysi, mikäli oikea värimuutos havaitaan.
- c) Näytteissä on verta tai muita materiaaleja, jotka estävät värimuutokset havaitsemisen. Tarkkaa värimuutosta ei odoteta tämän tyyppisten näytteiden kohdalla; ei vaikuta heikentävästi koetuloksiin.
- d) Näytteen pH saattaa olla epätavallisen hapan. Mikäli muuta syytä ei löydy, näytteet voivat olla epätavallisen happamia, jolloin odotettua värimuutosta ei tapahdu. Koska näytteen väärä pH heikentää koetuloksia, ota uusi näyte ennen kohdunkaulan etikkahappokäsittelyä.

### Laaduntarkkailut antavat väärä tuloksia.

- a) Kokeeseen on valittu väärä ohjelmistoprotokolla. Jos kokeessa on käytetty väärää analyysiprotokollaa, lue kuoppalevy uudelleen 30 minuutin kuluessa DR2:n lisäämisestä oikeaa analyysiprotokollaa käyttäen
- b) QC1-LR ja QC2-HR on sijoitettu väärässä järjestyksessä. Testaa näytteet uudelleen.
- c) HRC:n ja QC2-HR:n käänteinen sijainti. Testaa näytteet uudelleen.

## Huomautuksia ja ehdotuksia

### Hybridisoitaessa havaittu väärä värimuutos.

- a) Koetinseoksen riittämätön sekoittuminen denaturoituihin kalibraattoreihin, laatukontrolliin ja/tai näytteisiin; tai koetinseosta ei ole lisätty; tai reagenssia on lisätty virheellinen määrä. Ravista hybridisaatiokuoppalevyä tai mikroputkitelinettä lisää kahden minuutin ajan. Mikäli vielä on violetin värisiä putkia tai kaivoja, lisää 25 µl oikeaa koetinseosta ja sekoita hyvin. Jos koetinseoksen lisäämisen ja uudelleen sekoittamisen jälkeen ei tapahdu oikeaa värimuutosta ja jos näytteessä ei ollut verta tai muita materiaaleja, testaa näyte uudelleen.
- b) Näytteissä on verta tai muita aineita, jotka estävät värimuutoksen havaitsemisen. Tarkkaa värimuutosta ei odoteta tämän tyyppisten näytteiden kohdalla; ei vaikuta heikentävästi koetuloksiin.
- c) Näytteen STM-määrä <1000 µl. Tarkista alkuperäisen näytteen määrä. Näytettä tulee olla 1425 ±20 µl (kun on otettu 75 µl koetta varten). Jos määrä on <1425 µl, alkuperäisen näytteen sisältämä STM-määrä oli <1000 µl. Hanki uusi näyte.

### Kokeen analyysin validointi epäonnistuu. Signaalia ei havaita positiivisissa kalibraattoreissa, laadunvalvonnoissa eikä näytteissä.

- a) Koetinta ei ole lisätty koettimen laimentimeen. Valmista koetinseos pakkausselosteen ohjeiden mukaisesti. Varusta putket huolellisesti tunnistusmerkinnällä.
- b) Valmistamisen aikana on tapahtunut koettimen RNase-kontaminaatio. Käytä koettimen pipetointiin aerosolilta suojattuja kertakäyttöpipettikärkiä ja käytä käsineitä. Valmista koetinseos steriilissä säiliössä. Käytä vain puhtaita uusia kertakäyttöisiä reagenssialtaita.
- c) Koetinseoksen riittämätön sekoittuminen. Kun koetinta on lisätty koettimen laimentimeen, sekoita perusteellisesti vorteksoimalla suurella nopeudella vähintään viiden sekunnin ajan. Näkyvän nestepörteen pitää muodostua.
- d) Laimennetun koettimen ja denaturoidun näytteen riittämätön sekoittaminen. Lisää koetinseosta ja näytettä jokaiseen hybridisaatiokuoppalevyn kuoppaan tai hybridisaatiomikroputkeen ja ravista 3 minuuttia (± 2 min) Rotary Shaker I -laitteessa 1100 rpm:llä (± 100 rpm). Tarkista, että väri kussakin kuopassa ja putkessa muuttuu

