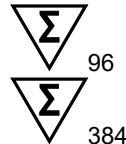


Prosinac 2018.

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



IVD

In vitro ispitivanje za hibridizaciju nukleinskih kiselina s amplifikacijom signala primjenom kemiluminiscencije mikrotitar pločica za kvalitativno otkrivanje DNK 13 visokorizičnih tipova humanog papilomavirusa (HPV) u cervikalnim i vaginalnim ispitcima

Za uporabu uz:

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



REF

5197-1330 (komplet s 1 pločicom)
618111 (komplet s 4 pločice)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
SAD

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
NJEMAČKA

1058538HR Rev. 13

Sadržaj

Namjena.....	8
Sažetak i objašnjenje	9
Informacije o patogenu	10
Načelo postupka	10
Priprema uzoraka s pomoću QIASymphony SP	12
Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	12
Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	13
Testiranje primjenom sustava Rapid Capture System	13
Uključeni materijali	15
Komplet s 1 pločicom	15
Komplet s 4 pločice	15
Sadržaj kompleta	16
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni	17
Oprema i materijali za in vitro dijagnostiku	17
Oprema i materijali za opću laboratorijsku uporabu	18
Dodatna oprema i materijali za pripremu uzoraka PreservCyt	19
Dodatna oprema i materijali za pripremu uzoraka SurePath	19
Upozorenja i mjere opreza	20
Upozorenja	20
Ispitci	20
Natrijev azid	21
Buffer N2	21
Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS	21
Izjave o sigurnosti i rizicima za komponente	22
Mjere opreza	23
Pohrana i rukovanje reagensima	24
Komponente kompleta	24

Pripremljeni reagensi	24
Uzimanje i priprema ispitaka	25
Cervikalni i vaginalni ispitci u transportnom mediju za ispitke	25
Cervikalni bioptati.....	26
Cervikalni ispitci u otopini PreservCyt Solution	26
Cervikalni ispitci u tekućini SurePath Preservative Fluid.....	27
Automatizirana priprema uzoraka za ispitke SurePath.....	28
Automatizirana priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath.....	28
Ručna priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath	28
Postupak	30
Priprema reagensa	30
Denaturacijski reagens.....	32
Denaturacijski reagens 2.....	33
Mješavina probe.....	33
Pufer za ispiranje.....	35
Izrada rasporeda pločica.....	36
Priprema uzoraka.....	38
Priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	38
Priprema uzoraka za ispitke SurePath i ispitke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	39
Priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	39
Ručna priprema uzoraka za ispitke PreservCyt	39
Ručna priprema uzoraka za ispitke postgradijentnog staničnog taloga SurePath	40
Denaturacija i hibridizacija uzoraka pripremljenih s pomoću instrumenta QIASymphony SP.....	41
Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i eluata DNK za ručno testiranje	42
Opcionalna točka zaustavljanja eluata DNK.....	43
Hibridizacija eluata DNK.....	43

Denaturacija i hibridizacija ispitaka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath	44
Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u transportnom mediju za ispitke	44
Opcionalna točka zaustavljanja pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath	46
Hibridizacija pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath	47
Hibridizacija s pomoću mikrotitar pločice i grijača Microplate Heater I	47
Hibridizacija s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji	49
Hvatanje hibrida	50
Otkrivanje hibrida	52
Ispiranje	53
Metoda automatiziranog uređaja za ispiranje pločica	53
Metoda ručnog ispiranja	54
Amplifikacija signala	55
Mjerenje mikrotitar pločice za hvatanje i generiranje rezultata	55
Tumačenje rezultata	56
Rezultati testiranja ispitaka u transportnom mediju za ispitke	56
Rezultati testiranja ispitaka SurePath	56
Rezultati testiranja ispitaka PreservCyt	56
Vrijednost RLU/CO blizu 1,0	57
Drugi tipovi HPV-a	57
Provjera kalibracije ispitivanja	57
Negativni kalibrator	57
Pozitivni kalibrator	58
Srednja vrijednost pozitivnog kalibratora / srednja vrijednost negativnog kalibratora	58
Izračun granične vrijednosti	58
Kontrole kvalitete	59
Ograničenja	60
Radne značajke	62

Kliničke radne značajke prilikom probira pacijenata s normalnim rezultatima papa testa kao pomoć pri procjeni rizika za skrb o pacijentima	62
Kliničke radne značajke prilikom probira pacijenata s rezultatima papa testa ASC-US (neodređenog značenja) za utvrđivanje potrebe za upućivanjem na kolposkopiju	66
Klinička osjetljivost i specifičnost za utvrđivanje rizika od bolesti visokog stupnja u žena čiji rezultati papa testa pokazuju LSIL ili HSIL	69
Radne značajke za vaginalno ili samostalno prikupljene ispitke	72
Analitička osjetljivost	73
Ekvivalencija između vrsta ispitaka	74
Ekvivalencija između ispitaka u transportnom mediju za ispitke i ispitaka PreservCyt	74
Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt i pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	74
Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt i pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	75
Ekvivalencija između ispitaka u transportnom mediju za ispitke i ručne pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath	75
Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath i pripreme uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	76
Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath i pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	77
Podudaranje između metoda testiranja	78
Obnovljivost	81
Sveukupna obnovljivost ručnog testiranja	81
Obnovljivost s kliničkim ispitcima u transportnom mediju za ispitke	82
Obnovljivost kliničkih ispitaka PreservCyt	85
Obnovljivost kliničkih ispitaka SurePath	96
Križna reaktivnost	102
Križna hibridizacija	103
Učinak krvi i drugih tvari na ispitke u transportnom mediju za ispitke	104

Učinak krvi i drugih tvari na ispitke PreservCyt	104
Ručna priprema uzoraka	104
Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	105
Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	105
Učinak krvi i drugih tvari na ispitke SurePath	106
Priprema uzoraka za uzorke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	106
Priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit	107
Prijenos	108
Stabilnost reagensna na sustavu	109
Reference	111
Simboli	116
Vodič za rješavanje problema	117
Provjera DR2 na kontaminaciju	127
Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode	127
Provjera kontaminacije automatiziranog uređaja za ispiranje pločica	128
Kontaktne podaci	129
Značajne izmjene	130

Namjena

Za *in vitro* dijagnostičku (IVD) uporabu.

Ispitivanje *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s tehnologijom Hybrid Capture® 2 (HC2) ispitivanje je za hibridizaciju nukleinskih kiselina s amplifikacijom signala primjenom kemiluminiscencije mikrotitar pločica za kvalitativno otkrivanje DNK 13 visokorizičnih tipova HPV-a u cervikalnim i vaginalnim ispitcima.

Cervikalni i vaginalni ispitci koji se mogu ispitivati testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test uključuju sljedeće:

- Cervikalni ispitci koje s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device prikuplja liječnik
- Vaginalni ispitci samostalno prikupljeni s pomoću *digene* HC2 DNA Collection Device
- Ispitci prikupljeni biopsijom u *digene* Specimen Transport Medium (STM)
- Ispitci prikupljeni metlicom za uzimanje uzoraka ili kombinacijom četkice/špatule za uzimanje uzoraka koji su potom postavljeni u PreservCyt Solution ili SurePath Preservative Fluid

Uporaba ovog testa indicirana je za sljedeće:

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

Sažetak i objašnjenje

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

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

Prije se HPV tipove 16 i 18 smatralo visokorizičnim tipovima i povezivalo ih se s rakom (8-10). Pokazalo se da su HPV tipovi 31, 33 i 35 posredno povezani s rakom (2, 11 – 14). Ta posredna povezanost nastaje zbog činjenice da se ti tipovi češće otkrivaju u slučaju skvamozne intraepitelne neoplazije visokog stupnja nego u slučaju raka. Stoga je induciranje raka zbog prisutnosti tih tipova virusa manje vjerojatno nego u slučaju prisutnosti DNK visokorizičnih tipova HPV-a (15). Tih 5 tipova HPV-a zajedno čine oko 73 % infekcija HPV-om (16, 17). Dodatni tipovi HPV-a, uključujući tipove 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68, identificirani su kao glavni tipovi HPV-a koje je moguće otkriti u preostalim lezijama (17–27). Ti se tipovi HPV-a također mogu kategorizirati u skupine srednjeg i visokog rizika na temelju njihove relativne distribucije u različitim kategorijama histopatoloških dijagnoza (16, 17, 24–28).

Pokazalo se da je DNK HPV-a prisutan u približno 10 % žena s normalnim cervikalnim epitelom, ali na stvarnu prevalenciju u specifičnim skupinama žena iznimno utječu dob i druge demografske varijable (2, 10, 16, 29). Prospektivna su ispitivanja pokazala da su se u 15 – 28 % žena s pozitivnim testom na DNK HPV-a unutar 2 godine razvile skvamozne intraepitelne lezije (SIL) u usporedbi sa svega 1 – 3 % žena čiji su rezultati testa na DNK HPV-a bili negativni (30, 31). Točnije, rizik od progresije za tipove HPV-a 16 i 18 bio je veći (približno 40 %) nego za druge tipove HPV-a (30).

Informacije o patogenu

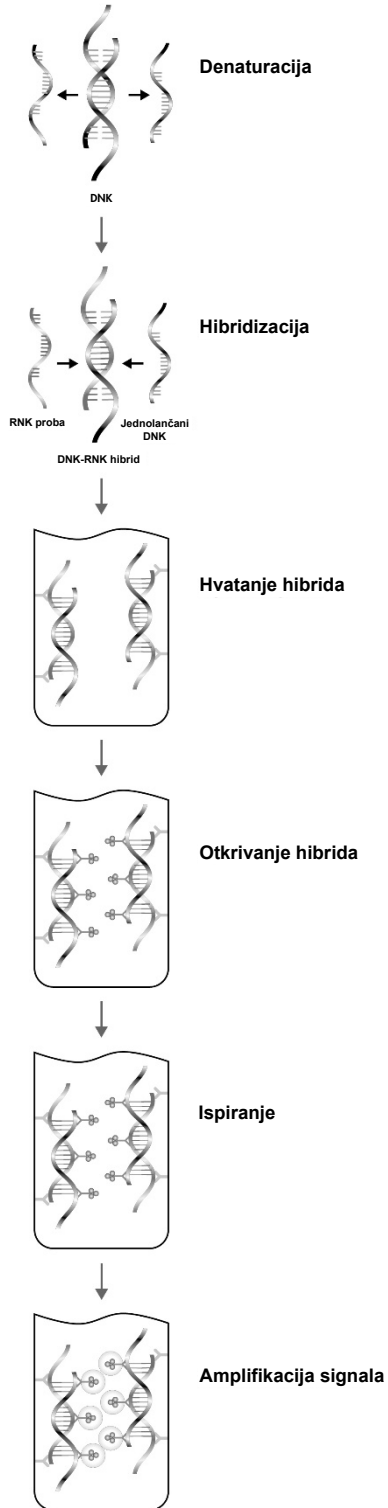
Humani papilomavirusi sastoje se od čestice ikozahedralnog virusa (viriona) koji sadržava dvolančanu kružnu molekulu DNK s 8000 baznih parova okruženu proteinskom kapsidom. Nakon infekcije epitelnih stanica virusni DNK uspostavlja se cijelom debljinom epitela, ali netaknuti virioni mogu se pronaći samo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

Načelo postupka

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test s tehnologijom HC2 ispitivanje je za hibridizaciju nukleinskih kiselina s amplifikacijom signala koje se koristi otkrivanjem s pomoću kemiluminiscencije mikrotitar pločica. Ispitci koji sadržavaju ciljani DNK hibridiziraju se s pomoću specifičnih RNK proba za HPV. Rezultirajući RNK-DNK hibridi hvataju se na površinu jažice mikrotitar pločice obložene protutijelima specifičnima za RNK-DNK hibride. Imobilizirani hibridi zatim reagiraju s protutijelima konjugiranim s alkalnom fosfatazom specifičnima za RNK-DNK hibride te ih se otkriva s pomoću kemiluminiscentnog supstrata. Nekoliko molekula alkalne fosfataze konjugira se na svako protutijelo. Više konjugiranih protutijela veže se na svaki uhvaćeni hibrid, što rezultira znatnom amplifikacijom signala. Kako vezana alkalna fosfataza cijepa supstrat, emitira se svjetlost, koju instrument *digene* Microplate Luminometer (DML) mjeri kao relativne svjetlosne jedinice (Relative Light Units, RLU). Intenzitet emitirane svjetlosti označuje prisutnost ili odsutnost ciljnog DNK u ispitku.

Mjerenje RLU-a jednako ili više od granične vrijednosti ispitivanja (Cutoff, CO) naznačuje prisutnost sekvenci DNK visokorizičnog HPV-a u ispitku. Mjerenje RLU-a niže od CO-a ispitivanja naznačuje odsutnost testiranih specifičnih sekvenci DNK visokorizičnog HPV-a ili razine DNK HPV-a ispod granice detekcije testa.

Tijek rada Hybrid Capture



Priprema uzoraka s pomoću QIASymphony SP

Automatizirana priprema uzoraka za ispitke PreservCyt može se provesti s pomoću instrumenta QIASymphony SP uporabom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit ili QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Komplet QIASymphony DSP HPV Media Kit pruža ekstrakte uzorka na mikrotitar pločici za hibridizaciju koji su spremni za automatizirano testiranje primjenom sustava Rapid Capture® System (RCS) s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Instrument QIASymphony SP provodi sve korake postupka pripreme uzoraka za maksimalno 88 uzoraka, u serijama od maksimalno 24 uzorka tijekom jednog postupka.

Instrument QIASymphony SP obrađuje 88 uzoraka PreservCyt u 2 sata i 15 minuta bez potrebe za intervencijom korisnika nakon što se uzorci postave na instrument.

Instrument QIASymphony SP obrađuje 88 uzoraka SurePath u 1 sat i 45 minuta bez potrebe za intervencijom korisnika nakon što se uzorci postave na instrument. Nakon pripreme uzoraka s pomoću instrumenta QIASymphony SP odmah slijedi 90-minutna inkubacija ekstrakata uzoraka u mikrotitar pločici za hibridizaciju na grijaču mikrotitar pločica. Tijekom inkubacije ekstrakata uzoraka kalibratori i kontrole kvalitete denaturiraju se odvojeno u vodenoj kupelji, a zatim se nakon završetka inkubacije ekstrakata uzoraka ručno pipetiraju u prvu kolonu mikrotitar pločice za hibridizaciju. Priprema uzoraka za ispitke SurePath s pomoću instrumenta QIASymphony SP i kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit može se provesti prije početka citološke obrade ili nakon njezina završetka.

Važno: Ekstrakti uzoraka dobiveni kao rezultat pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt i SurePath primjenom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit mogu se testirati isključivo s pomoću sustava RCS. Ručna provedba testa s ekstraktima uzoraka nije odobrena.

Prilikom provedbe automatizirane pripreme uzoraka s pomoću instrumenta QIASymphony osim ovih uputa za uporabu pogledajte važeće korisničke priručnike za instrument QIASymphony i *Upute za uporabu za QIASymphony DSP HPV Media Kit (Priručnik)* za potrebne informacije o postupcima i opise.

Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Komplet QIASymphony DSP AXpH DNA Kit pruža eluate DNK na mikrotitar pločici za hibridizaciju koji su spremni za ručno testiranje ili automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS i test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Instrument QIASymphony SP provodi sve korake postupka pripreme uzoraka za maksimalno 88 uzoraka, u serijama od maksimalno 24 uzorka tijekom jednog postupka. Instrument QIASymphony SP obrađuje 88 uzoraka u 4 sata i 30 minuta bez potrebe za intervencijom korisnika nakon što se uzorci postave na instrument.

Prilikom provedbe automatizirane pripreme uzoraka s pomoću instrumenta QIASymphony osim ovih uputa za uporabu pogledajte važeće korisničke priručnike za instrument QIASymphony i *Priručnik za QIASymphony DSP AXpH DNA Kit* za potrebne informacije o postupcima i opise.

Testiranje primjenom sustava Rapid Capture System

Testiranje s velikim protokom uzoraka s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test može se provesti s pomoću sustava RCS. Komplet s 4 pločice (kat. br. 618111) može se upotrebljavati samo sa sustavom RCS i ne može se upotrebljavati za ručno testiranje.

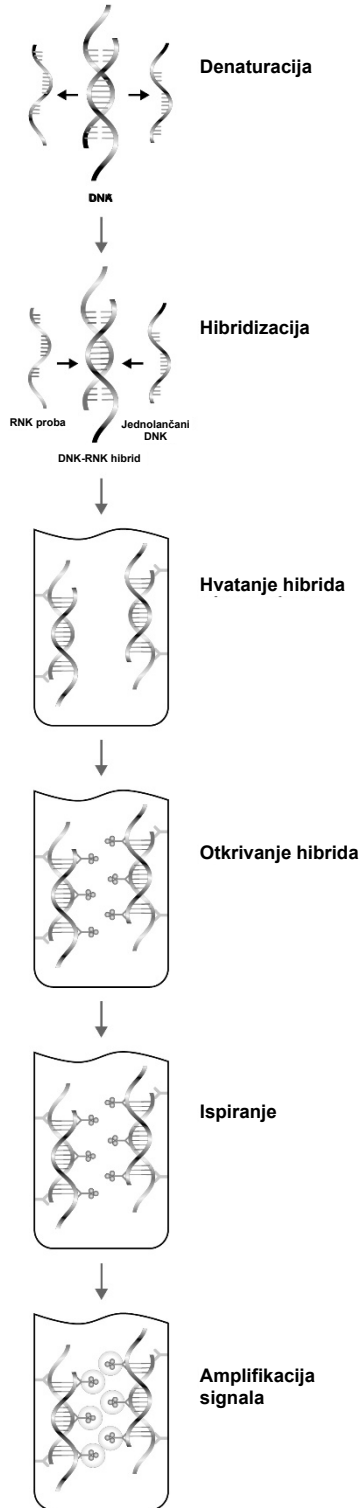
Sustav RCS sustav je za automatizirano pipetiranje i razrjeđivanje za opću uporabu koji se može upotrebljavati s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za testiranje s velikim protokom uzoraka. Taj sustav obrađuje do 352 ispitka u 8 sati, uključujući 3,5-satno razdoblje tijekom kojeg nije potrebna intervencija korisnika; u 13 sati moguće je generirati rezultate za do 704 ispitka.