## Huomautuksia ja ehdotuksia

- violetista keltaiseksi.
- e) Väärä aika tai lämpötila hybridisaatiovaiheessa. Hybridisoi 60 ± 5 minuuttia 65 °C:n (± 2 °C) lämpötilassa. Tarkista Microplate Heater I -laitteen tai vesihauteen lämpötila. Varmista, että Microplate Heater I tai vesihaude on säädetty lämmittämään näytteet oikeaan lämpötilaan ja että laitetta esilämmitetään 60 minuutin ajan ennen käyttöä. Varmista, että vesihauhteessa on sopivasti vettä näytteiden saattamiseksi oikeaan lämpötilaan. Vesihauhteet tulee kalibroida määräajoin.
- f) Riittämätön sekoittuminen sieppausvaiheen aikana. Ravista Rotary Shaker I -laitteessa 60 minuuttia (±5 min) 20–25 °C:n lämpötilassa näissä käyttöohjeissa kuvatulla tavalla. Verifioi Rotary Shaker I -laitteen nopeus kalibroimalla. (Katso Rotary Shaker I Käyttöopas (*Rotary Shaker I User Manual*)).
- g) Lisätty väärä annos DR1:tä tai inkuboitu aika ei ole ohjeiden mukainen. Pipetoi 75 µl DR1:tä kuhunkin kuoppaan 8-kanavaisella pipetillä. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 30–45 minuuttia.
- h) Ei lisätty oikeaa määrää DR2:tä tai inkuboitu määritettyä aikaa. Pipetoi 75 µl DR2:tä kuhunkin kuoppaan 8-kanavaisella pipetillä. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15–30 minuuttia.
- i) DML-laitteen toimintahäiriö tai virheellinen ohjelmointi. Katso lisätietoja kyseisen DML-laitteen käyttöoppaasta ja ohjelmiston käyttöoppaasta tai ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palvelupisteeseen.

### **Kohonneet RLU-arvot kalibraattoreissa, laatukontrollissa ja/tai näytteissä (≥200 RLU useissa tai kaikissa kuopissa). Analyysi ei ehkä läpäise validointikriteereitä.**

- a) DNR:ää ei lisätty; tai on lisätty virheellinen määrä reagenssia; tai DNR on sekoitettu riittämättömästi näytteiden, kalibraattorien tai laatukontrollien kanssa. Verifioi ennen DNR:n lisäämistä, että sarja-annostelija annostelee oikein. Kalibroidut pipetit ovat perusehto. Lisää puoli tilavuutta DNR:ää kuhunkin putkeen ja sekoita hyvin. Väärin positiivisten tulosten välttämiseksi varmista, että neste huuhtoo putken koko sisäpinnan. Kalibraattorien, laatukontrollien ja näytteiden pitää muuttua violeteiksi DNR:n lisäämisen jälkeen.

### Huomautuksia ja ehdotuksia

- b) DML-laitteessa on valovuoto. Ovi ei ole tiivis. Oven tiiviste on vaurioitunut. Tarkista DML-laitteen taustaluku (raakatietomittaus) lukemalla tyhjä kuoppalevy. Lukema, joka on yli 50 RLU, viittaa valovuotoon. Katso lisätietoja kyseisen DML-laitteen käyttöoppaasta tai ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palvelupisteeseen.
- c) DR2 tai sieppauskuoppalevyn kuopat ovat kontaminoituneet DR1:n tai eksogeenisen alkalisen fosfataasin kanssa. Katso "DR2:n kontaminaation tarkastus", sivu 129.
- d) Kontaminoitunut pesupuskuri. Katso "Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus", sivu 130.
- e) Kontaminoitunut Automated Plate Washer. Katso "Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus", sivu 130.
- f) Sieppauskuoppalevyn kuoppien riittämätön pesu DR1:n inkuboinnin jälkeen. Pese sieppauskuoppalevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta tulvilleen tai käyttämällä Automated Plate Washer -laitetta. Pesun jälkeen kuoppalevyn kuopissa ei saa näkyä jäämiä vaaleanpunaisesta nesteestä. Katso lisätietoja kontaminaation tai toimintahäiriöiden testauksesta Automated Plate Washer Käyttöopas (*Automated Plate Washer User Manual*).
- g) DR1:n aiheuttama kuoppalevyn kuoppien kontaminaatio. Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaat ja kuivat. Käsittele DR1:tä varoen. Suojaa aerosoleilta.
- h) Hybridisaatioliuosta on kuivattu Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan nukkaamattoman paperipyyhkeen aiemmin käytettyyn kohtaan. Älä kuivaa hybridisaatioliuosta Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan nukkaamattoman paperipyyhkeen aiemmin käytettyyn kohtaan.
- i) Kuivaamiseen on käytetty vääränlaisia pyyhkeitä. Käytä kuivaamiseen Kimtowels-pyyhkeitä tai vastaavia nukkaamattomia paperipyyhkeitä.

## Huomautuksia ja ehdotuksia

**Alhainen PC/NC-suhdeluku tai paljon heikosti positiivisia näytteitä, joissa suhde on <2,0 (>20 %). Analyysi ei ehkä läpäise validointikriteereitä.**

- a) Näytteen puutteellinen valmistelu. Lisää oikea määrä DNR:ää ja sekoita perusteellisesti vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi varmista, että neste huuhtoo putken koko sisäpinnan. Varmista PreservCyt-näytteissä, että solupelletin perusteellinen sekoitus ja uudelleensuspensio on valmis ennen denaturoinnin inkubaatiota. Näytteen värin on muututtava selvästi kirkaasta tummanvioletiksi. Inkuboi 65 °C:n ( $\pm 2$  °C) lämpötilassa 45 minuuttia ( $\pm 5$  min).
- b) Koetinseoksen riittämätön sekoittuminen tai koetinseosta on testeissä lisätty liian vähän. Valmista koetinseos ohjeiden mukaisesti. Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla. Varmista, että syntyy näkyvä nestepyörre. Koetinseosta on lisättävä putkiin positive displacement -pipetillä tai monikanavaisella pipetillä tarkan annostelun varmistamiseksi.
- c) Riittämätön määrä laimennettua koetinta lisätty hybridisaatiomikroputkiin tai kuoppalevyn kuoppiin. Varmista ennen koetinseoksen lisäämistä, että 8-kanavainen pipetti annostelee tarkasti. Lisää 25  $\mu$ l koetinseosta kuhunkin denaturoituja kalibraattoreita, laatuksentrolleja ja näytteitä sisältävään mikroputkeen tai kuoppalevyn kuoppaan. Lisäämisen ja perusteellisen sekoittamisen jälkeen värin pitää muuttua tummanvioletista keltaiseksi. PreservCyt-näytteiden pitää muuttua keltaisen sijasta vaaleanpunaisiksi.
- d) Ei DR1-aktiivisuutta. Säilytä DR1 2–8 °C:n lämpötilassa. Käytä ennen viimeistä käyttöpäivämäärää.
- e) Puutteellinen sieppaus. Käytä sieppausvaiheessa Rotary Shaker I -laitetta, jonka nopeudeksi säädetään 1100 rpm ( $\pm 100$  rpm). Validoi ravistimen nopeus kalibroimalla.
- f) Riittämätön pesu. Pese kuoppalevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta tulvilleen tai käyttämällä Automated Plate Washer -laitetta.
- g) Kontaminoitunut pesupuskuri. Katso "Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus", sivu 130.