Priprema uzoraka izvodi se neovisno o sustavu RCS prije postavljanja na platformu sustava RCS. Osim toga, otkrivanje kemiluminiscentnog signala i izvještavanje o rezultatima provode se s pomoću izvanmrežnog DML instrumenta koji je zajednički i ručnom testiranju i automatiziranom testiranju s pomoću sustava RCS.

Svaki korak testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test provodi se jednakim redoslijedom kao i ručno testiranje. Sustav RCS omogućuje raspoređenu obradu do 4 mikrotitar pločice, pri čemu svaka mikrotitar pločica sadržava uzorke te kalibratore i kontrole kvalitete potrebne za test.

Prilikom provedbe automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS osim ovih uputa za uporabu pogledajte *Korisnički priručnik za Rapid Capture System* te *Korisnički priručnik za Rapid Capture System — provedba testa digene HC2 DNA Tests primjenom uzoraka obrađenih instrumentom QIASymphony SP* za potrebne informacije o postupku i opise.

Tijek rada Hybrid Capture



Ručna priprema uzoraka

Automatizirano na sustavu Rapid Capture System

Uključeni materijali

Komplet s 1 pločicom

U testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s 1 pločicom (kat. br. 5197-1330) nalazi se 96 testova.

Prilikom provedbe ručnog testiranja s pomoću kompleta s 1 pločicom, najmanji broj testova koji se preporučuje tijekom svake uporabe jest 24. Ako želite provesti manje od 24 testova po uporabi, ukupan broj testova po kompletu može se smanjiti zbog ograničenih volumena reagensa. Broj rezultata pacijenata varirat će ovisno o broju uporaba po kompletu, kako je navedeno u nastavku:

Broj uporaba	Broj rezultata pacijenata
1	88
2	80
3	72
4	64

Prilikom provedbe automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS i kompleta s 1 pločicom, uporaba cijelog kompleta zahtijeva ispitivanje cijele mikrotitar pločice (88 uzoraka) po postupku sustava RCS. Testiranje dijela mikrotitar pločice je prihvatljivo; međutim, upotrebljava se cijeli komplet zbog praznog volumena potrebnog za rad instrumenta.

Komplet s 4 pločice

U testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s 4 pločice (kat. br. 618111) nalaze se 384 testa.

Komplet s 4 pločice može se upotrebljavati samo za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS. Za postizanje 384 testiranja, komplet s 4 pločice mora se upotrijebiti u 1 ili 2 postupka sustava RCS. Ako želite provesti više od 2 postupka, ukupan broj testova po kompletu može se smanjiti zbog ograničenih volumena reagensa.

Sadržaj kompleta

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Kataloški broj	5197-1330	618111
Broj testova	96	384
Indicator Dye (Indikatorska boja) sadržava 0,05 % (w/v) natrijeva azida	0,35 ml	2,0 ml
Denaturation Reagent (Denaturacijski reagens)* Razrijeđena otopina natrijeva hidroksida (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent (Diluens za probe)* Puferirana otopina s 0,05 % (w/v) natrijeva azida	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (Proba za visokorizične tipove HPV-a) RNK proba za tipove HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 u puferiranoj otopini (crveni čep)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Kontrola kvalitete za niskorizične tipove HPV-a) 5 pg/ml (500.000 kopija/ml) kloniranog DNK HPV-a tipa 6 i nosač DNK u transportnom mediju za ispitke koji sadržava 0,05 % (w/v) natrijeva azida.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Kontrola kvalitete za visokorizične tipove HPV-a) 5 pg/ml (500.000 kopija/ml) kloniranog DNK HPV-a tipa 16 i nosač DNK u transportnom mediju za ispitke koji sadržava 0,05 % (w/v) natrijeva azida	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negativni kalibrator) Nosač DNK u transportnom mediju za ispitke koji sadržava 0,05 % (w/v) natrijeva azida	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Kalibrator (Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a) 1 pg/ml kloniranog DNK HPV-a tipa 16 i nosač DNK u transportnom mediju za ispitke koji sadržava 0,05 % (w/v) natrijeva azida	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Mikrotitar pločica za hvatanje) Obložena kozjim poliklonskim anti-RNK–DNK hibrid protutijelima	1	4
Detection Reagent 1 (Detekcijski reagens 1) Protutijela konjugirana s alkalnom fosfatazom na RNK-DNK hibride u puferiranoj otopini koja sadržava 0,05 % (w/v) natrijeva azida	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Detekcijski reagens 2) CDP-Star® with Emerald II (kemiluminiscentni supstrat)	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate (Koncentrat pufera za ispiranje)* Sadržava 1,5 % (w/v) natrijeva azida	100 ml	2 x 100 ml

* Pogledajte „Upozorenja i mjere opreza”, stranica 20, za informacije o zdravlju i sigurnosti.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Važno: Provjerite jesu li instrumenti koji se upotrebljavaju u ovome postupku pregledani i kalibrirani prema preporukama proizvođača.

Oprema i materijali za in vitro dijagnostiku

Kod proizvođača QIAGEN dostupni su samo oprema i materijali odobreni za uporabu s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

- Sustav *digene* Hybrid Capture 2 System („*digene* HC2 System”), koji se sastoji od luminometra koji je odobrila tvrtka QIAGEN („DML instrument”), osobnog računala i perifernih uređaja koje je odobrila tvrtka QIAGEN (monitor, tipkovnica, miš, pisač i kabel pisača), softvera *digene* HC2 System Software („softver za analizu ispitivanja *digene*”), protokola *digene* HC2 System Assay Protocols za HPV, softvera LumiCheck Plate Software i *Korisničkog priručnika za sustav digene HC2 System*
- 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 (opcionalno)*
- Conversion Rack and Lid (opcionalno)*
- *digene* Specimen Rack and Lid (opcionalno)*
- Pipeta i stalak EXPAND-4 (opcionalno)†
- Dozator folije za prekrivanje epruveta i uređaj za rezanje (opcionalno, upotrebljava se s vorteks miješalicom MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (nužan za uporabu s kompletom s 4 pločice; opcionalan za uporabu s kompletom s 1 pločicom)
- Uređaj za ispiranje
- Mikrotitar pločice za hibridizaciju
- Poklopci mikrotitar pločica
- Mikrotitar pločice s jažicama za RCS*
- Spremnici reagensa za RCS*
- Poklopci za spremnike reagensa za RCS*

* Nužno za izvođenje automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS.

† Prilagođena stavka koja se upotrebljava za prijenos uzoraka u transportnom mediju za ispitke na mikrotitar pločicu za hibridizaciju. Mogu se upotrebljavati i druge prilagođene, proširive, višekanalne pipete pod uvjetom da je moguće postaviti razmak između vršaka od 3,2 cm kada se prošire.

- Jednokratni vršci za RCS*
- Čepovi za umetanje za RCS*
- Buffer N2*
- Buffer D2*
- Blue RCS Washer Boat†
- Ekstra dugački vršci za pipete
- Epruvete za uzimanje ispitaka
- Stalac za epruvete za uzimanje ispitaka
- Navojni čepovi za epruvete za uzimanje ispitaka
- Spremnici za reagense za jednokratnu uporabu
- Folija za prekrivanje epruveta DuraSeal™
- Mikroeprovete za hibridizaciju‡
- Stalac za mikroeprovete‡
- Folije za prekrivanje pločica‡

Oprema i materijali za opću laboratorijsku uporabu


- Vodena kupelj temperature 65 ± 2 °C dovoljne veličine da bi se u nju mogao smjestiti stalac za ispitke (širine 21 cm x dubine 32 cm x visine 18 cm)
- Mikrocentrifuga
- Vorteks miješalica s elementom za pričvršćivanje čašice
- Jednokalna pipeta; varijabilne postavke za zapremine od 20 – 200 µl i 200 – 1000 µl
- Pipeta s ponavljajućim pozitivnim pomakom, kao što je pipeta Eppendorf® Repeater®
- 8-kanalna pipeta: promjenjive postavke za volumene od 25 – 200 µl
- Mjerač vremena
- Otopina natrijeva hipoklorita, 0,5 % v/v
- Folija Parafilm® ili slična
- Jednokratni vršci pipeta s pregradom za aerosol (20 – 200 µl i 200 – 1000 µl)
- Jednokratni vršci za pipete s ponavljajućim pozitivnim pomakom (12,5, 5, 2,5 i 1,25 ml)
- Jednokratni vršci za 8-kanalnu pipetu (25 – 200 µl)
- Papirnati ručnici Kimtowels® ili slični papirnati ručnici koji ne otpuštaju vlakna
- Jednokratna navlaka za radnu površinu
- Rukavice za jednokratnu uporabu bez pudera
- Polipropilenske epruvete sa zaobljenim dnom i čepom od 5 ml i/ili 15 ml
- Stalac za epruvete za držanje epruveta od 10 ili 15 ml
- Polipropilenske konične epruvete od 50 ml


* Nužno za izvođenje testiranja s uzorcima pripremljenima s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.


† Nužno za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS za uzorke obrađene s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.

‡ Nužno za izvođenje hibridizacije s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji.


Dodatna oprema i materijali za pripremu uzoraka PreservCyt

 Pogledajte *Upute za uporabu kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (Priručnik)* za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit.

 Pogledajte *Priručnik za komplet QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit* za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit.

 Pogledajte *Upute za uporabu za komplet digene HC2 Sample Conversion Kit* za ručnu pripremu uzoraka.

Dodatna oprema i materijali za pripremu uzoraka SurePath

 Pogledajte *Upute za uporabu kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit (Priručnik)* za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIAasymphony DSP HPV Media Kit.

Za ručnu pripremu uzoraka SurePath potrebna je sljedeća dodatna oprema i materijali:

- Centrifuga s nižim vjedrima koja može postići $800 \pm 15 \times g$ i držati konične polipropilenske epruvete za centrifugiranje od 15 ml
- Epruvete *digene* HC2 Sample Conversion Tubes ili polipropilenske epruvete VWR® ili Corning® od 15 ml

Važno: Epruvete *digene* HC2 Sample Conversion Tubes dostupne kod tvrtke QIAGEN moraju se upotrebljavati s vorteks miješalicom MST Vortexer 2 ili sustavom RCS.

- Pipete za prijenos od 7 ml sa standardnim vršcima ili slične
- *digene* Specimen Transport Medium

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu.

Pažljivo pročitajte sve upute prije uporabe testa.

Upozorenja

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheet, SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi www.qiagen.com/safety. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list za svaki komplet QIAGEN i komponentu kompleta.

Ispitci

OPREZ Rizik od infektivnih agensa



Ispitci mogu sadržavati infektivne agense te je njima potrebno postupati u skladu s time. Sve ispitke smatrajte potencijalno infektivnima.

Nijedna poznata metoda testa ne može pružiti potpunu sigurnost da uzorci neće prenijeti infekciju. Preporučuje se da se ljudskim ispitcima rukuje u skladu s važećim nacionalnim i lokalnim praksama za biološku sigurnost. Primjenjujte te prakse za biološku sigurnost s materijalima koji sadržavaju ili za koje se sumnja da sadržavaju infektivne agense.

Te mjere opreza, među ostalim, uključuju sljedeće:

- Nemojte pipetirati ustima.
- Nemojte pušiti, jesti ili piti u prostorijama u kojima se rukuje reagensima ili ispitcima.
- Prilikom rukovanja reagensima ili ispitcima nosite jednokratne rukavice bez pudera. Temeljito operite ruke nakon provedbe testa.
- Očistite i dezinficirajte sve prolivene ispitke tuberkulocidnim dezinfekcijskim sredstvom kao što je natrijev hipoklorit koncentracije 0,5 % v/v ili drugo odgovarajuće dezinfekcijsko sredstvo (32, 33).
- Dekontaminirajte i bacite sve ispitke, reagense i druge potencijalno kontaminirane materijale u skladu s nacionalnim i lokalnim propisima.

Nakon denaturacije i inkubacije ispitci se više ne smatraju infektivnima (34); međutim, laboratorijsko osoblje svejedno bi se trebalo pridržavati nacionalnih i lokalnih mjera opreza.

Natrijev azid

Neki reagensi sadržavaju natrijev azid. Zabilježeni su slučajevi kada je natrijev azid uzrokovao nastanak olovnog ili bakrova azida u laboratorijskim cijevima. Ti azidi mogu eksplodirati prilikom udara, kao što je lupanje čekićem. Kako biste spriječili nastanak olovnog ili bakrova azida, temeljito vodom isperite odvode nakon zbrinjavanja otopina koje sadržavaju natrijev azid. Kako biste uklonili kontaminaciju iz starih odvoda za koje se sumnja da sadržavaju nakupine azida, U.S. Occupational Safety and Health Administration (Uprava za zaštitu na radu SAD-a) preporučuje sljedeće:

1. Sifonirajte tekućinu iz rešetke koristeći gumeno ili plastično crijevo.
2. Napunite otopinom natrijeva hidroksida koncentracije 10 % v/v.
3. Ostavite da odstoji 16 sati.
4. Dobro isperite vodom.

Buffer N2

OPREZ **Opasnost od iznimno reaktivnih spojeva**



Nemojte izravno dodavati izbjeljivač ili kisele otopine ni u koju otopinu ili otpad koji sadržava pufer Buffer N2.

Buffer N2 sadržava gvanidin hidroklorid koji u kombinaciji s izbjeljivačem može stvoriti iznimno reaktivne spojeve.

Ako se tekućina koja sadržava te puferne prolije, očistite je odgovarajućim laboratorijskim deterdžentom i vodom. Ako prolivena tekućina sadržava potencijalno infektivne agense, očistite zahvaćeno područje najprije laboratorijskim deterdžentom i vodom, a zatim 1-postotnim (v/v) natrijevim hipokloritom.

Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS

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

Izjave o sigurnosti i rizicima za komponente

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

Denaturacijski reagens



Sadržava: natrijev hidroksid. Opasnost! Može imati korozivno djelovanje na metale. Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.

Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

Kontrola kvalitete za visokorizične tipove HPV-a

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

Kontrola kvalitete za niskorizične tipove HPV-a

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

Negativni kalibrator

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

Diluens za probe



Sadržava: octenu kiselinu, poliakrilnu kiselinu. Opasnost! Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. Odmah nazvati CENTAR ZA KONTROLU OTROVANJA ili liječnika.


Koncentrat pufera za ispiranje



Sadržava: natrijev azid. Upozorenje! Štetno ako se proguta. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Nosite zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

Mjere opreza

Korisnik se uvijek mora pridržavati sljedećih mjera opreza prilikom provedbe testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka trajanja naznačenog pokraj simbola  na naljepnici vanjske kutije ili roka trajanja pripremljenih reagensa.
- Provedba testa tijekom vremena i pri temperaturama koji premašuju navedene raspone može rezultirati nevažećim rezultatima. Testovi koji premaše utvrđene vremenske i temperaturne raspone nisu važeći i potrebno ih je ponoviti.
- Potrebno je točno slijediti postupak ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, kalibraciju ispitivanja, kontrolu kvalitete i tumačenje rezultata ispita kako bi se dobili pouzdani rezultati ispitivanja.
- Važno je da pipetirate točno naznačen volumen reagensa i dobro promiješate nakon svakog dodavanja reagensa. Ako to ne učinite, rezultati testa mogli bi biti pogrešni. Vođenjem računa o tome da se dogode zabilježene promjene boja potvrdit ćete da su navedeni uvjeti zadovoljeni.
- Uz iznimku koncentrata pufera za ispiranje, komponente kompleta testirane su kao cjelina. Nemojte mijenjati komponente za one iz drugih izvora ili drugih serija. Međutim, prihvatljivo je kombinirati komponente iz kompleta s istim serijskim brojem kako biste imali potrebne volumene reagensa za testiranje više mikrotitar pločica u jednom postupku sustava RCS.
- Nukleinske su kiseline vrlo osjetljive na degradaciju nukleaza u okolini. Nukleaze su prisutne na ljudskoj koži te na površinama ili materijalima kojima ljudi rukuju. Očistite i prekritite radne površine navlakom za radne površine za jednokratnu uporabu i nosite rukavice bez pudera tijekom izvođenja svih koraka testiranja.
- Pobrinite se da spriječite kontaminaciju mikrotitar pločice za hvatanje i detekcijskog reagensa 2 (DR2) vanjskom alkalnom fosfatazom tijekom izvođenja testa. Tvari koje mogu sadržavati alkalnu fosfatazu uključuju detekcijski reagens 1 (DR1), bakterije, slinu, kosu i ulja s kože. Prekrivanje mikrotitar pločice za hvatanje nakon koraka ispiranja i za vrijeme inkubacije DR2 osobito je važno jer vanjska alkalna fosfataza može reagirati s DR2, što može rezultirati lažno pozitivnim rezultatima.
- Zaštitite DR2 od produljenog izlaganja izravnoj svjetlosti. Upotrijebite DR2 odmah nakon alikvotiranja i izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
- Pripremite ponavljajuću pipetu prije dispenciranja reagensa i periodično provjeravajte da nema velikih mjehurića zraka. Prekomjerne količine velikih mjehurića zraka u vršku ponavljajuće pipete mogu uzrokovati netočno dispenciranje, a može ih se izbjeći punjenjem pipete, dispenciranjem sve tekućine te ponovnim punjenjem. Za specifične upute za uporabu pogledajte korisnički priručnik za pipetu.

- Pipetiranje s pomoću višekanalne pipete izvedite primjenom tehnike obrnutog pipetiranja (pogledajte „Otkrivanje hibrida,” stranica 52) za dispenziranje DR1 i DR2. Provjerite svaki vršak pipete na višekanalnoj pipeti kako biste se uvjerali da je dobro pričvršćen i napunjen.
- Pobrinite se da se svaka jažica mikrotitar pločice za hvatanje temeljito ispere (pogledajte „Ispiranje,” stranica 53). Neodgovarajuće ispiranje rezultirat će povećanom pozadinom i može uzrokovati lažno pozitivne rezultate. Ostatak pufera za ispiranje u jažicama mikrotitar pločica za hvatanje može rezultirati smanjenim signalom ili slabom obnovljivosti.