**Sarja positiivisia näytteitä, joiden RLU-arvot ovat suunnilleen samat.**

## Huomautuksia ja ehdotuksia

- |  |   |
|--|---|
| a) Sieppauskuoppalevyn kuoppien kontaminoituminen kokeen aikana. | Peitä sieppauskuoppalevy aina inkubointien ajaksi. Vältä putkien altistamista aerosolikontaminaatiolle analyysin aikana. Käytä toimenpiteiden aikana puuterittomia käsineitä.   |
| b) DR2:n kontaminoituminen.                                      | Varo, ettei aine kontaminoidu pipetoitaessa DR2:ta sieppauskuoppalevyn kuoppiin. Estä DR2:n kontaminoituminen DR1:n aerosoleilla tai laboratoriopölyllä jne.  |
| c) Automated Plate Washer - laitteen toimintahäiriö.             | Katso "Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus", sivu 130, tai katso lisätietoja kontaminaation tai toimintahäiriöiden testauksesta Automated Plate Washer Käyttöopas ( <i>Automated Plate Washer User Manual</i> ). |

### Suuret CV-erot toistoissa.

- |  |  |
|--|--|
| a) Epätarkka annostelu.  | Tarkista, että pipetti annostelee toistettavia määriä. Kalibroi pipetit säännöllisesti.  |
| b) Riittämätön sekoittuminen.  | Sekoita perusteellisesti kaikissa vaiheissa. Vorteksoi ennen ja jälkeen denaturoinnin inkubaation sekä koetinseoksen lisäämisen jälkeen. Varmista näkyvän nestepöyrtteen syntyminen. |
| c) Liian vähän nestettä siirretty hybridisaatiomikroputkista tai hybridisaatiokuoppalevyn kuopista sieppauskuoppalevyn kuoppiin. | Huolehdi nestettä hybridisaatiokuoppalevyltä tai -mikroputkista sieppauskuoppalevylle siirtäessäsi, että siirretyt määrät ovat toistettavia.   |
| d) Väärät pesuolosuhteet.  | Pese kuoppalevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta tulvilleen tai käyttämällä Automated Plate Washer -laitetta.                     |
| e) Kuoppalevyn kuoppien kontaminoituminen DR1:llä.   | Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaat ja kuivat. Käsittele DR1:tä varoen. Suojaa aerosoleilta.  |

## Huomautuksia ja ehdotuksia

### Negatiivisiksi tiedetyistä näytteistä on saatu väärän positiiviset tulokset

- a) DR2 on kontaminoitunut. Varo, etteivät näytteet kontaminoidu ristiin siirtäessäsi DR2:ta näytteiden välillä. Jos käytät yhdistelmävalmisteesta vain osaa, ota kokeeseen tarvittava määrä puhtaaseen kertakäyttöiseen reagenssikäiliöön ennen pipetin täyttämistä.
- b) Kuoppalevyn kuoppien kontaminoituminen DR1:llä. Pese kuoppalevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta tulvilleen tai käyttämällä Automated Plate Washer -laitetta. Pesun jälkeen kuoppalevyn kuopissa ei saa näkyä jäämiä vaaleanpunaisesta nesteestä.
- c) Kuivattu Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan nukkaamattoman paperipyyhkeen aiemmin käytettyyn kohtaan. Älä kuivaa aiemmin käytettyyn kohtaan.
- d) Riittämätön näytteen valmistelu. Lisää oikea määrä DNR:ää ja sekoita perusteellisesti vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi varmista, että neste huuhtoo putken koko sisäpinnan. Varmista PreservCyt-näytteiden manuaalisen valmistuksen tapauksessa, että solupelletin perusteellinen sekoitus ja uudelleensuspensio on valmis ennen denaturoinnin inkubointia. Katso lisätietoja *digene* HC2 Sample Conversion -kitin käyttöohjeesta.
- Näytteen värin on muututtava selvästi kirkaasta tummanvioletiksi. Inkuboi  $65 \pm 2$  °C:n lämpötilassa  $45 \pm 5$  minuuttia. SurePath-näytteiden manuaalisen valmistuksen tapauksessa näytteitä on inkuboitava  $90 \pm 5$  minuuttia  $65 \pm 2$  °C:n lämpötilassa.
- e) Väärät pesuolosuhteet. Pese kuoppalevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta tulvilleen tai käyttämällä Automated Plate Washer -laitetta.
- f) Pipetinkärjen kontaminoituminen denaturoimattomasta. Näytteen käsittelytoimenpiteen denaturointivaihe on suoritettava näiden käyttöohjeiden mukaisesti. Näytteen väärä vorteksointi, putken kääntäminen ylösalaisin ja