Pohrana i rukovanje reagensima

Komponente kompleta

Nakon primitka čuvajte komplet na temperaturi od 2 – 8 °C. Koncentrat pufera za ispiranje, denaturacijski reagens i indikatorska boja mogu se čuvati na temperaturi od 2 – 30 °C, prema želji. Svi se reagensi isporučuju spremni za uporabu, osim denaturacijskog reagensa (DNR), mješavine probe i pufera za ispiranje.

Pripremljeni reagensi

Nakon pripreme DNR je stabilan 3 mjeseca pri temperaturi od 2 – 8 °C.

Nakon pripreme pufer za ispiranje stabilan je 3 mjeseca pri temperaturi od 2 – 30 °C.

Ako testirate uzorke PreservCyt obrađene s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit ili QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, otvoreni nedenaturirani kalibratori i kontrole kvalitete stabilni su 3 mjeseca na temperaturi od 2 – 8 °C.

Ako testirate uzorke obrađene s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, pripremljeni denaturacijski reagens 2 (DNR2) stabilan je 8 sati na temperaturi od 15 – 30 °C.

Uzimanje i priprema ispitaka

Cervikalne i vaginalne ispitke za testiranje s pomoću ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test uzimajte i transportirajte primjenom nekog od sljedećeg pribora za uzimanje uzoraka:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (koji se sastoji od cervikalne četkice i transportnog medija za ispitke)
- Biopsati prikupljeni u transportni medij za ispitke *digene*
- Pribor za prikupljanje nalik metlici ili pribor za prikupljanje koji je kombinacija četkice/špatule postavljen u otopinu PreservCyt Solution ili tekućinu SurePath Preservative Fluid

Ispitci prikupljeni drugim priborom za uzimanje uzoraka ili transportirani u drugim transportnim medijima nisu odobreni za uporabu s ovim testom. Radne značajke ovog testa utvrđene su isključivo s naznačenim kompletima za uzimanje uzoraka.

digene HC2 DNA Collection Device ne smije su upotrebljavati na trudnicama. Cervikalni ispitci moraju se uzeti prije primjene octene kiseline ili joda ako će se provoditi kolposkopija. Pogledajte upute za uporabu za *digene* HC2 DNA Collection Device za dodatne postupke za uzimanje ispitaka i rukovanje ispitcima.

Cervikalni i vaginalni ispitci prikupljeni u transportni medij za ispitke ne zahtijevaju konverziju uzoraka prije testiranja ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Ispitci PreservCyt i SurePath zahtijevaju konverziju uzoraka prije testiranja ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Cervikalni i vaginalni ispitci u transportnom mediju za ispitke

Važno: Nemojte uzimati cervikalni ili vaginalni ispitak u transportni medij za ispitke ako su u njemu prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica, kontracepcijskog gela ili irigacijskog sredstva.

Ispitci u transportnom mediju za ispitke mogu se čuvati do 2 tjedna na sobnoj temperaturi te ih se može transportirati bez hlađenja do ispitnog laboratorija. Ispitke transportirajte u izoliranom spremniku putem službe za dostavu koja dostavlja preko noći ili u roku od 2 dana.

U ispitnom laboratoriju ispitke čuvajte na temperaturi od 2 – 8 °C ako će se test provesti u roku od tjedan dana. Ako će se test provesti u roku duljem od tjedan dana, prekrijte čepove epruveta s ispitcima folijom Parafilm i čuvajte ih na temperaturi od –20 °C maksimalno 3 mjeseca. Prilikom vađenja ispitaka iz zamrzivača radi testiranja, odmah zamijenite čepove navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka.

Transportnom mediju za ispitke dodan je konzervans kako bi se spriječio razvoj bakterija i zadržao integritet DNK. On nije namijenjen za očuvanje vijabilnosti organizama ili stanica.

Cervikalni bioptati

Netom prikupljene cervikalne bioptate presjeka do 5 mm moguće je testirati testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Nemojte upotrebljavati bioptate promjera manjeg od 2 mm. Ispitak dobiven biopsijom odmah postavite u 1,0 ml transportnog medija za ispitke, prekrijte čep epruvete za ispitke folijom Parafilm kako biste spriječili iskakanje čepa i čuvajte ga zamrznutog na temperaturi od –20 °C. Pošaljite ispitke dobivene biopsijom na temperaturi od 2 – 30 °C noćnom dostavom u ispitni laboratorij.

U ispitnom laboratoriju ispitke čuvajte na temperaturi od –20 °C do obrade. Prilikom vađenja ispitaka iz zamrzivača radi testiranja, odmah zamijenite čepove navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka.

Cervikalni ispitci u otopini PreservCyt Solution

Važno: Ne prikupljajte cervikalni ispitak PreservCyt za pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit ako su prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica, vaginalnog lubrikanta u gelu ili krvi.

Važno: Ne prikupljajte cervikalni ispitak PreservCyt za pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit ako je u njemu prisutan kontracepcijski gel.

Ispitke prikupljajte rutinski, a stakalca za papa test ThinPrep® pripremite prema uputama za uporabu dobivenima od proizvođača.

Nakon prikupljanja ispitke PreservCyt čuvajte maksimalno 3 mjeseca na temperaturi od 2 – 30 °C prije pripreme uzorka za ispitivanje *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Ispitci PreservCyt ne smiju se zamrzavati.

Za pripremu uzoraka dostupne su sljedeće metode:

- Automatizirana priprema uzoraka s pomoću instrumenta QIASymphony SP i kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit
Rezultat je ekstrakt uzorka (sadržava magnetske čestice, STM i DNR) koji je spreman za nastavak na denaturacijski korak testa.
- Automatizirana priprema uzoraka s pomoću instrumenta QIASymphony SP i kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit
Rezultat je eluat DNK spreman za nastavak na denaturacijski korak testa.
- Ručna priprema uzorka s pomoću kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit
Rezultat ručne pripreme uzorka denaturirani je uzorak spreman za nastavak na hibridizacijski korak testa.

Zahtjevi za volumene ispitaka temelje se na metodi pripreme uzorka kako slijedi:

- Za automatiziranu pripremu uzorka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit potrebna su 3 ml ispitka
- Za automatiziranu pripremu uzorka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit potrebna su 4 ml ispitka
- Ručna priprema uzorka s pomoću kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit zahtijeva najmanje 4 ml ispitka

Ispitci čiji je volumen manji od potrebnog nakon pripreme papa testa sadržavaju nedovoljno materijala za ispitivanje te bi mogli uzrokovati lažno negativni rezultat ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Cervikalni ispitci u tekućini SurePath Preservative Fluid

Važno: Ne prikupljajte cervikalni ispitak SurePath za pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit ako su u njemu prisutni kontracepcijski gel, krema protiv gljivica ili protuupalna krema.

Prikupite ispitke u tekućinu SurePath Preservative Fluid sukladno odgovarajućim uputama za uporabu.

Priprema uzoraka za ispitke SurePath može se obaviti ili prije početka citološke obrade ili nakon njezina završetka.

Ako je obavljate prije početka citološke obrade, upotrijebite uzorak iz originalnog ispitka SurePath koji nije obrađen primjenom nijedne druge dijagnostičke metode, uključujući BD PrepMate® System i BD PrepStain® Slide Processor. U ovim uputama za uporabu ti se uzorci nazivaju „uzorcima SurePath” kako ne bi došlo do zabune.

Ako je obavljate nakon završetka citološke obrade, upotrijebite uzorak iz preostalog postgradijentnog staničnog taloga dobivenog nakon pripreme ispitka SurePath u skladu s odgovarajućim uputama za sustave BD PrepMate System i BD PrepStain Slide Processor. U ovim uputama za uporabu ti se uzorci nazivaju „uzorcima postgradijentnog staničnog taloga SurePath” kako ne bi došlo do zabune.

Za pripremu uzoraka dostupne su sljedeće metode:

- Automatizirana priprema uzoraka za uzorke SurePath s pomoću instrumenta QIASymphony SP i kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Rezultat je denaturirani ekstrakt uzorka (sadržava magnetske čestice, transportni medij za ispitke i DNR) koji je spreman za nastavak na hibridizacijski korak testa.

- Automatizirana priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću instrumenta QIASymphony SP i kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.
Rezultat je denaturirani ekstrakt uzorka (sadržava magnetske čestice, transportni medij za ispitke i DNR) koji je spreman za nastavak na hibridizacijski korak testa.
- Ručna priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath .
Rezultat ručne pripreme uzorka denaturirani je uzorak spreman za nastavak na hibridizacijski korak testa.

Zahtjevi za volumene uzoraka temelje se na metodi pripreme uzorka kako slijedi:

- Za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit potrebno je 950 µl
- Za ručnu pripremu uzoraka potrebno je 2,8 ml uzorka postgradijentnog staničnog taloga SurePath

Uporaba volumena koji je manji od traženog može uzrokovati lažno negativni rezultat u testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Automatizirana priprema uzoraka za ispitke SurePath

Ispitke SurePath nakon prikupljanja čuvajte maksimalno 4 tjedna na temperaturi od 5 – 25 °C prije pripreme uzoraka s pomoću instrumenta QIASymphony SP i kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit. Korišteni SurePath ispitak ne smije se obrađivati primjenom bilo koje druge dijagnostičke metode, uključujući BD PrepMate i BD PrepStain Slide Processor. Za automatiziranu pripremu uzorka potrebno je 950 µl ispitka dobivenog sa SurePath.

Automatizirana priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath

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

Postgradijentni stanični talog s tekućinom SurePath Preservative Fluid može se čuvati do 4 tjedna na temperaturi od 5 – 25 °C prije pripreme uzoraka za *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Za automatiziranu pripremu uzoraka potrebno je 950 µl postgradijentnog staničnog taloga SurePath.

Ručna priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath

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

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

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

Postupak

Postupci koje treba napraviti prije započinjanja

- Za ručno testiranje ostavite grijač Microplate Heater I barem 60 minuta da se zagrije na temperaturu od $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ od hladnog pokretanja. Ako ne omogućite dovoljno vrijeme za ovo razdoblje zagrijavanja to bi za posljedicu moglo imati topljenje mikrotitar pločice za hibridizaciju. Dodatne upute pogledajte u *Korisničkom priručniku za Microplate Heater I*.
- Ako tijekom koraka denaturacije i hibridizacije upotrebljavate vodenu kupelj, pobrinite se da je temperatura vodene kupelji $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ te da je razina vode odgovarajuća kako bi cijeli volumen ispitka u epruveti bio uronjen.

Priprema reagensa

- Prije početka testiranja izvadite ispitke i sve potrebne reagense iz hladnjaka. Ostavite ih 15 – 30 minuta da dosegnu temperaturu od $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pripremite uzorke PreservCyt i SurePath prije ekvibriranja bilo kojeg prethodno denaturiranog ispitka i reagensa na sobnu temperaturu.
- Ako kombinirate reagense spremne za uporabu za postupak sustava RCS s više pločica, temeljito promiješajte pojedinačne bočice, a zatim ih pomiješajte u čistoj polipropilenskoj koničnoj epruveti za jednokratnu uporabu kako biste dobili potreban volumen reagensa.
- Za ručno se testiranje reagensi pufer za ispiranje i mješavina probe pripremaju tijekom određenih koraka testiranja. Za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS svi se reagensi pripremaju prije početka postupka sustava RCS te se postavljaju na platformu sustava RCS.
- Prema potrebi, pripremite DNR i DNR2 prije pripreme ostalih reagensa.
- Na kraju testiranja bacite sve pripremljene reagense (osim ako je drugačije navedeno) i alikvote reagensa.
- Koristite se tablicama 1–5 u nastavku za određivanje volumena potrebnog za svaki reagens ovisno o broju testova/mikrotitar pločica i metodi testiranja. Volumeni za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS uključuju prazan volumen reagensa koji je potreban za instrument.

Tablica 1. Potrebni volumeni pripremljenih reagensa spremnih za uporabu za ručno testiranje ispitaka u transportnom mediju za ispitke i ručnu pripremu uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath

Broj testova/pločica	Mješavina probe	Pufer za ispiranje	DR1	DR2
24/3	1,04 ml	> 1 l	3 ml	3 ml
48/6	2,08 ml	> 1 l	5 ml	5 ml
72/9	3,12 ml	> 1 l	7 ml	7 ml
96/12	4,16 ml	> 1 l	12 ml	12 ml

Tablica 2. Potrebni volumeni pripremljenih reagensa spremnih za uporabu za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS za ispitke u transportnom mediju za ispitke, ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath te uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath i SurePath pripremljenih s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Broj mikrotitar pločica	Mješavina probe	Pufer za ispiranje	DR1	DR2
≤ 1	5,20 ml	3 l	10 ml	10 ml
≤ 1,5	6,24 ml	3 l	14 ml	14 ml
≤ 2	8,32 ml	3 l	18 ml	18 ml
≤ 2,5	9,36 ml	6 l	22 ml	22 ml
≤ 3	10,40 ml	6 l	26 ml	26 ml
≤ 3,5	12,48 ml	6 l	30 ml	30 ml
≤ 4	13,52 ml	6 l	34 ml	34 ml

Tablica 3. Potrebni volumeni pripremljenih reagensa spremnih za uporabu za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS za uzorke PreservCyt pripremljene s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Broj mikrotitar pločica	DNR	Mješavina probe	Pufer za ispiranje	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,20 ml	3 l	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	6,24 ml	3 l	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	8,32 ml	3 l	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	9,36 ml	6 l	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	10,40 ml	6 l	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	12,48 ml	6 l	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	13,52 ml	6 l	34 ml	34 ml

Tablica 4. Potrebni volumeni pripremljenih reagensa spremnih za uporabu za ručno testiranje uzoraka PreservCyt pripremljenih s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Broj testova/pločica	DNR	DNR2	Mješavina probe	Pufer za ispiranje	DR1	DR2
24/3	0,6 ml	1,0 ml	1,04 ml	> 1 l	3 ml	3 ml
48/6	0,6 ml	2,0 ml	2,08 ml	> 1 l	5 ml	5 ml
72/9	0,6 ml	2,5 ml	3,12 ml	> 1 l	7 ml	7 ml
96/12	0,6 ml	5,0 ml	4,16 ml	> 1 l	12 ml	12 ml

Tablica 5. Potrebni volumeni pripremljenih reagensa spremnih za uporabu za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS za uzorke PreservCyt pripremljene s pomoću kompleta QIA Symphony DSP AXpH DNA Kit

Broj mikrotitar pločica	DNR	DNR2	Mješavina probe	Pufer za ispiranje	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,0 ml	5,20 ml	3 l	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	5,5 ml	6,24 ml	3 l	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	6,5 ml	8,32 ml	3 l	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	7,7 ml	9,36 ml	6 l	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	8,8 ml	10,40 ml	6 l	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	10,0 ml	12,48 ml	6 l	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	11,0 ml	13,52 ml	6 l	34 ml	34 ml

Denaturacijski reagens

Komplet s 1 pločicom isporučuje se s 50 ml denaturacijskog reagensa, a komplet s 4 pločice isporučuje se s 2 x 100 ml denaturacijskog reagensa. Pobrinite se da DNR pripremite u skladu s volumenom isporučenim s dotičnim kompletom.

Napomena:

- Nakon pripreme DNR je stabilan 3 mjeseca pri temperaturi od 2 – 8 °C.
- Ako boja izbledi, dodajte 3 dodatne kapi indikatorske boje i temeljito promiješajte prije uporabe.

Bočica od 50 ml

1. Dodajte 5 kapi indikatorske boje u bočicu denaturacijskog reagensa od 50 ml.
2. Temeljito promiješajte.
DNR bi trebao biti ujednačene tamnoljubičaste boje.
3. Označite DNR novim datumom isteka trajanja.

Bočica od 100 ml

1. Dodajte 10 kapi indikatorske boje u bočicu denaturacijskog reagensa od 100 ml.
2. Temeljito promiješajte.
DNR bi trebao biti ujednačene tamnoljubičaste boje.
3. Označite DNR novim datumom isteka trajanja.

Denaturacijski reagens 2

Napomena: DNR2 je potreban samo za testiranje uzoraka PreservCyt pripremljenih s pomoću kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit.

1. Označite čistu polipropilensku koničnu epruvetu za jednokratnu uporabu kao „DNR2”.
2. Dodajte potreban volumen pufera Buffer N2 (pogledajte Tablica 6 u nastavku) u označeni spremnik.

Tablica 6. Priprema DNR2

Potreban volumen DNR2	Volumen pufera Buffer N2	Volumen pufera Buffer D2	Indikatorska boja
1,0 ml	0,4 ml	0,6 ml	1 – 2 kapi
2,0 ml	0,8 ml	1,2 ml	1 – 2 kapi
2,5 ml	1,0 ml	1,5 ml	1 – 2 kapi
5,0 ml	2,0 ml	3,0 ml	1 – 2 kapi
5,5 ml	2,2 ml	3,3 ml	1 – 2 kapi
6,5 ml	2,6 ml	3,9 ml	1 – 2 kapi
7,7 ml	3,1 ml	4,6 ml	1 – 2 kapi
8,8 ml	3,5 ml	5,3 ml	1 – 2 kapi
10,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	1 – 2 kapi
11,0 ml	4,4 ml	6,6 ml	1 – 2 kapi

3. Dodajte potreban volumen pufera Buffer D2 (pogledajte Tablica 6, iznad) u označeni spremnik.
4. Dodajte potrebnu količinu indikatorske boje (pogledajte Tablica 6, iznad) u označeni spremnik.

Napomena: Upotrijebite indikatorsku boju isporučenu uz komplet *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

5. Miješajte vorteks miješalicom najmanje 10 sekundi.

Napomena: Nakon pripreme DNR2 je stabilan 8 sati pri temperaturi od 15 – 30 °C.

Mješavina probe

- Za ručno testiranje pripremite mješavinu probe za vrijeme inkubacije denaturacije ispitka (prema potrebi, pogledajte „Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u transportnom mediju za ispitke”, stranica 44, ili „Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i eluata DNK za ručno testiranje”, stranica 42).
- Budite posebno oprezni kako biste spriječili kontaminaciju RNaze. Tijekom pipetiranja probe upotrebljavajte vrške pipeta s pregradama za aerosole.