### Huomautuksia ja ehdotuksia

aineesta siirrettäessä denaturoitu näyte hybridisaatiossa käytettyyn mikroputkeen tai käytetylle kuoppalevyille.

putken ravistaminen voivat aiheuttaa kohdunkaulanäytteille endogeenisten epäspesifien RNA-DNA-hybridien epätäydellisen denaturoinnin. Erityisesti PreservCyt-liuosnäytteitä tai SurePath-säilytysnestettä käytettäessä näitä hybridejä esiintyy todennäköisesti näytteen denaturointiputken sisäseinämällä. Jotta tämä denaturoimaton soluaines ei siirtyisi näytteeseen, pipetin kärki ei saa koskettaa näytteen denaturointiputken seinämiä siirrettäessä denaturoitua näytettä HPV-koettimen hybridisaatiossa käytettyyn mikroputkeen tai kuoppalevyn kuoppaan.

#### Kohonneet NC RLU -arvot (>200 RLU). Analyysin loppuosassa suoritus odotetun mukainen.

- a) DR2:ta inkuboitiiin yli 20–25 °C:n lämpötilassa. Suorita koe uudelleen ja varmista, että sieppaus- ja detekointivaiheet inkuboidaan 20–25 °C:n lämpötilassa.
- b) DR2:ta inkuboitiiin yli 30 minuuttia. Lue kuoppalevy 15 minuutin kuluttua inkubaatiosta (viimeistään 30 minuutin kuluttua inkubaatiosta) 20–25 °C:n lämpötilassa.
- c) DR2 tai pesupuskuri kontaminoitui alkalisen fosfataasin tai DR1:n kanssa. Katso "DR2:n kontaminaation tarkastus", sivu 129, tai "Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus", sivu 130.

#### Kokeen analyysin validointi epäonnistuu. Kohonnut $\overline{PCX}/\overline{NCX}$ -suhde.

HRC:n ja QC2-HR:n käänteinen sijainti.

Testaa näytteet uudelleen. Lue tarkasti kalibraattorin ja laatukontrollin putkien etiketit, jotta reagensseja ei aseteta käänteisesti.

#### DR2:n kontaminaation tarkastus

1. Pipetoi 75 µl alikvoitua, jäljelle jäänyttä tai alkuperäisessä injektiopullossa olevaa DR2:ta tyhjään sieppauskuoppalevyn kuoppaan.

**Huomautus:** DR2:n testaus kolmena kappaleena tuottaa optimaalisen suorituskyvyn arvioinnin.

2. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta.
3. Mittaa kuoppalevyn kuopat DML-laitteella.

DR2:n kontrollin on oltava <50 RLU.

Jos DR2-arvot ovat <50 RLU, DR2:ta voidaan käyttää arvion toistamiseen.

Jos kontaminoitunut (>50 RLU), ota käyttöön uusi pakkaus ja toista koe.