- Diluens za probe je viskoznan. Pobrinite se da se postigne vidljivi vrtlog prilikom pripreme mješavine probe; nepotpuno miješanje može rezultirati smanjenim signalom.
- Ako za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS kombinirate nekoliko bočica probe, pulirajte probu u jednu bočicu i promiješajte pipetiranjem.

1. Kako biste izbjegli da ostaci probe ostanu na poklopcu bočice, kratko centrifugirajte svaku bočicu probe kako bi se tekućina spustila na dno bočice.
2. Lupkanjem nježno promiješajte bočicu.
3. Odredite potrebnu količinu mješavine probe.

Preporuka: Pripremite dodatnu količinu mješavine probe kako biste nadoknadili volumen koji bi se mogao izgubiti u vršcima pipete ili na stijenci bočice. Volumeni navedeni iznad u tablicama 1. – 5. Uključuju preporučeni dodatni volumen.

Ručno testiranje: Odredite volumene potrebne za razrjeđivanje probe u diluensu za probe u omjeru 1:25 kako biste pripremili mješavinu probe (25 µl/test). Volumeni su navedeni u Tablica 1, stranica 30, i Tablica 4, stranica 31, kako je primjenjivo.

Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS: Upotrijebite volumene navedene u Tablica 2, stranica 31, Tablica 3, stranica 31 ili Tablica 5, stranica 32, kako je primjenjivo.

4. Označite novi jednokratni spremnik kao „Mješavina probe za visokorizične tipove HPV-a”. Ovisno o broju testova preporučuju se polipropilenske epruvete sa zaobljenim dnom i čepom od 5 ml ili 15 ml.
5. Dodajte potrebnu količinu diluensa za probe (pogledajte Tablica 7 u nastavku) u označenu epruvetu.
6. Pipetirajte potrebnu količinu probe za visokorizične tipove HPV-a u diluens za probe (pogledajte Tablica 7 u nastavku) tako da naslonite vršak pipete uz unutarnju stijenku epruvete odmah iznad meniskusa i izbacite njezin sadržaj.

Važno: Nemojte uranjati vršak u diluens za probe.

Tablica 7. Priprema mješavine probe

Potreban volumen mješavine probe	Volumen diluensa za probe	Volumen probe za visokorizične tipove HPV-a
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. Miješajte u vorteks miješalici najmanje 5 sekundi pri maksimalnoj brzini kako biste promiješali temeljito.

Mora se napraviti vidljivi vrtlog.

Pufer za ispiranje

- Za ručno testiranje pripremite pufer za ispiranje tijekom koraka hvatanja hibrida (pogledajte „Hvatanje hibrida”, stranica 50).
- Kako biste minimizirali izlaganje, dodajte vodu koncentratu pufera za ispiranje tijekom pripreme.
- Za ručnu metodu ispiranja mikrotitar pločica pripremite 3 litre pufera za ispiranje u uređaju za ispiranje.

Preporuka: Svaka 3 mjeseca očistite uređaj za ispiranje i cijevi 0,5-postotnom otopinom natrijeva hipoklorita i temeljito isperite destiliranom ili deioniziranom vodom kako biste spriječili moguću kontaminaciju alkalnom fosfatazom prisutnom u bakterijama i plijesni.

- Za automatizirani uređaj za ispiranje mikrotitar pločica pripremite pufer za ispiranje i pohranite ga u začepljenom spremniku ili pripremite 1 litru i postavite je u spremnik za ispiranje automatiziranog uređaja za ispiranje mikrotitar pločica.
 - Za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS pripremite navedenu količinu (prema potrebi, pogledajte Tablica 2, stranica 31, Tablica 3, stranica 31, ili Tablica 5, stranica 32) u bocu za ispiranje sustava RCS.
1. Pomiješajte jažicu s koncentratom pufera za ispiranje i dodajte potreban volumen koncentrata pufera za ispiranje (pogledajte Tablica 8 u nastavku) u za to određeni spremnik.
 2. Dodajte potreban volumen destilirane ili deionizirane vode (pogledajte Tablica 8 u nastavku) u za to određeni spremnik.

Tablica 8. Priprema pufera za ispiranje

Volumen potrebnog pufera za ispiranje	Volumen koncentrata pufera za ispiranje	Volumen destilirane ili deionizirane vode
1 l	33,3 ml	966,7 ml
2 l	66,6 ml	1933,4 ml
3 l	100,0 ml	2900,0 ml
6 l	200,0 ml	5800,0 ml

3. Postavite čisti papirnati ručnik koji ne otpušta vlakna preko svih otvora spremnika i dobro promiješajte.
4. Zatvorite spremnik kako biste spriječili kontaminaciju ili isparavanje ili ga postavite na odgovarajući instrument, prema potrebi.
5. Označite pufer za ispiranje novim datumom isteka trajanja.

Napomena: Nakon pripreme pufer za ispiranje stabilan je 3 mjeseca pri temperaturi od 2 – 30 °C.

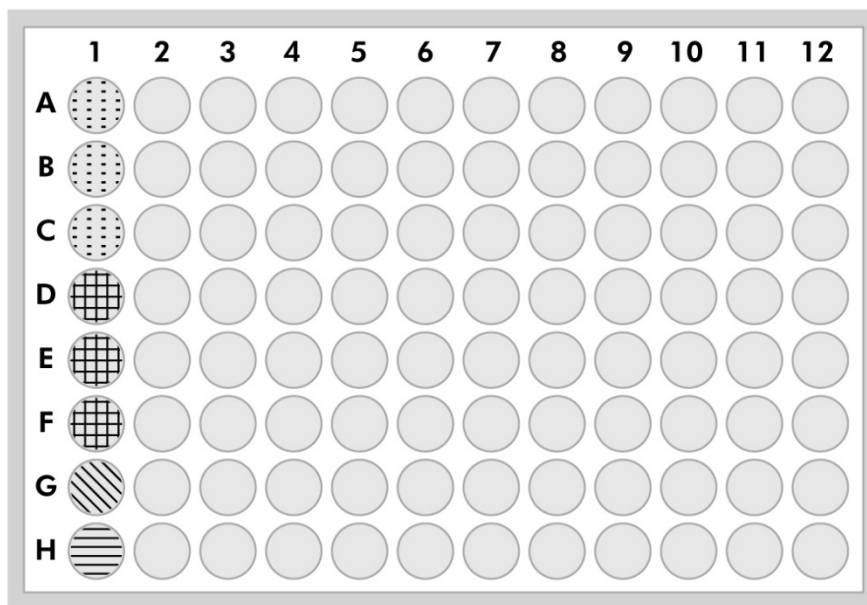
Izrada rasporeda pločica

1. Izradite raspored pločica s pomoću softvera za analizu ispitivanja *digene* s protokolima za ispitivanja *digene* za HPV.

Pogledajte odgovarajući korisnički priručnik za softver radi uputa o izradi rasporeda pločica s ispravnim položajima za kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke.

Napomena:

- Kalibratori, kontrole kvalitete i ispitci se obrađuju u konfiguraciji kolona od 8 jažica.
- Testirajte kalibratore i kontrole kvalitete na sljedećim položajima na mikrotitar pločici (pogledajte Slika 1, dolje):
 - Negativni kalibrator (NC) replicira se u jažicama mikrotitar pločice A1, B1, C1
 - Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a (High-Risk HPV Calibrator, HRC) replicira se u jažicama mikrotitar pločice D1, E1, F1
 - Kontrola kvalitete za niskorizične tipove HPV-a (QC1-LR) u jažici mikrotitar pločice G1
 - Kontrola kvalitete za visokorizične tipove HPV-a (QC2-HR) u jažici mikrotitar pločice H1



NC



QC2-HR



HRC



Uzorak



QC1-LR

Slika 1. Položaji kalibratora, kontrola kvalitete i uzoraka na mikrotitar pločici.

Važno: Prilikom izvođenja automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS upotrebljavajte protokole za ispitivanje specifične za sustav RCS kako biste izradili raspored pločica i generirali rezultate. Definirani parametri protokola ispitivanja specifičnih za sustav RCS različiti su od onih za protokole ispitivanja specifične za ručno testiranje (pogledajte „Izračun granične vrijednosti,” stranica 58).

2. Postavite kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke za testiranje na stalak za epruvete za uzimanje ispitaka ili stalak za ispitke onim redoslijedom kojim ćete ih testirati.

Važno: Prilikom provedbe automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS iznimno je važno da raspored pločica odgovara ispravnim ispitcima za testiranje kako bi se spriječilo izvještavanje netočnih rezultata za ispitke. Za svaki stalak za ispitke i poklopac koji se upotrebljavaju potvrdite da se serijski brojevi podudaraju te, prema potrebi, označite svaki stalak za ispitke i poklopac prema redoslijedu kojim će ih se testirati na sustavu RCS. Upotrebljavajte marker i naljepnicu koji se neće isprati u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 °C .


Priprema uzoraka

Ispitci PreservCyt i SurePath zahtijevaju pripremu uzoraka prije testiranja ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Pripremljeni uzorci spremni su za različite korake testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, ovisno o vrsti pripreme uzroka koja se izvodi.

Dostupne metode pripreme uzoraka su sljedeće:


- Automatizirana priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Automatizirana priprema uzoraka za ispitke SurePath i ispitke postgradijentnog staničnog taloga s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Automatizirana priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit
- Ručna priprema uzoraka za ispitke PreservCyt
- Ručna priprema uzoraka za ispitke postgradijentnog staničnog taloga SurePath

Priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit


 Pogledajte *Upute za uporabu kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (Priručnik)* za upute za pripremu uzoraka PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Važno: Ekstrakti uzoraka dobiveni kao rezultat pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt primjenom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit mogu se testirati isključivo s pomoću sustava RCS. Ručna provedba testa s ekstraktima uzoraka nije odobrena.

Rezultat pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit jesu ekstrakti uzoraka na mikrotitar pločici za hibridizaciju s praznom prvom kolonom. Ekstrakti uzoraka sadržavaju magnetske čestice, STM i DNR i spremni su za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS od koraka denaturacije. Kalibratori, kontrole kvalitete i ekstrakti uzoraka denaturiraju se istodobno na mikrotitar pločici za hibridizaciju za vrijeme automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS (pogledajte „Denaturacija i hibridizacija uzoraka pripremljenih s pomoću instrumenta QIASymphony SP”, stranica 41).


 Prilikom provedbe automatiziranog testiranja na sustavu RCS za uzorke pripremljene s pomoću instrumenta QIASymphony SP pogledajte *Korisnički priručnik za Rapid Capture System — Provedba testova digene HC2 DNA Tests primjenom uzoraka obrađenih instrumentom QIASymphony SP* za upute o provedbi testiranja.

Priprema uzoraka za ispitke SurePath i ispitke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit


 Pogledajte *Upute za uporabu kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (Priručnik)* za upute za pripremu uzoraka SurePath i uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Važno: Ekstrakti uzoraka dobiveni kao rezultat pripreme uzoraka za ispitke SurePath primjenom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit mogu se testirati isključivo s pomoću sustava RCS. Ručna provedba testa s ekstraktima uzoraka nije odobrena.

Rezultat pripreme uzoraka za ispitke SurePath i uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit jesu kalibratori, kontrole kvalitete i ekstrakti uzoraka na mikrotitar pločici za hibridizaciju spremni za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS na hibridizacijskom koraku testa.


 Prilikom provedbe automatiziranog testiranja na sustavu RCS za uzorke pripremljene s pomoću instrumenta QIASymphony SP pogledajte *Korisnički priručnik za Rapid Capture System — Provedba testova digene HC2 DNA Tests primjenom uzoraka obrađenih instrumentom QIASymphony SP* za upute o provedbi testiranja.

Priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

 Pogledajte *Priručnik za komplet QIASymphony DSP AXpH DNA Kit* za upute o pripremi uzoraka za ispitke PreservCyt.

Rezultat pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit jesu eluati DNK na mikrotitar pločici za hibridizaciju s praznom prvom kolonom. Eluati DNK spremni su za denaturacijski korak testa. Kalibratori, kontrole kvalitete i eluati DNK denaturiraju se istodobno na mikrotitar pločici za hibridizaciju (pogledajte „Denaturacija i hibridizacija uzoraka pripremljenih s pomoću instrumenta QIASymphony SP”, stranica 41).

Ručna priprema uzoraka za ispitke PreservCyt

 Pogledajte *Upute za uporabu za komplet digene HC2 Sample Conversion Kit* za ručnu pripremu ispitaka PreservCyt.

Ručna priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit rezultira uzorcima spremnima za hibridizacijski korak testa. Kalibratore i kontrole kvalitete pripremajte odvojeno (pogledajte „Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u transportnom mediju za ispitke”, stranica 44).

Ručna priprema uzoraka za ispitke postgradijentnog staničnog taloga SurePath

Ručna priprema uzoraka za ispitke postgradijentnog staničnog taloga SurePath rezultira uzorcima spremnima za hibridizacijski korak testa. Kalibratore i kontrole kvalitete pripremajte odvojeno (pogledajte „Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u transportnom mediju za ispitke”, stranica 44).

Važno: Ako postgradijentni stanični talog ispitka SurePath sadržava manje od 1 ml, postgradijentni stanični talog nije prikladan za testiranje ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test budući da tekućina SurePath Preservative Fluid nije dodana nakon citološke obrade.

1. Ostavite postgradijentni stanični talog SurePath da dosegne sobnu temperaturu i potvrdite da promatrani volumen tekućine iznosi približno 2,8 ml.
2. Centrifugirajte postgradijentni stanični talog SurePath u rotoru s njišućim vjedrima pri $800 \pm 15 \times g$ tijekom 10 ± 1 minuta.
3. Izvadite epruvete iz centrifuge.
4. Netom nakon centrifugiranja pažljivo pretočite supernatant i nježno tapkanjem osušite svaku epruvetu približno 3 puta na papirnatim ručnicima Kimtowels ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna kako biste uklonili višak tekućine. Promotrite talog u svakoj epruveti.

Važno: Nemojte dopustiti da stanični talog sklizne niz epruvetu tijekom sušenja tapkanjem.

5. Postavite epruvete na stalak.
6. Dodajte 200 μ l transportnog medija za ispitke u svaki talog s pomoću ponavljajuće ili jednokanalne pipete.
7. Resuspendirajte svaki talog miješanjem svake epruvete pojedinačno u vorteks miješalici tijekom 15 sekundi pri velikoj brzini.

Ako je teško resuspendirati talog, miješajte ga u vorteks miješalici dodatnih 5 – 30 sekundi ili dok talog ne počne plutati odvojen od dna epruvete i počne se otapati.

Napomena: Epruvete se mogu miješati bez poklapanja.

8. Pipetirajte 100 μ l DNR u svaki ispitak SurePath s pomoću ponavljajuće ili jednokanalne pipete.
Važno: Pazite da ne dodirujete stijenke epruvete jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka.
9. Dobro promiješajte svaku epruvetu miješajući ih 5 sekundi pojedinačno u vorteks miješalici pri visokoj brzini.

Napomena: Epruvete se mogu miješati bez poklapanja.

10. Označite epruvete *digene* HC2 Sample Conversion Tubes ili konične epruvete od 15 ml odgovarajućim identifikacijskim oznakama uzoraka i vrstom (na primjer, „SP” za ispitak SurePath) i postavite epruvete na stalak za epruvete.

Važno: Za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS moraju se upotrebljavati epruvete *digene* HC2 Sample Conversion Tubes.

11. Prenesite cijeli volumen u primjenjivu koničnu epruvetu od 15 ml s pomoću jednokratne pipete za prijenos od 7 ml sa standardnim vrškom.

12. Začepite konične epruvete i postavite ih na stalak za epruvete.

13. Epruvete inkubirajte u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 ± 2 °C, u trajanju od 90 ± 5 minuta.

Napomena: To je vrijeme inkubacije dulje nego što je potrebno za druge odobrene vrste ispitaka. Ako će se testiranje izvršiti isti dan, denaturirajte kalibratore i kontrole kvalitete (pogledajte „Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u transportnom mediju za ispitke”, stranica 44).

14. Izvadite stalak za epruvete iz vodene kupelji nakon inkubacije.

Ako upotrebljavate stalak za ispitke, nemojte dopustiti da se ohladi prije nego što uklonite poklopac stalka. Odmah nastavite s testiranjem ili uklonite poklopac stalka i foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal.

Napomena: Ako se stalak za ispitke ohladi, epruvete bi se mogle zalijepiti za poklopac stalka te stoga proliti.

Pripremljeni uzorci SurePath mogu se:

- odmah testirati (nastavite na „Hibridizacija pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath”, stranica 47)
- pohraniti (pogledajte „Opcionalna točka zaustavljanja pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath”, stranica 46)


Denaturacija i hibridizacija uzoraka pripremljenih s pomoću instrumenta QIASymphony SP

Rezultat pripreme uzoraka na instrumentu QIASymphony SP jest mikrotitar pločica za hibridizaciju koja sadržava barem pripremljene uzorke.

Ako su uzorci PreservCyt pripremljeni s pomoću instrumenta QIASymphony SP, prva kolona mikrotitar pločice za hibridizaciju je prazna. Sadržaj mikrotitar pločice spreman je za denaturacijski korak testa. Kalibratori i kontrole kvalitete dodaju se mikrotitar pločici za hibridizaciju bilo ručno ili za vrijeme automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS, a potom se izvodi korak denaturacije.

Ako su uzorci SurePath ili uzorci postgradijentnog staničnog taloga SurePath pripremljeni s pomoću instrumenta QIASymphony SP, pločica sadržava pripremljene uzorke s denaturiranim kalibratorima i kontrolama kvalitete pipetiranim u prvu kolonu mikrotitar pločice za hibridizaciju. Sadržaj mikrotitar pločice spreman je za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS od hibridizacijskog koraka testa.

Važno: Ekstrakti uzoraka dobiveni kao rezultat pripreme uzoraka primjenom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit mogu se testirati isključivo s pomoću sustava RCS. Ručna provedba testa s ekstraktima uzoraka nije odobrena.

 Prilikom provedbe automatiziranog testiranja na sustavu RCS za uzorke pripremljene s pomoću instrumenta QIASymphony SP pogledajte *Korisnički priručnik za Rapid Capture System — Provedba testova digene HC2 DNA Tests primjenom uzoraka obrađenih instrumentom QIASymphony SP* za upute o provedbi testiranja.

Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i eluata DNK za ručno testiranje

- Ovaj se postupak odnosi samo na ručno testiranje uzoraka ispitaka PreservCyt pripremljenih s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit. Ako provodite automatizirano testiranje na sustavu RCS, pogledajte *Korisnički priručnik za Rapid Capture System — Provedba testova digene HC2 DNA Tests primjenom uzoraka obrađenih instrumentom QIASymphony SP* za upute o provedbi testiranja.
 - Denaturacija kalibratora i kontrola kvalitete izvodi se s pomoću denaturacijskog reagensa (DNR) dok se denaturacija eluata DNK izvodi s pomoću denaturacijskog reagensa 2 (DNR2).
1. Promiješajte svaki kalibrator i kontrolu kvalitete 10 sekundi u vorteks miješalici na maksimalnim postavkama.
 2. Preokrenite svaku epruvetu kako biste dohvatili materijal s čepa epruvete.
 3. Uklonite čepove s epruveta s kalibratorom i kontrolom kvalitete i bacite ih.
 4. S pomoću jednokanalne pipete dodajte 50 µl primjenjivog kalibratora ili kontrole kvalitete na dno prazne jažice mikrotitar pločice za hibridizaciju prema izrađenom rasporedu pločice.

Ako će se kalibrator i kontrole kvalitete upotrebljavati za dodatno testiranje, začepite epruvete novim navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka, označite ih novim datumom isteka trajanja i pohranite na temperaturi od 2 – 8 °C.

Napomena: Otvoreni, nedenaturirani kalibrator i kontrole kvalitete stabilni su 3 mjeseca na temperaturi od 2 – 8 °C.

5. Temeljito promiješajte pripremljeni DNR i DNR2 u vorteks miješalici i alikvotirajte ih u odgovarajuće označene jednokratne spremnike za reagense.

Važno: Pobrinite se da ispravni reagens dodate u ispravnu kolonu mikrotitar pločice za eluat.

6. S pomoću 8-kanalne pipete dodajte 25 µl DNR u prvu kolonu mikrotitar pločice za hibridizaciju koja sadržava kalibratore i kontrole kvalitete.
7. S pomoću 8-kanalne pipete dodajte 25 µl DNR2 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju koja sadržava eluat DNK.
8. Poklopcem mikrotitar pločice prekrijte mikrotitar pločicu za hibridizaciju i protresite je 30 sekundi na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min.
9. Postavite mikrotitar pločicu u Microplate Heater I ekvilibriran na 65 ± 2 °C i osigurajte da neće doći do prskanja. Inkubirajte mikrotitar pločicu za hibridizaciju tijekom 45 ± 5 minuta. Za vrijeme inkubacije pripremite mješavinu probe (pogledajte „Mješavina probe”, stranica 33).
10. Uklonite mikrotitar pločicu za hibridizaciju iz grijača Microplate Heater I.

Denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete i eluate DNK možete:

- pohraniti (pogledajte „Opcionalna točka zaustavljanja eluata DNK”, stranica 43)
- odmah testirati (nastavite na „Hibridizacija eluata DNK”, stranica 43)

Opcionalna točka zaustavljanja eluata DNK

Denaturirani eluati DNK, uključujući kalibratore i kontrole kvalitete, pokriveni poklopcem za mikrotitar pločice mogu se čuvati 2 tjedna na temperaturi od 2 – 8 °C.

Hibridizacija eluata DNK

1. Ako je mikrotitar pločica za hibridizaciju koja sadržava denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete i eluate DNK pohranjena, uklonite poklopac mikrotitar pločice i ostavite mikrotitar pločicu za hibridizaciju da dosegne temperaturu od 20 – 25 °C.
2. Temeljito promiješajte mješavinu probe u vorteks miješalici i alikvotirajte je u jednokratni spremnik za reagense.
3. Pažljivo pipetirajte 25 µl mješavine probe u svaku jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju s pomoću 8-kanalne pipete i novih vršaka za svako dodavanje mješavine probe. Izbjegavajte prskanje i dodirivanje bočnih stranica jažica mikrotitar pločice za hibridizaciju.
4. Poklopcem mikrotitar pločice prekrijte mikrotitar pločicu za hibridizaciju i protresite je 3 ± 2 minute na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min.
Nakon obrade u tresilici kalibratori, kontrole kvalitete i eluati DNK trebali bi požutjeti.

Uzorci koji ostanu ljubičasti možda nisu primili odgovarajuću količinu mješavine probe. Dodajte dodatnih 25 µl mješavine probe uzorcima koji su ostali ljubičasti i ponovno ih protresite. Ako uzorak ostane ljubičast nakon tog postupka, ponovno testirajte ispitak.

5. Postavite mikrotitar pločicu u Microplate Heater I ekvilibriran na 65 ± 2 °C i osigurajte da neće doći do prskanja. Inkubirajte mikrotitar pločicu za hibridizaciju tijekom 60 ± 5 minuta.
6. Nastavite na „Hvatanje hibrida”, stranica 50, kako biste nastavili testiranje.

Denaturacija i hibridizacija ispitaka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath

- Kod testiranja ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath, korak denaturacije nije potreban za sve uzorke. Međutim, kalibratori i kontrole kvalitete potrebni za test denaturiraju se prema uputama u nastavku.
- Neki ispitci u transportnom mediju za ispitke mogu sadržavati krv ili drugi biološki materijal koji može maskirati promjene boje nakon dodavanja DNR. Ispitci koji su tamne boje prije dodavanja DNR u ovome koraku možda neće proizvesti odgovarajuću promjenu boje. U tim slučajevima izostanak odgovarajuće promjene boje neće utjecati na rezultat testa. Ispravno miješanje može se provjeriti promatranjem promjene boje kalibratora i kontrola kvalitete.

Denaturacija kalibratora, kontrola kvalitete i ispitaka u transportnom mediju za ispitke

- Nemojte uklanjati pribor za uzimanje ispitaka iz epruvete za ispitke ni u kojem trenutku.
- Kako biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, od iznimne je važnosti da sav materijal ispitaka dođe u kontakt s DNR. Miješanje nakon dodavanja DNR ključan je korak.
- Za ispitke u transportnom mediju za ispitke denaturirane primjenom metode vorteks miješalice MST Vortexer 2 mora se primjenjivati metoda „Hibridizacija s pomoću mikrotitar pločice i grijača Microplate Heater I” na stranici 47. Metoda „Hibridizacija s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji” (stranica 49) nije odobrena za ispitke u transportnom mediju za ispitke denaturirane s pomoću vorteks miješalice MST Vortexer 2.

1. Uklonite čepove s epruveta i bacite ih.

Važno: S čepovima uklonjenima s epruveta u kojima se nalaze ispitci u transportnom mediju za ispitke postupajte kao da su potencijalno infektivni (pogledajte „Upozorenja i mjere opreza”, stranica 20, za dodatne informacije).

2. Pipetirajte određeni volumen (pogledajte Tablica 9 u nastavku) DNR u epruvete s pomoću ponavljajuće ili prilagodljive pipete.

Pazite da ne dodirujete stijenke epruveta jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka.

Važno: Kompleti s 1 i 4 pločice sadržavaju različite volumene kalibratora za visokorizične tipove HPV-a. Pazite da dodate ispravan volumen DNR.

Napomena: Volumen dodanog DNR jednak je polovici volumena tekućine u epruveti.

Tablica 9. Dodavanje DNR

Kalibrator, kontrola kvalitete ili ispitak u transportnom mediju za ispitke	Potreban volumen DNR
Negativni kalibrator, 2 ml	1000 µl
Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a, 1 ml	500 µl
Kalibrator za visokorizične tipove HPV-a, 2 ml	1000 µl
Kontrola kvalitete za niskorizične ili visokorizične tipove HPV-a, 1 ml	500 µl
Ispitak u transportnom mediju za ispitke, 1 ml	500 µl

3. Promiješajte epruvete metodom vorteks miješalice MST Vortexer 2 ili metodom ručnog vrtložnog miješanja pojedinačnih epruveta.

Metoda vorteks miješalice MST Vortexer 2

- Prekrijte epruvete folijom za prekrivanje epruveta DuraSeal prevlačenjem folije preko epruveta na stalku za ispitke.
- Postavite poklopac stalka na epruvete prekrivene folijom i učvrstite ga dvjema bočnim kopčama. Izrežite foliju uređajem za rezanje.
- Pomaknite ručicu s crvenom drškom u GORNJI položaj tako da bude vodoravna.
- Postavite stalak za ispitke čvrsto unutar vodilica na vorteks miješalici MST Vortexer 2 tako da se kut stalka s najvećim urezom nalazi u prednjem desnom kutu. Učvrstite stalak za ispitke pomicanjem ručice s crvenom drškom u „donji” položaj tako da bude okomita.
- Pobrinite se da je postavka brzine postavljena na 100 (maksimalna brzina) te uključite vorteks miješalicu MST Vortexer 2.
- Miješajte epruvete na vorteks miješalici 10 sekundi.
- Isključite vorteks miješalicu MST Vortexer 2.
- Uklonite stalak za ispitke s vorteks miješalice MST Vortexer 2 pomicanjem ručice s crvenom drškom u „gornji” položaj.

Metoda ručnog vrtložnog miješanja pojedinačnih epruveta

- Ponovno začepite epruvete novim navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka.
- Dobro promiješajte svaku epruvetu vrtložnim miješanjem pojedinačnih epruveta velikom brzinom tijekom 5 sekundi.

Važno: Tijekom miješanja mora se vidjeti vidljivi vrtlog tekućine koji oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete.

- Preokrenite svaku epruvetu jedanput kako biste oplahnuli unutrašnjost epruvete, čep i rub.

d. Vratite epruvetu na stalak.

Tekućina u epruveti trebala bi poprimiti ljubičastu boju.

4. Epruvete inkubirajte na stalku u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 ± 2 °C, u trajanju od 45 ± 5 minuta.

Za ručno testiranje pripremite mješavinu probe za vrijeme inkubacije (pogledajte „Mješavina probe”, stranica 33).

5. Izvadite epruvete iz vodene kupelji nakon inkubacije.

Ako upotrebljavate stalak za ispitke, nemojte dopustiti da se ohladi prije nego što uklonite poklopac stalka. Odmah nastavite s testiranjem ili uklonite poklopac stalka i foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal.

Napomena: Ako se stalak za ispitke ohladi, epruvete bi se mogle zalijepiti za poklopac stalka te stoga proliti.

Denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke u transportnom mediju za ispitke možete:

- pohraniti (pogledajte „Opcionalna točka zaustavljanja pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath”, stranica 46)
- odmah testirati (nastavite na „Hibridizacija pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath”, stranica 47)

Opcionalna točka zaustavljanja pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath


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

Svi pripremljeni uzorci, uključujući kalibratore i kontrole kvalitete, mogu se čuvati na temperaturi od $2 - 8$ °C preko noći ili na -20 °C maksimalno 3 mjeseca. Najviše 3 ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja mogu se provesti s najviše 2 sata na sobnoj temperaturi tijekom svakog ciklusa odmrzavanja.

Za čuvanje preko noću u stalku za ispitke na temperaturi od $2 - 8$ °C prekrijte uzorke folijom za prekrivanje epruveta DuraSeal i zamijenite poklopac stalka.

Za čuvanje na -20 °C na stalku za ispitke uklonite poklopac stalka i foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal te postavite odgovarajući čep na epruvete.

Hibridizacija pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath

 Prilikom izvođenja automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS za uzorke u transportnom mediju za ispitke ili ručno pripremljene uzorke postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath pogledajte *Korisnički priručnik za Rapid Capture System* za upute o provedbi testiranja.

Ako su denaturirani kalibratori, kontrole kvalitete i ispitci bili pohranjeni, ostavite ih da dosegnu temperaturu od 20 – 25 °C te, ako su pohranjeni na stalku za ispitke, uklonite čepove s epruveta i bacite ih.

- Za uzorke u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljene uzorke postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath dostupne su dvije metode hibridizacije: „Hibridizacija s pomoću mikrotitar pločice i grijača Microplate Heater I” i „Hibridizacija s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji”.
- Za ispitke u transportnom mediju za ispitke denaturirane primjenom metode vorteks miješalice MST Vortexer 2 mora se primjenjivati „Hibridizacija s pomoću mikrotitar pločice i grijača Microplate Heater I” na stranici 47. „Hibridizacija s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji” (stranica 49) nije odobrena za ispitke u transportnom mediju za ispitke denaturirane s pomoću vorteks miješalice MST Vortexer 2.
- Mješavina probe je viskozna. Pobrinite se da se mješavina probe dobro promiješa i da se potrebna količina u potpunosti dispencira u svaku jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju ili mikroeprevetu za hibridizaciju.
- Prilikom prijenosa uzorka na mikrotitar pločicu za hibridizaciju ili u mikroeprevetu za hibridizaciju izbjegavajte dodirivanje stijenki jažica mikrotitar pločice za hibridizaciju ili mikroepreveta za hibridizaciju jer može doći do lažno pozitivnih rezultata ako se uzorci ne prenose pažljivo. Ograničite stvaranje mjehurića zraka. Upotrebjavajte čisti, ekstra dugačak vršak za pipetu za svaki prijenos kako biste izbjegli križnu kontaminaciju.

Hibridizacija s pomoću mikrotitar pločice i grijača Microplate Heater I

1. Nabavite i označite mikrotitar pločicu za hibridizaciju.
2. Promiješajte u vorteks miješalici primjenom jedne od sljedećih metoda:
Miješanje kalibratora, kontrola kvalitete ili uzoraka u transportnom mediju za ispitke s pomoću vorteks miješalice MST Vortexer 2
 - a. Prema potrebi, prekrijte epruvete folijom za prekrivanje epruveta DuraSeal te učvrstite poklopac stalka na stalku za ispitke.

- b. Promiješajte stalak s ispitcima na vorteks miješalici minimalno 5 sekundi na maksimalnoj postavki brzine.
- c. Odmah postavite stalak s ispitcima na radnu površinu i otpustite zasune. Podignite poklopac stalka približno 1 cm i lagano ga pomičite ulijevo i udesno kako biste otpustili sve epruvete koje su se možda zalijepile za foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal. Uklonite poklopac stalka tako da ga podignete uvis sve dok se ne odvoji od stalka s ispitcima.
- d. Nježno skinite foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal s poklopca stalka i bacite je.

Miješanje uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt ili SurePath s pomoću vorteks miješalice MST Vortexer 2

- a. Prema potrebi, prekrijte epruvete folijom za prekrivanje epruveta DuraSeal te učvrstite poklopac stalka na stalku za ispitke.
- b. Promiješajte stalak za konverziju na vorteks miješalici minimalno 10 sekundi na maksimalnoj postavki brzine.
- c. Odmah postavite stalak s ispitcima na radnu površinu i otpustite zasune. Podignite poklopac stalka približno 1 cm i lagano ga pomičite ulijevo i udesno kako biste otpustili sve epruvete koje su se možda zalijepile za foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal. Uklonite poklopac stalka tako da ga podignete uvis sve dok se ne odvoji od stalka s ispitcima.
- d. Nježno skinite foliju za prekrivanje epruveta DuraSeal s poklopca stalka i bacite je.

Miješanje bilo koje vrste uzoraka vorteks miješalicom

- a. Promiješajte svaku epruvetu pojedinačno vorteks miješalicom najmanje 5 sekundi.
3. S pomoću pipete EXPAND-4 ili jednokanalne pipete s ekstra dugačkim vrškom prenesite 75 µl svakog kalibratora, kontrole kvalitete ili uzorka na dno prazne jažice mikrotitar pločice za hibridizaciju prema izrađenom rasporedu pločice.

Ako će se uzorci čuvati, začeplite denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete ili uzorke u transportnom mediju za ispitke novim navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka i postavite originalni čep za svaki uzorak na uzorke postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath.

Napomena: Čuvajte uzorke u skladu s ograničenjima opisanima u odjeljku „Opcionalna točka zaustavljanja pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath”, stranica 46.

- 4. Nakon što prenesete zadnji uzorak, prekrijte mikrotitar pločicu za hibridizaciju poklopcem mikrotitar pločice i inkubirajte je 10 minuta na temperaturi od 20 – 25 °C.
- 5. Temeljito promiješajte mješavinu probe u vorteks miješalici i alikvotirajte je u jednokratni spremnik za reagense.
- 6. Pažljivo pipetirajte 25 µl mješavine probe u svaku jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju s pomoću 8-kanalne pipete i novih vršaka za svako dodavanje mješavine probe.

Izbjegavajte prskanje i dodirivanje bočnih stranica jažica mikrotitar pločice za hibridizaciju.

7. Poklopcem mikrotitar pločice prekrijte mikrotitar pločicu za hibridizaciju i protresite je 3 ± 2 minute na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min.
Nakon protresanja kalibratori, kontrole kvalitete, uzorci u transportnom mediju za ispitke i uzorci postgradijentnog staničnog taloga SurePath trebali bi poprimiti žutu boju, dok bi uzorci PreservCyt trebali poprimiti ružičastu boju.
Uzorci koji ostanu ljubičasti možda nisu primili odgovarajuću količinu mješavine probe. Dodajte dodatnih 25 μ l mješavine probe uzorcima koji su ostali ljubičasti i ponovno ih protresite. Ako uzorak ostane ljubičast nakon tog postupka, ponovno testirajte ispitak.
8. Postavite mikrotitar pločicu u Microplate Heater I ekvilibriran na 65 ± 2 °C i osigurajte da neće doći do prskanja. Inkubirajte mikrotitar pločicu za hibridizaciju tijekom 60 ± 5 minuta.
9. Nastavite na „Hvatanje hibrida”, stranica 50, kako biste nastavili testiranje.

Hibridizacija s pomoću mikroepreveta i vodene kupelji

1. Označite i postavite željeni broj čistih mikroepreveta za hibridizaciju na stalak za mikroeprevete.
2. Vrtložno promiješajte svaku epruvetu s kalibratorom, kontrolom kvalitete i uzorkom pojedinačno najmanje 5 sekundi prije nego što uklonite uzorak.
3. S pomoću jednokanalne pipete s ekstra dugačkim vrškom prenesite 75 μ l svakog kalibratora, kontrole kvalitete ili uzorka na dno odgovarajuće mikroeprevete za hibridizaciju prema izrađenom rasporedu pločice.

Ako će se uzorci čuvati, začepite denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete ili uzorke u transportnom mediju za ispitke novim navojnim čepovima za epruvete za uzimanje ispitaka i postavite originalni čep za svaki uzorak na uzorke postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath.

Napomena: Čuvajte uzorke u skladu s ograničenjima opisanim u odjeljku „Opcionalna točka zaustavljanja pripremljenih uzoraka u transportnom mediju za ispitke te ručno pripremljenih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga PreservCyt i SurePath”, stranica 46.

4. Nakon što prenesete zadnji uzorak inkubirajte mikroeprevete za hibridizaciju 10 minuta na temperaturi od 20 – 25 °C.
5. Temeljito promiješajte mješavinu probe u vorteks miješalici i alikvotirajte je u jednokratni spremnik za reagense.
6. Pažljivo pipetirajte 25 μ l mješavine probe u svaku mikroeprevetu za hibridizaciju s pomoću 8-kanalne pipete i novih vršaka za svaki redak.

Izbjegavajte prskanje i dodirivanje stijenki mikroepreveta za hibridizaciju.

Pregledajte stalak s donje strane kako biste se uvjerali da se u svim mikroeprevetama za hibridizaciju nalazi ispravna količina mješavine probe.

7. Prekrijte mikroeprove za hibridizaciju folijom za prekrivanje pločica. Postavite poklopac za stalak na stalak. Protresite stalak za mikroeprove 3 ± 2 minute na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min.

Nakon protresanja kalibratori, kontrole kvalitete, uzorci u transportnom mediju za ispitke i uzorci postgradijentnog staničnog taloga SurePath trebali bi poprimiti žutu boju, dok bi uzorci PreservCyt trebali poprimiti ružičastu boju.

Uzorci koji ostanu ljubičasti možda nisu primili odgovarajuću količinu mješavine probe. Dodajte dodatnih 25 µl mješavine probe uzorcima koji su ostali ljubičasti i ponovno ih protresite. Ako uzorak ostane ljubičast nakon tog postupka, ponovno testirajte ispitak.

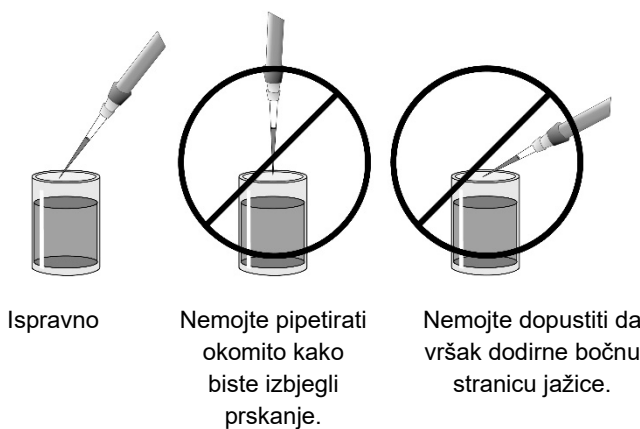
8. Inkubirajte stalak za mikroeprove 60 ± 5 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 65 ± 2 °C. Pobrinite se da je razina vode u vodenoj kupelji dovoljna da bi prekrila cijeli volumen mikroeprove za hibridizaciju.

Napomena: Stalak za mikroeprove plutat će u vodenoj kupelji.

9. Nastavite na „Hvatanje hibrida” kako biste nastavili testiranje.

Hvatanje hibrida

1. S okvira pločice uklonite sve osim potrebnog broja jažica mikrotitar pločice za hvatanje.
2. Vratite neiskorištene jažice mikrotitar pločice za hvatanje u originalnu vrećicu i zatvorite je.
3. Markerom redom numerirajte svaku kolonu i označite mikrotitar pločicu za hvatanje odgovarajućom identifikacijskom oznakom.
Uzorci će se dodavati u jažice mikrotitar pločice za hvatanje prema izrađenom rasporedu pločice.
4. Prema potrebi pažljivo uklonite mikrotitar pločicu za hibridizaciju s grijača Microplate Heater I ili stalak za mikroeprove iz vodene kupelji.
Odmah uklonite poklopac mikrotitar pločice i odložite ga na čistu površinu ili uklonite poklopac stala i polagano povucite foliju za prekrivanje pločica prema gore i preko stala za mikroeprove.
5. S pomoću 8-kanalne pipete prenesite cijeli sadržaj (približno 100 µl) jažica mikrotitar pločice za hibridizaciju ili mikroeprove za hibridizaciju na dno odgovarajućih jažica mikrotitar pločice za hvatanje.
Upotrebljavajte nove vrške za pipete za svaki prijenos i pričekajte da se svaki vršak pipete ocijedi kako biste bili sigurni da ste prenijeli cijeli uzorak. Prema želji, pipete možete umiriti oslanjajući sredinu vrška pipeta o gornji rub jažica mikrotitar pločice za hvatanje (pogledajte Slika 2 u nastavku).



Slika 2. Ispravno pipetiranje.

6. Poklopcem mikrotitar pločice ili novom folijom za prekrivanje pločica prekrijte mikrotitar pločicu za hvatanje i protresite je 60 ± 5 minuta na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min na temperaturi od $20 - 25$ °C.

Za vrijeme inkubacije pripremite pufer za ispiranje (pogledajte „Pufer za ispiranje”, stranica 35).

7. Nakon završetka inkubacije uklonite mikrotitar pločicu za hvatanje s tresilice Rotary Shaker I i pažljivo skinite poklopac mikrotitar pločice ili foliju za prekrivanje pločica.
8. Uklonite tekućinu iz jažica mikrotitar pločice za hvatanje tako da je odlijete u sudoper; potpuno preokrenite mikrotitar pločicu za hvatanje iznad sudopera i snažno je protresite pokretima prema dolje.

Važno: Nemojte ponovno preokretati mikrotitar pločicu.

Pobrinite se da ne prskate pretakanjem preblizu dnu sudopera.

9. Osušite čvrstim tapkanjem 2 – 3 puta na čistim papirnatim ručnicima Kimtowels ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna.

Pobrinite se da uklonite svu tekućinu iz jažica mikrotitar pločice za hvatanje te da je vrh mikrotitar pločice za hvatanje suh.

10. Nastavite na „Otkrivanje hibrida” kako biste nastavili testiranje.

Otkrivanje hibrida

- Reagense dodajte na mikrotitar pločicu za hvatanje u smjeru slijeva udesno s pomoću 8-kanalne pipete. Vrške obrišite na jednokratnom spremniku za reagense kako biste uklonili višak reagensa prije nego što ga prenesete na mikrotitar pločicu.
 - Ako ne upotrebljavate 8-kanalnu pipetu, moguće ju je zamijeniti ponavljajućom pipetom. Alikvotirajte DR1 u polipropilensku epruvetu koja je dovoljno velika da primi potreban volumen.
 - Preporučuje se primjena tehnike obrnutog pipetiranja kako bi se poboljšala dosljednost prijenosa reagensa. Postupak je opisan u nastavku.
 - Prema želji, pipete možete umiriti oslanjajući sredinu vršaka pipeta o gornji rub jažica mikrotitar pločice za hvatanje. Pazite da ne dodirujete bočne stranice jažica mikrotitar pločice za hvatanje jer bi moglo doći do križne kontaminacije uzoraka (pogledajte Slika 2, stranica 51).
1. Dobro promiješajte DR1 i pažljivo premjestite odgovarajući volumen (prema potrebi, pogledajte Tablica 1, stranica 30, ili Tablica 4, stranica 31) u čisti jednokratni spremnik za reagense.
 2. Pažljivo pipetirajte 75 µl DR1 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje primjenom tehnike obrnutog pipetiranja kako slijedi:
 - a. Pričvrstite vrške na 8-kanalnu pipetu; provjerite jesu li svi vršci čvrsto sjeli.
 - b. Gurnite klip pipete preko prvog zaustavnika do drugog zaustavnika.
 - c. Uronite vrške u reagens.
 - d. Polagano otpustite klip i omogućite reagensu da napuni vrške.
 - e. Pipetirajte reagens u jažice mikrotitar pločice pritiskom klipa do prvog zaustavnika. Nemojte otpuštati klip sve dok vršci pipete ne budu uronjeni u reagens.
 - f. Ponovno napunite vrške i ponovite postupak sve dok sve jažice mikrotitar pločice ne budu napunjene.

Provjerite jesu li sve jažice mikrotitar pločice za hvatanje napunjene promatranjem intenziteta ružičaste boje. Sve bi jažice mikrotitar pločice za hvatanje trebale biti ružičaste boje sličnog intenziteta.
 3. Mikrotitar pločicu za hvatanje prekriti poklopcem mikrotitar pločice, čistom folijom Parafilm ili sličnom folijom i inkubirajte je 30 – 45 minuta na temperaturi od 20 – 25 °C.
 4. Nastavite na „Ispranje” kako biste nastavili testiranje.

Ispiranje

Ispirite mikrotitar pločicu za hvatanje primjenom jedne od metoda u nastavku.

Metoda automatiziranog uređaja za ispiranje pločica

Automatizirani uređaj za ispiranje pločica uvijek držite uključenim. Pobrinite se da je spremnik za ispiranje napunjen, a spremnik za otpad prazan. Automatizirani uređaj za ispiranje pločica rutinski će ispirati sustav radi čišćenja. Dodatne upute pogledajte u *Korisničkom priručniku za automatizirani uređaj za ispiranje pločica*.

- Provjerite je li spremnik za ispiranje napunjen puferom za ispiranje barem do oznake za 1 litru. Ako nije, pripremite pufer za ispiranje (pogledajte „Pufer za ispiranje”, stranica 35).
 - Provjerite je li spremnik za ispiranje vodom napunjen deioniziranom ili destiliranom vodom.
 - Provjerite je li spremnik za otpad prazan, a čep čvrsto pričvršćen.
 - Automatizirani uređaj za ispiranje pločica automatski će se pripremiti prije svakog ispiranja i isprati vodom nakon svakog ispiranja.
 - Ako se traka jažica mikrotitar pločice za hvatanje upotrebljava samo djelomično, postavite prazne jažice mikrotitar pločice u mikrotitar pločicu za hvatanje kako biste popunili kolonu prije ispiranja.
1. Uklonite poklopac mikrotitar pločice i postavite mikrotitar pločicu za hvatanje na platformu automatiziranog uređaja za ispiranje pločica.
 2. Provjerite je li automatizirani uređaj za ispiranje pločica uključen i piše li na zaslonu **Digene Wash Ready** (Ispiranje uređaja digene spremno) ili **P1**.
 3. Odaberite broj traka koje je potrebno isprati pritiskom na gumb **Rows** (Redci) te potom pritiskom na **+** ili **-** za prilagodbu.
 4. Pritisnite gumb **Rows** (Redci) za povratak na zaslon **Digene Wash Ready** (Ispiranje uređaja digene spremno) ili **P1**.
 5. Pritisnite gumb **Start/Stop** (Pokreni/Zaustavi) za početak.

Automatizirani uređaj za ispiranje pločica provest će 6 ciklusa punjenja i aspiriranja koji će trajati približno 10 minuta. Za vrijeme programa bit će kratka pauza; nemojte prerano ukloniti mikrotitar pločicu.

Kada automatizirani uređaj za ispiranje pločica završi s ispiranjem, na zaslonu će pisati **Digene Wash Ready** (Ispiranje uređaja digene spremno) ili **P1**.

6. Uklonite mikrotitar pločicu za hvatanje s platforme automatiziranog uređaja za ispiranje pločica kada program završi.

Mikrotitar pločica za hvatanje trebala bi biti bijela, a u jažicama mikrotitar pločice za hvatanje ne bi trebalo biti ostataka ružičaste tekućine.

7. Nastavite na „Amplifikacija signala”, stranica 55, kako biste nastavili testiranje.

Metoda ručnog ispiranja

1. Uklonite DR1 iz jažica mikrotitar pločice za hvatanje postavljanjem čistih papirnatih ručnika Kimtowels ili sličnih papirnatih ručnika koji ne otpuštaju vlakna na vrh mikrotitar pločice za hvatanje.
2. Pobrinite se da papirnati ručnici dodiruju cijelu površinu mikrotitar pločice za hvatanje, a potom je pažljivo preokrenite.
3. Ostavite mikrotitar pločicu za hvatanje da se ocijedi 1 – 2 minute.
4. Dobro je osušite tapkanjem na čistim papirnatim ručnicima Kimtowels ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna.

Pažljivo bacite iskorištene papirne ručnike kako biste izbjegli kontaminaciju alkalnom fosfatazom.

5. S pomoću uređaja za ispiranje ručno isperite mikrotitar pločicu za hvatanje 6 puta.

Za pravilno ispiranje, prenapunite svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje puferom za ispiranje. Time ćete ukloniti DR1 s vrhova jažica mikrotitar pločice za ispiranje. Ispiranje započinje na jažici mikrotitar pločice za hvatanje A1 te se nastavlja vijugavo udesno i prema dolje. Nakon što su sve jažice mikrotitar pločice za hvatanje napunjene, pretočite tekućinu u sudoper snažnim pokretom prema dolje. Drugo ispiranje započinje na jažici mikrotitar pločice za hvatanje H12 te se nastavlja vijugavo ulijevo i prema gore. Taj slijed od 2 ispiranja ponavlja se još 2 puta, što čini ukupno 6 ispiranja po jažici mikrotitar pločice za hvatanje.

6. Nakon ispiranja osušite mikrotitar pločicu za hvatanje tako da je preokrenete na čiste papirne ručnike Kimtowels ili slične papirne ručnike koji ne otpuštaju vlakna i potapkate je čvrsto 3 – 4 puta. Zamijenite papirne ručnike i ponovno je tapkanjem osušite.
7. Ostavite mikrotitar pločicu za hvatanje preokrenutu da se ocijedi 5 minuta. Još jedanput tapkanjem osušite mikrotitar pločicu za hvatanje.

Mikrotitar pločica za hvatanje trebala bi biti bijela, a u jažicama mikrotitar pločice za hvatanje ne bi trebalo biti ostataka ružičaste tekućine.

8. Nastavite na „Amplifikacija signala”, stranica 55, kako biste nastavili testiranje.

Amplifikacija signala

- Upotrijebite novi par rukavica za rukovanje detekcijskim reagensom 2 (DR2).
 - Reagense dodajte na mikrotitar pločicu za hvatanje u smjeru slijeva udesno s pomoću 8-kanalne pipete.
 - Ako ne upotrebljavate 8-kanalnu pipetu, moguće ju je zamijeniti ponavljajućom pipetom. Alikvotirajte DR2 u polipropilensku epruvetu koja je dovoljno velika da primi potreban volumen.
 - Dodajte DR2 bez prekida. Vrijeme inkubacije svih jažica mikrotitar pločice za hvatanje mora biti što je moguće sličnije.
 - Pazite da ne dodirujete bočne stranice jažica mikrotitar pločice za hvatanje ili da ne prskate reagensom po vršcima jer bi moglo doći do križne kontaminacije ispitaka (pogledajte Slika 2, stranica 51).
1. Dobro promiješajte DR2 i premjestite odgovarajući volumen (prema potrebi, pogledajte Tablica 1, stranica 30, ili Tablica 4, stranica 31) u čisti jednokratni spremnik za reagense.
 2. Pažljivo pipetirajte 75 µl DR2 u svaku jažicu mikrotitar pločice za hvatanje primjenom prethodno opisane tehnike obrnutog pipetiranja (pogledajte „Otkrivanje hibrida”, stranica 52). Provjerite jesu li sve jažice mikrotitar pločice za hvatanje ispravno napunjene promatranjem intenziteta žute boje; sve jažice mikrotitar pločice za hvatanje trebale bi biti žute boje sličnog intenziteta.
 3. Prekrijte mikrotitar pločicu za hvatanje poklopcem mikrotitar pločice i inkubirajte je na temperaturi od 20 – 25 °C 15 minuta (a ne dulje od 30 minuta).
Važno: Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
 4. Nastavite na „Mjerenje mikrotitar pločice za hvatanje i generiranje rezultata” kako biste nastavili testiranje.

Mjerenje mikrotitar pločice za hvatanje i generiranje rezultata

1. Izmjerite mikrotitar pločicu za hvatanje s pomoću DML instrumenta.
Pogledajte odgovarajući korisnički priručnik za softver za pojedinosti o mjerenju mikrotitar pločice za hvatanje i generiranju izvješća s rezultatima testa. Softver za analizu ispitivanja *digene* omogućit će unos relevantnih podataka o testu.
2. Ako nije korištena cijela mikrotitar pločica za hvatanje, uklonite iskorištene jažice mikrotitar pločice za hvatanje s okvira mikrotitar pločice, temeljito isperite okvir mikrotitar pločice destiliranom ili deioniziranom vodom, osušite ga i sačuvajte za sljedeći test.
3. Bacite sve alikvote reagensa i pripremljene reagense, osim ako je drugačije navedeno.
Razrijedite preostali DNR u bočici prije odlaganja u skladu s nacionalnim i lokalnim laboratorijskim postupcima.

Tumačenje rezultata

Granična vrijednost (cutoff, CO) ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test od 1 pg/ml jednaka je 100.000 HPV kopija/ml ili 5.000 HPV kopija po ispitivanju.

Rezultati testiranja ispitaka u transportnom mediju za ispitke

Ispitci u transportnom mediju za ispitke s vrijednosti RLU/CO $\geq 1,0$ smatraju se „pozitivnima” na 1 ili više tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.

Ispitci u transportnom mediju za ispitke s vrijednosti RLU/CO $< 1,0$ smatraju se „negativnima” na 13 testiranih tipova HPV-a ili se smatra da „DNK HPV-a nije detektiran”. Sekvenci DNK visokorizičnih tipova HPV-a ili nema ili su razine DNK HPV-a ispod granice detekcije testa.

Rezultati testiranja ispitaka SurePath

Ispitci SurePath s vrijednosti RLU/CO $\geq 1,0$ smatraju se „pozitivnima” na 1 ili više tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.