#### Pesulaitteen ja/tai vesilähteen kontaminaation tarkastus

1. Merkitse kuopat 1–4. Pipetoi 75 µl DR2:ta neljään erilliseen sieppauskuoppalevyn kuoppaan.  
Kuoppa 1 on DR2:n kontrolli.
2. Pipetoi 10 µl pesupuskuria pesuainepullosta kuoppalevyn kuoppaan 2.
3. Anna pesupuskurin virrata pesuputken läpi. Pipetoi 10 µl pesupuskuria letkusta kuoppalevyn kuoppaan 3.
4. Ota alikvootti vedestä, jota käytettiin pesupuskurin valmisteluun. Pipetoi 10 µl vettä kuoppalevyn kuoppaan 4.
5. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta.
6. Mittaa kuoppalevyn kuopat DML-laitteella.

DR2:n kontrollin (kuoppa 1) on oltava <50 RLU.

Vertaa RLU-arvoa kuopissa 2, 3 ja 4 DR2:n kontrollin RLU-arvoon. Kuoppien 2, 3 ja 4 RLU-arvot eivät saa ylittää DR2-kontrollin RLU-arvon 50 RLU:ta.

Arvot, jotka ylittävät DR2-kontrollin 50 RLU:ta, merkitsevät kontaminaatiota. Katso pesulaitteen pesu- ja kunnossapito-ohjeet kohdasta "Manuaalinen pesumenetelmä", sivu 55.

#### Automated Plate Washer -laitteen kontaminaation tarkastaminen

1. Merkitse kuopat 1–5. Pipetoi 75 µl DR2:ta viiteen erilliseen sieppauskuoppalevyn kuoppaan.  
Kuoppa 1 on DR2:n kontrolli.
2. Pipetoi 10 µl pesupuskuria levypesurin pesuainepullosta kuoppalevyn kuoppaan 2.
3. Pipetoi 10 µl huuhtelunestettä levypesurin huuhtelupullosta kuoppalevyn kuoppaan 3.
4. Paina levypesurin näppäimistön **Prime** (Esikäsitteily) -näppäintä, jolloin pesupuskuri virtaa letkujen läpi. Pipetoi 10 µl pesupuskuria syvennyksestä kuoppalevyn kuoppaan 4.

5. Paina levypesurin näppäimistön **Rinse** (Huuhtelu) -näppäintä, jolloin huhteluneste virtaa letkujen läpi. Pipetoi 10 µl pesupuskuria syvennyksestä kuoppalevyn kuoppaan 5.
6. Peitä ja inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta.
7. Mittaa kuoppalevyn kuopat DML-laitteella.

DR2:n kontrollin (kuoppa 1) on oltava <50 RLU.

Vertaa RLU-arvoa kuopissa 2, 3, 4 ja 5 DR2:n kontrollin RLU-arvoon. Kuoppien 2, 3, 4 ja 5 RLU-arvot eivät saa ylittää DR2-kontrollin RLU-arvon 50 RLU:ta.

Arvot, jotka ylittävät DR2-kontrollin 50 RLU:ta, merkitsevät levypesurin kontaminaatiota.

Katso lisätietoja dekontaminaatioon liittyvistä toimenpiteistä Automated Plate Washer Käyttöoppaasta (Automated Plate Washer User Manual).

## Yhteystiedot

Käytä koekitin mukana toimitettua QIAGENin yhteystietolomaketta ottaessasi yhteyttä oman alueesi QIAGEN-edustajaan.

---

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi

---

Tämä sivu on jätetty tarkoituksella tyhjäksi

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

Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

Tämä tuote ja sen käyttömenetelmä on suojattu yhdellä tai useammalla seuraavista patenteista:

Hybrid Capture -tekniikka on suojattu eurooppalaisella patentilla nro O 667 918, joka on rekisteröity Itävallassa, Belgiassa, Sveitsissä, Liechtensteinissä, Saksassa, Tanskassa, Espanjassa, Ranskassa, Isossa-Britanniassa, Kreikassa, Irlannissa, Italiassa, Luxemburgissa, Alankomaissa ja Ruotsissa.

Yhdysvaltalainen Hybrid Capture -patentti

6,228,578B1

Yhdysvaltalaiset HPV-patentit

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

© 2012–2015 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

---

Ordering [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Technical Support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)