Ispitci SurePath s vrijednosti RLU/CO $< 1,0$ smatraju se „negativnima” na 13 testiranih tipova HPV-a ili se smatra da „DNK HPV-a nije detektiran”. Sekvenci DNK HPV-a ili nema ili su razine DNK HPV-a ispod granice detekcije testa.

Rezultati testiranja ispitaka PreservCyt

Ispitci PreservCyt s vrijednosti RLU/CO $\geq 1,0$ smatraju se „pozitivnima” na 1 ili više tipova HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68.

Ispitci PreservCyt s vrijednosti RLU/CO $< 1,0$ smatraju se „negativnima” na 13 testiranih tipova HPV-a ili se smatra da „DNK HPV-a nije detektiran”. Sekvenci DNK HPV-a ili nema ili su razine DNK HPV-a ispod granice detekcije testa.

Za ispitke PreservCyt s vrijednosti RLU/CO $\geq 1,0$ i $< 2,5$ tvrtka QIAGEN preporučuje ponovno testiranje ispitka kako slijedi:

- Ako je u prvom ponovnom testiranju vrijednost RLU/CO $\geq 1,0$, prijavite ispitak kao „pozitivan”. Nije potrebno dodatno testiranje.
- Ako je u prvom ponovnom testiranju vrijednost RLU/CO $< 1,0$, potrebno je izvesti i drugo ponovno testiranje (treći rezultat). Drugi rezultat je konačni rezultat ($< 1,0$ je negativan, $\geq 1,0$ je pozitivan) te se on prijavljuje.

Vrijednost RLU/CO blizu 1,0

Ako je vrijednost RLU/CO ispitka blizu, ali manja od 1,0, a sumnja se na infekciju visokorizičnim tipom HPV-a, razmotrite alternativne metode testiranja i/ili ponovno uzimanje ispitka.

Drugi tipovi HPV-a

Budući da ovo ispitivanje otkriva samo visokorizične tipove HPV-a 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68, imajte na umu da u ispitku može biti drugih niskorizičnih tipova HPV-a. Ako testirate specifično prisutnost niskorizičnih tipova HPV-a koji se prenose spolnim putem, upotrijebite *digene* HC2 HPV DNA Test, koji otkriva DNK niskorizičnih i visokorizičnih tipova HPV-a.

Provjera kalibracije ispitivanja

Provjera kalibracije ispitivanja izvodi se kako bismo se uvjerali da reagensi, kalibratori i kontrole kvalitete ispravno funkcioniraju, omogućujući točno određivanje granične vrijednosti (Cutoff, CO) ispitivanja. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zahtijeva kalibraciju ispitivanja za svaki test; stoga je potrebno provjeriti svako ispitivanje. Taj postupak provjere nije namijenjen da služi kao zamjena za interno testiranje kontrole kvalitete. Prihvatljivi rasponi za kalibraciju ispitivanja i kontrole kvalitete utvrđeni su isključivo za DML instrumente koje je odobrila tvrtka QIAGEN.

Kalibraciju ispitivanja automatski izvodi softver za analizu ispitivanja *digene*, a rezultati se ispisuju u izvješće o analizi podataka. Međutim, korisnici s inačicom softvera *digene* Qualitative Software 1.03 ili starijom moraju ručno provesti provjeru kalibracije ispitivanja kako bi se mogli prijaviti rezultati pacijenata. Obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN kako biste dobili više informacija.

Test mora zadovoljavati određene kriterije kalibracije ispitivanja. Ako bilo koji od sljedećih kriterija nije zadovoljen, softver neće tumačiti rezultate ispitaka.

Negativni kalibrator

NC se mora testirati u triplikatu sa svakim testom. Srednji NC mora iznositi ≥ 10 te ≤ 250 RLU, a koeficijent varijacije (Coefficient of Variation, CV) mora iznositi ≤ 25 %. Ako je $CV > 25$ %, softver pomiče RLU vrijednost najdalje od srednje vrijednosti kao stršeću vrijednosti te ponovno računa srednju vrijednost i CV s pomoću preostalih vrijednosti.

Ako CV i dalje iznosi > 25 %, kalibracija ispitivanja nije važeća, a test je potrebno ponoviti za sve ispitke pacijenta. U skladu s tim, ne prijavljujte rezultate ispitaka pacijenata.

Pozitivni kalibrator

HRC se mora testirati u triplicatu sa svakim testom. CV za HRC mora iznositi $\leq 15\%$. Ako je CV $> 15\%$, softver pomiče RLU vrijednost najdalje od srednje vrijednosti kao stršeću vrijednosti te ponovno računa srednju vrijednost i CV s pomoću preostalih vrijednosti.

Ako CV i dalje iznosi $> 15\%$, kalibracija ispitivanja nije važeća, a test je potrebno ponoviti za sve ispitke pacijenta. U skladu s tim, ne prijavljujte rezultate ispitaka pacijenata.

Srednja vrijednost pozitivnog kalibratora / srednja vrijednost negativnog kalibratora

Softver upotrebljava $HRC\bar{X}$ i $NC\bar{X}$ za računanje vrijednosti $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Važeća vrijednost $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ definirana je kao $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$. Ako $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ iznosi $< 2,0$ ili > 15 , kalibracija ispitivanja nije važeća, a test je potrebno ponoviti za sve ispitke pacijenata. U skladu s tim, ne prijavljujte rezultate ispitaka pacijenata.

Izračun granične vrijednosti

Softver za analizu ispitivanja *digene* računa i prijavljuje vrijednost RLU/CO te pozitivne/negativne rezultate za sve ispitke. CO za određivanje pozitivnih ispitaka jest $HRC\bar{X}$. Softver za analizu ispitivanja *digene* upotrebljava RLU vrijednosti ispitka za izražavanje rezultata kao RLU/CO ispitka.

Za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS, protokol ispitivanja sustava RCS za HPV primjenjuje faktor prilagodbe kalibracije (Calibration Adjustment Factor, CAF) od 0,8 na valjani $HRC\bar{X}$. Taj je CAF nužan kako bi radne značajke automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS ostale ekvivalentne ručnom testiranju. CAF se primjenjuje isključivo na rezultate automatiziranog testa s pomoću sustava RCS; stoga je iznimno važno odabrati ispravan protokol ispitivanja kako bi se generirali točni rezultati testa.

Kontrole kvalitete

Uzorci kontrole kvalitete isporučuju se s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test i moraju se upotrebljavati za internu kontrolu kvalitete. Isporučene kontrole kvalitete su klonirane ciljne sekvence DNK HPV-a koje ne potječu od HPV-a divljeg tipa. To je ista vrsta materijala koja se upotrebljava za isporučene kalibratore. Dodatne kontrole kvalitete mogu se testirati u skladu sa smjericama ili zahtjevima nacionalnih ili lokalnih propisa ili akreditacijskih organizacija. Isporučene kontrole kvalitete neće služiti kao odgovarajuća kontrola kvalitete za obradu otopine PreservCyt Solution ili tekućine SurePath Preservative Fluid.

Pogledajte važeći korisnički priručnik softvera za analizu ispitivanja *digene* za upute o unosu serijskih brojeva i rokova trajanja za kontrole kvalitete. Da bi ispitivanje bilo važeće, vrijednost RLU/CO svake kontrole kvalitete mora biti unutar definiranih kriterija kako je navedeno u Tablica 10 u nastavku. Ako kontrole kvalitete nisu unutar tih raspona, ispitivanje je nevažeće i test je potrebno ponoviti. U skladu s tim, ne prijavljujte rezultate pacijenata.

Tablica 10. Kriteriji valjanosti ispitivanja kontrole kvalitete

Kontrola kvalitete	Minimalni RLU/CO	Maksimalni RLU/CO	CV (%)
QC1-LR	0,001	0,999	≤ 25
QC2-HR	2	8	≤ 25

Ograničenja

- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za HPV tipove 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 nije preporučen za procjenu sumnje na seksualno zlostavljanje.
- Prevalencija infekcije HPV-om u populaciji može utjecati na rad. Pozitivne prediktivne vrijednosti smanjuju se kod testiranja populacija s niskom prevalencijom ili pojedinaca kod kojih ne postoji rizik od infekcije.
- Negativan rezultat testa ne isključuje mogućnost infekcije HPV-om jer vrlo niske razine infekcije ili pogreška pri uzimanju ispitka mogu uzrokovati lažno negativan rezultat testa. Također, ovaj test ne otkriva DNK niskorizičnih tipova HPV-a (6, 11, 42, 43 i 44).
- Infekcija HPV-om nije definitivni pokazatelj prisutnosti bolesti vrata maternice visokog stupnja, niti u svim slučajevima ukazuje na to da će se razviti bolest vrata maternice visokog stupnja ili rak.
- Malena količina križne hibridizacije postoji između probe za visokorizične tipove HPV-a i HPV tipova 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 i MM9. Pacijenti čiji ispitci sadržavaju visoke razine tih tipova HPV-a mogu netočno biti upućeni na kolposkopiju (15, 35).
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test osmišljen je za otkrivanje visokorizičnih tipova HPV-a, uključujući 39, 58, 59 i 68. Analitička ispitivanja koja je provela tvrtka QIAGEN primjenom kloniranog plazmidnog DNK HPV-a pokazala su da test otkriva te tipove pri koncentracijama u rasponu od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml. To je ekvivalentno značajkama otkrivanja drugih tipova HPV-a na koje test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test cilja. Tvrtka QIAGEN mogla je potvrditi otkrivanje tih tipova HPV-a tek u ograničenom broju kliničkih ispitaka. Zbog niske prevalencije tih tipova u općoj populaciji (28), radne značajke testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za otkrivanje HPV tipova 39, 58, 59 i 68 nisu statistički potvrđene.
- Ako su u ispitku tijekom njegova prikupljanja u transportni medij za ispitke radi testiranja prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica, kontracepcijskog gela ili irigacijskog sredstva, postoji vjerojatnost da će se dobiti lažno negativan rezultat ako ti ispitci sadržavaju razine DNK HPV-a zbog kojih će vrijednosti RLU/CO biti blizu granične vrijednosti (cutoff, CO) ispitivanja.
- Ako su u cervikalnom ispitku PreservCyt tijekom njegova prikupljanja radi pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica, vaginalnog lubrikanta u gelu ili krvi, postoji vjerojatnost da će se dobiti lažno negativan rezultat ako ti ispitci sadržavaju razine DNK HPV-a zbog kojih su vrijednosti RLU/CO blizu granične vrijednosti (Cutoff, CO) ispitivanja.
- Ako je u cervikalnom ispitku PreservCyt tijekom njegova prikupljanja radi pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit prisutan kontracepcijski gel, može doći do lažno negativnog rezultata testa.

-
- Ako su u cervikalnom ispitku SurePath tijekom njegova prikupljanja radi pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit prisutni kontracepcijski gel, krema protiv gljivica ili protuupalna krema, može doći do lažno negativnog rezultata testa.
 - Križna reaktivnost između probe za visokorizične tipove HPV-a i plazmida pBR322 je moguća. Prisutnost homolognih sekvenci pBR322 zabilježena je u humanim genitalnim ispitcima, a do lažno pozitivnih rezultata moglo bi doći u slučaju prisutnosti visokih razina bakterijskog plazmida.
 - Ako se prilikom provedbe automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS ne obavi vizualni pregled pločice za hibridizaciju kako bi se provjerilo je li ispitak ispravno prenesen te ako se ne isprave svi neodgovarajući prijenosi ispitaka, može doći do lažno negativnih rezultata.

Radne značajke

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

Rezultati 8 neovisnih kliničkih ispitivanja koja su provele istaknute medicinske, akademske i vladine institucije u centrima u SAD-u i u inozemstvu opisani su u nastavku. Ispitivanja su se koristila utvrđenim metodama papa testa koje se primjenjuju u državama u kojima su se ispitivanja provodila. U svim slučajevima osim 2 za tumačenje rezultata papa testova primjenjivan je sustav ocjenjivanja Bethesda. Za ekvivalentnu terminologiju povezanu s rakom vrata maternice u Europskoj zajednici, pogledajte Europske smjernice za osiguranje kvalitete probira raka vrata maternice (36). Osim toga, bolest vrata maternice visokog stupnja dijagnosticirana je primenom kolposkopski navođene biopsije za svako ispitivanje. Ta su ispitivanja ocjenjivala kliničku korisnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u usporedbi s papa testom za starije žene (općenito starije od 30 godina). Sva ispitivanja osim jednog također su provela prospektivno testiranje na HPV s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

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

Radne značajke testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test promatrane u 6 presječnih ispitivanja sažete su (pogledajte tablice 11. i 12. u nastavku) za žene u dobi od 30 godina i više kojima je dijagnosticirana histološki potvrđena cervikalna neoplazija visokog stupnja, koja je definirana kao cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) 3 ili još teži oblik.

Tablica 11. Procjene radnih značajki — osjetljivost i specifičnost

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

* Podaci iz testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ako su bili dostupni, u suprotnom su korišteni podaci visokosadržajnog probira (HCS); podaci su kombinirani.

Tablica 12. Procjene radnih značajki — pozitivna i negativna prediktivna vrijednost

Populacija	n	Prevalencija	Pozitivna prediktivna vrijednost (%)			Negativna prediktivna vrijednost (%)		
		CIN 3 (%)	(n/N)			(n/N)		
		(n/N)	95-postotni CI			95-postotni CI		
		95-postotni CI	Samo papa test	Samo HPV	HPV + papa test	Samo papa test	Samo HPV	HPV + papa test
Zapadna Europa 1	7592	0,36 (27/7592) 0,23 – 0,52	11,1 (14/126) 6,2 – 17,9	8,23 (26/316) 5,5 – 11,8	6,77 (27/399) 4,5 – 9,7	99,83 (7453/7466) 99,7 – 99,9	99,99 (7275/7276) 99,9 – 100,0	100,0 (7193/7193) 99,9 – 100,0
Latinska Amerika 1	6115	1,26 (77/6115) 0,99 – 1,57	37,2 (45/121) 28,6 – 46,4	16,5 (73/442) 13,2 – 20,3	15,8 (75/476) 12,6 – 19,4	99,47 (5962/5994) 99,3 – 99,6	99,93 (5669/5673) 99,8 – 100,0	99,96 (5637/5639) 99,9 – 100,0
Latinska Amerika 2*	6176	1,10 (68/6176) 0,86 – 1,39	12,7 (53/416) 9,7 – 16,3	14,3 (61/427) 11,1 – 18,0	9,4 (64/682) 7,3 – 11,8	99,74 (5745/5760) 99,6 – 99,9	99,88 (5742/5749) 99,8 – 100,0	99,93 (5490/5494) 99,8 – 100,0
Afrika	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
Azija	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
SAD 1	1040	0,19 (2/1040) 0,02 – 0,69	3,85 (1/26) 0,1 – 19,6	4,88 (2/41) 0,6 – 16,5	4,08 (2/49) 0,5 – 14,0	99,90 (1013/1014) 99,5 – 100,0	100,0 (999/999) 99,6 – 100,0	100,0 (991/991) 99,6 – 100,0

* Podaci iz testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ako su bili dostupni, u suprotnom su korišteni podaci visokosadržajnog probira (HCS); podaci su kombinirani.

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

Iako je specifičnost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test niža nego samo za papa test, analiza odnosa vjerojatnosti pokazala je da opaženo smanjenje specifičnosti nije dovoljno značajno da bi utjecalo na kliničku korisnost primjene testa za identificiranje žena koje imaju malen ili nikakav rizik od imanja ili razvijanja bolesti vrata maternice. Ipak, važno je da se odluka o upućivanju pacijenta na kolposkopiju temelji na svim kliničkim podacima i informacijama o riziku te povijesti bolesti pacijenta koji su dostupni liječniku. Važne varijable uključuju povijest infekcija HPV-om i/ili abnormalne rezultate papa testa, dob u kojoj je pacijent imao prvi spolni odnos, broj seksualnih partnera i druge istodobno prisutne spolno prenosive bolesti (37, 38).

Iako prevalencija bolesti visokog stupnja ne varira znatno među ispitivanjima u kojima su određivane radne značajke, prevalencija infekcije HPV-om u populaciji može utjecati na radne značajke i obično varira ovisno o populaciji pacijenata. Osim toga, pokazalo se da se prevalencija infekcije HPV-om dramatično smanjuje s dobi (17, 24 – 29, 38 – 40). Pozitivne prediktivne vrijednosti smanjuju se kod testiranja populacija s niskom prevalencijom ili pojedinaca kod kojih postoji mali rizik od infekcije.

Longitudinalna analiza provedena je primjenom rezultata 2 ispitivanja; jednog koje je u SAD-u proveo američki Nacionalni institut za rak (National Cancer Institute, NCI) u Portlandu, Oregon, i drugog provedenog u Francuskoj u Laboratoriju Pol Bouin C.H.U. de Reims. Te su longitudinalne analize provedene kako bi se dokazalo da pacijenti s negativnim rezultatom papa testa i negativnim rezultatom na HPV imaju manji rizik od obolijevanja od bolesti vrata maternice u usporedbi s tradicionalno definiranim niskorizičnim ženama čiji status HPV-a nije poznat i nije uspoređivan s rezultatima pacijenata koji su imali negativne rezultate papa testa, ali pozitivne rezultate za HPV (pogledajte tablice 13. i 14. u nastavku).

Tablica 13. Longitudinalna analiza — relativan rizik bolesti visokog stupnja

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

*Tri normalna papa testa unutar približno 2 godine.

†Dva normalna papa testa unutar približno 2 godine.

Tablica 14. Longitudinalna analiza — stope bolesti stratificirane prema statusu HPV-a tijekom prvog posjeta

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

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

Kliničke radne značajke prilikom probira pacijenata s rezultatima papa testa ASC-US (neodređenog značenja) za utvrđivanje potrebe za upućivanjem na kolposkopiju

Ispitivanje naziva „Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears” („Korisnost ispitivanja na DNK HPV-a radi trijaže žena s graničnim rezultatima papa testa”) provedeno je 1996. Godine u SAD-u pod vodstvom instituta Kaiser Foundation Research Institute i grupe Kaiser Permanente Medical Group. Cervikalni ispitci za rutinske papa testove i za ispitivanje *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test uzeti su od žena koje su se liječile u nekoliko objekata klinike Kaiser. Početni papa testovi procijenjeni su prema Bethesda klasifikaciji. Za ekvivalentnu terminologiju povezanu s rakom vrata maternice u Europskoj zajednici, pogledajte Europske smjernice za osiguranje kvalitete probira raka vrata maternice (36). Žene (u dobi od 15 godina ili starije) s rezultatima papa testa koji su ukazivali na atipične stanice neodređenog značenja (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) bile su ponovno pozvane na kolposkopiju i biopsiju. Ispitke dobivene kolposkopski navođenom histološkom obradom pregledali su patolozi i donesena je početna dijagnoza. Svaki histološki ispitak također je ponovno pregledao neovisni patolog, a u slučaju nepodudaranja između početnog pregleda i neovisnog pregleda konačnu je odluku donio treći patolog.

Početni je ispitak testiran prototipom ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test koji je sadržavao probe za 11 od 13 tipova HPV-a (ne uključujući HPV tipove 59 i 68). Za takvu se razliku ne bi očekivalo da će rezultirati znatno različitim profilom radnih značajki za test.

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

Među osobama s rezultatom referalnog papa testa ASC-US, negativna prediktivna vrijednost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za otkrivanje HSIL-a ili višeg stupnja bolesti pri kolposkopiji iznosila je 99 % (pogledajte Tablica 15 u nastavku).

Tablica 15. Usporedba ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test i konsenzusne histološke obrade; populacija upućena zbog rezultata papa testa ASC-US; ispitivanje Kaiser, ispitci PreservCyt

		HSIL ili više u vrijeme kolposkopije		Ukupno
		+	-	
Rezultat testa <i>digene</i> HC2 High- Risk HPV DNA Test	+	66	317	383
	-	5	497	502
Ukupno		71	814	885

Osjetljivost [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 95-postotni CI = 84,3 – 97,7
 Specifičnost [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 95-postotni CI = 57,7 – 64,4
 Prevalencija bolesti = 8,0 % (71/885)
 Pozitivna prediktivna vrijednost ispitivanja = 17,2 % (66/383)
 Negativna prediktivna vrijednost ispitivanja = 99,0 % (497/502)

Utvrđuju se teoretske pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti temeljene na različitim prevalencijama za otkrivanje HSIL-a ili bolesti višeg stupnja nakon početnog rezultata ASC-US na temelju rezultata testa na visokorizične tipove HPV-a (pogledajte Tablica 16 u nastavku).

Tablica 16. Teoretska pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testiranja na visokorizične tipove HPV-a za rezultate papa testa ASC-US

Teoretska prevalencija za HSIL	Početni rezultat papa testa ASC-US	
	pozitivna prediktivna vrijednost ispitivanja	Negativna prediktivna vrijednost ispitivanja
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

Određuje se varijacija između različitih dobnih skupina obuhvaćenih ovim ispitivanjem (pogledajte Tablica 17 u nastavku).

Tablica 17. Podaci iz ispitivanja Kaiser: Radne značajke testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u odnosu na rezultate konsenzusne histološke obrade (HSIL) — značajke specifične za dob

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

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

Multicentrično kliničko ispitivanje koje se služi ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test provedeno je na ispitcima prikupljenima iz nekoliko velikih kolposkopskih klinika u sklopu bolnica i medicinskih centara s velikom prevalencijom bolesti vrata maternice i HPV-a (3 centra) na zapadu i jugu SAD-a. Testiranje na HPV provedeno je u 3 ispitivačka centra koja nisu povezana s kolposkopskim klinikama u kojima su ispiti prikupljeni. Populacija za ovo kliničko ispitivanje obuhvaćala je žene kojima su dijagnosticirani LSIL ili HSIL na temelju nedavno provedenog papa testa i koje su upućene na kolposkopsku kontrolu. Od 702 uključene pacijentice, 327 ih je imalo rezultate papa testa više od ASC-US i dostupne adekvatne informacije; 96 ih je imalo konačan status bolesti HSIL ili viši.

Ispitci oljuštenih cervikalnih stanica prikupljeni su priborom *digene* HC2 DNA Collection Device te su zatim smješteni u transportni medij za ispitke ili četkicom za prikupljanje koja je potom isprana u otopini PreservCyt Solution. Ispitci su prikupljeni za vrijeme kolposkopije. Ispitci su testirani ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, a njihovi su rezultati uspoređeni sa statusom bolesti utvrđenim za svaku pacijenticu. Status bolesti temeljio se na rezultatima histološke procjene. Međutim, kada je histološka procjena bila negativna ili u nedostatku rezultata histološke procjene, status bolesti utvrđen je citološkom obradom u vrijeme kolposkopskog pregleda (pogledajte Tablica 18 u nastavku).

Ispitivanje *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test provedeno je u 3 velika metropolitanska medicinska centra koja nisu povezana s centrima u kojima su se prikupljali ispiti tijekom kolposkopije. Citološka obrada provedena je u referentnom patološkom laboratoriju, dok je histološka obrada provedena u institucijama u kojima je obavljena kolposkopija. Rezultati testa uspoređeni su sa statusom bolesti kako bi se ocijenile osjetljivost, specifičnost te negativne i pozitivne prediktivne vrijednosti testa za otkrivanje neoplazije vrata maternice visokog stupnja. Zbog sličnosti između radnih značajki ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za ispitke u transportnom mediju za ispitke i za ispitke u otopini PreservCyt Solution, radne značajke ispitivanja prikazane su samo za otopinu PreservCyt Solution. Nije opažena razlika između rezultata testiranja na visokorizične tipove HPV-a za ispitke u transportnom mediju za ispitke te ispitke PreservCyt.

Tablica 18. Algoritam statusa bolesti pacijenta

Citološki nalaz	Rezultat histološke obrade	Status bolesti
Negativan	Negativan ili nije obavljen*	Negativan
LSIL	Negativan	LSIL
HSIL	Negativan	HSIL
Rak	Negativan	HSIL+
Negativan	LSIL	LSIL
LSIL	Nije obavljen*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Rak	LSIL	LSIL
Negativan	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Nije obavljen*	HSIL
Rak	HSIL	HSIL
Negativan	Rak	HSIL+
LSIL	Rak	HSIL+
HSIL	Rak	HSIL+
Rak	Nije obavljen*	HSIL+
Rak	Rak	HSIL+

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

Provedba ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test utvrđena je na 327 ispitača PreservCyt, od kojih je 96 prikupljeno od žena kojima je dijagnosticirana cervikalna bolest visokog stupnja (pogledajte tablice 19. i 20. u nastavku). Usporedbe su obavljene uključivanjem svih pacijenata uključenih u ispitivanje s abnormalnim rezultatima referalnog papa testa.

Tablica 19. Rezultati testiranja na visokorizične tipove HPV-a

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

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test pokazao je približno 93 % ukupne osjetljivosti za identificiranje žena s neoplazijom visokog stupnja u populaciji upućenoj na kolposkopiju na temelju dijagnoze papa testa LSIL, HSIL ili slične (pogledajte Tablica 20 u nastavku). Test je također pokazao negativnu prediktivnu vrijednost od približno 95 % u toj populaciji.

Tablica 20. Radne značajke testiranja na DNK visokorizičnih tipova HPV-a među pacijentima čiji je rezultat referalnog papa testa LSIL ili viši, a konačni status bolesti HSIL

		Konačni status bolesti		Ukupno
		HSIL	LSIL ili negativno	
Rezultat testa <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Ukupno	96	231	327

Osjetljivost [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
 95-postotni CI = 85,6 – 97,0
 Specifičnost [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
 95-postotni CI = 33,1 – 46,0
 Prevalencija bolesti za referalni LSIL do konačnog HSIL-a = 21,4 %
 Prevalencija bolesti za referalni HSIL do konačnog HSIL-a = 46,6 %
 Ukupna pozitivna prediktivna vrijednost = 38,9 % (89/229)
 Ukupna negativna prediktivna vrijednost = 92,8 % (91/98)

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

Utvrđene su teoretske pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za otkrivanje HSIL-a ili težeg oblika bolesti tijekom kolposkopije nakon početnih rezultata papa testa LSIL ili HSIL (pogledajte Tablica 21 u nastavku).

Tablica 21. Teoretska pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za početne rezultate papa testa LSIL ili HSIL

Teoretska prevalencija za HSIL	Početni rezultat papa testa LSIL ili HSIL	
	Pozitivna prediktivna vrijednost ispitivanja	Negativna prediktivna vrijednost ispitivanja
5	7,4	99,0
10	14,5	97,9
15	21,2	96,8
20	27,6	95,5
25	33,7	94,1
30	39,6	92,6
35	45,1	90,9
40	50,4	89,0
45	55,5	86,8
50	60,4	84,3

Radne značajke za vaginalno ili samostalno prikupljene ispitke

U literaturi citiranoj za radne značajke ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kod samostalno prikupljenih vaginalnih ispitaka preko 141.000 žena u dobi od 16 – 54 godine bila je uključena u ispitivanje. Kohorte ispitivanja uključivale su žene iz Kine (41, 42), Meksika (43, 44) i Ujedinjene Kraljevine (45). Dizajni ispitivanja neznatno su varirali, ali uglavnom je ženama s pozitivnim rezultatom testa bio ponuđen dodatni pregled kolposkopijom, a rezultati su se bilježili u vidu osjetljivosti i specifičnosti u odnosu na komparativnu metodu.

U dva ispitivanja u kojima su podaci bili dostupni za usporedbu samostalno prikupljenih ispitaka i ispitaka koje je prikupio liječnik rezultati ukazuju na visoku osjetljivost za CIN2+ za obje metode (42, 45), 81 – 85 % za samostalno prikupljene ispitke i 96 – 100 % za ispitke koje je prikupio liječnik. Rezultati specifičnosti bili su slični za CIN2+ za obje metode (42, 45), 81 – 82 % za samostalno prikupljene ispitke u odnosu na 83 – 85 % za ispitke koje su prikupili liječnici. U drugim ispitivanjima u kojima su bili dostupni samo podaci za radne značajke za samostalno prikupljene ispitke, osjetljivost ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za CIN2+ bila je 3,4 puta veća nego kod citološke obrade (43) i iznosila je 98 % osjetljivosti prije prilagodbe pristranosti provjere (44).

Analitička osjetljivost

Neklinički panel kloniranog DNK plazmida HPV-a testiran je kako bi se utvrdilo može li se testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test otkriti svaki od 13 tipova HPV-a te kako bi se utvrdila analitička osjetljivost ispitivanja za svaki tip HPV-a. Svaka koncentracija ciljne sekvence HPV-a (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml i 0,2 pg/ml) svakog od 13 tipova DNK HPV-a (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68) testirana je u triplikatu. Srednja vrijednost RLU za svaku koncentraciju svakog tipa HPV-a izračunana je i uspoređena s pozitivnim kalibratorom.

Utvrđena je granica detekcije za svaki tip HPV-a u transportnom mediju za ispitke (pogledajte Tablica 22 u nastavku). Granice detekcije varirale su od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml, ovisno o testiranom tipu HPV-a. Srednja granica detekcije za svih 13 tipova DNK HPV-a iznosila je 1,08 pg/ml uz standardnu devijaciju od 0,05 pg/ml.

Tablica 22. Sažetak granica detekcije osjetljivosti za svaki tip DNK HPV-a u transportnom mediju za ispitke

Tip DNK HPV-a	Koncentracija DNK HPV-a koju je moguće detektirati (pg/ml)	Standardna devijacija	95-postotni 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
Srednja vrijednost (svi tipovi)	1,08	0,05	0,95 – 1,25

Ekvivalencija između vrsta ispitaka

Ekvivalencija između ispitaka u transportnom mediju za ispitke i ispitaka PreservCyt

Ekvivalencija između ispitaka u transportnom mediju za ispitke i ispitaka PreservCyt ispitana je za jednak prinos DNK HPV-a 18. Približno 106 pozitivnih stanica HeLa koje sadržavaju integrirane genome HPV-a 18 dodano je u transportni medij za ispitke te u pool negativnih stanica PreservCyt. Svaki tip ispitka obrađen je u skladu s odgovarajućim postupcima pripreme uzorka i denaturacije za dotični ispitak kako je opisano u odgovarajućim uputama za uporabu te je testiran ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Rezultati su pokazali da je prinos DNK HPV-a 18 iz stanica humanog karcinoma ekvivalentan za dva medija i da priprema uzorka u otopini PreservCyt Solution ne utječe na analitičku osjetljivost testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt i pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Ispitivanja su provedena primjenom ispitaka PreservCyt prikupljenih od subpopulacije žena s normalnim citološkim nalazima (n = 1276) i subpopulacije žena s citološkim nalazom ASC-US ili višim od ASC-US (n = 402). Ručna priprema uzoraka i priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit provedene su za svaki ispitak, nakon čega je uslijedilo automatizirano ispitivanje s pomoću sustava RCS ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (pogledajte Tablica 23 u nastavku).

Tablica 23. Podudaranje rezultata za ispitke PreservCyt između ručne pripreme uzoraka i pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1678)

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
Svi pozitivni	Snažno pozitivno područje RLU/CO ≥ 2,5	Svi negativni	Snažno negativno područje RLU/CO < 0,8
96,0 (409/426)	97,6 (372/381)	96,2 (1204/1252)	99,1 (1173/1184)
93,7 – 97,5	95,6 – 98,8	95,0 – 97,1	98,3 – 99,5

Relativna osjetljivost i specifičnost ispitivanja za ispitke PreservCyt pripremljene s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit snažno koreliraju s rezultatima dobivenima primjenom metode ručne pripreme uzoraka, što dokazuje donja granica 95-postotnog intervala pouzdanosti i za pozitivno i za negativno podudaranje.

Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt i pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Ispitivanja su provedena primjenom ispitaka PreservCyt prikupljenih od subpopulacije žena u dobi od 30 godina ili starijih s normalnim citološkim nalazima (n = 1901) i subpopulacije žena s citološkim nalazom ASC-US (n = 398). Ručna priprema uzoraka i priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit provedene su za svaki ispitak, nakon čega je uslijedilo testiranje ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (pogledajte Tablica 24 u nastavku).

Tablica 24. Podudaranje rezultata za ispitke PreservCyt između ručne pripreme uzoraka i pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (n = 2299)

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
Svi pozitivni	Snažno pozitivno područje RLU/CO \geq 2,5	Svi negativni	Snažno negativno područje RLU/CO $<$ 0,8
92,7 (281/303) 89,3 – 95,2	96,5 (245/254) 93,4 – 98,1	99,1 (1978/1996) 98,6 – 99,4	99,9 (1967/1969) 99,6 – 100,0

Relativna osjetljivost i specifičnost ispitivanja za ispitke PreservCyt pripremljene s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit snažno koreliraju s rezultatima dobivenima primjenom metode ručne pripreme uzoraka, što dokazuje donja granica 95-postotnog intervala pouzdanosti i za pozitivno i za negativno podudaranje.

Ekvivalencija između ispitaka u transportnom mediju za ispitke i ručne pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath

Klinička procjena u dvije faze provedena je primjenom 6 centara u kojima su prikupljeni uzorci i 3 ispitna centra u SAD-u. Pacijenti koji se liječe u klinici za spolno prenosive bolesti, opstetričkoj/ginekološkoj klinici, kolposkopskoj klinici, bolnici ili centru za planiranje obitelji ispunjavali su uvjete za uključivanje u ispitivanje prema unaprijed određenim kriterijima uključivanja i isključivanja. Faza izvedivosti namijenjena za utvrđivanje primjenjive granične vrijednosti testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za uporabu s uzorcima postgradijentnog staničnog taloga SurePath uključivala je približno 400 pacijenata. Faza kliničke provjere, koja je uključivala približno 1500 pacijenata za provjeru odabrane granične vrijednosti započela je nakon što je privremena analiza faze izvedivosti pokazala da je granična vrijednost od 1,0 RLU/CO uz primjenu uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath rezultirala prihvatljivim podudaranjem s rezultatima ispitaka u transportnom mediju za ispitke.

U obje faze procjene upareni cervikalni ispitci SurePath i ispitci u transportnom mediju za ispitke prikupljeni su od svake sudionice koja je za to dala privolu. Ispitak SurePath zatim je poslan u citološki laboratorij radi pripreme stakalca. Nakon citološke pripreme preostali uzorci postgradijentnog staničnog taloga SurePath i odgovarajući ispitci u transportnom mediju za ispitke testirani su ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test uz primjenu granične vrijednosti od 1,0 RLU/CO (pogledajte Tablica 25 u nastavku).

Tablica 25. Podudaranje rezultata za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s rezultatima ispitaka u transportnom mediju za ispitke (sve dobne skupine i citološke klasifikacije) (n = 1490)

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI Snažno pozitivno područje		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI Snažno negativno područje	
Svi pozitivni	RLU/CO \geq 2,5	Svi negativni	RLU/CO $<$ 0,8
93,5	96,4	95,3	96,0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90,7 – 95,6	94,1 – 98,0	93,8 – 96,5	94,6 – 97,1

Relativna osjetljivost i specifičnost ispitivanja za testiranje uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath snažno koreliraju s rezultatima dobivenima testiranjem ispitaka u transportnom mediju za ispitke, što dokazuje donja granica 95-postotnog intervala pouzdanosti i za pozitivno i za negativno podudaranje.

Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath i pripreme uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Ispitivanja su provedena primjenom ispitaka SurePath prikupljenih od sljedećih subpopulacija:

- Žene s normalnim citološkim nalazima (n = 1189)
- Žene s citološkim nalazom ASC-US ili višim od ASC-US (n = 199)

Za svaki je ispitak SurePath provedena priprema uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit i ručna priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga. Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS i testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (pogledajte Tablica 26 u nastavku) provedeno je za svaki od pripremljenih uzoraka.

Tablica 26. Podudaranje rezultata između ručne pripreme uzoraka za uzorke SurePath i pripreme uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1388)

 Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		 Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
 Svi pozitivni	 Snažno pozitivno područje RLU/CO \geq 2,5	 Svi negativni	 Snažno negativno područje 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

Relativna osjetljivost i specifičnost ispitivanja za ispitke SurePath pripremljene s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit snažno koreliraju s rezultatima dobivenima primjenom metode ručne pripreme uzoraka, što dokazuje donja granica 95-postotnog intervala pouzdanosti i za pozitivno i za negativno podudaranje.

Ekvivalencija između ručne pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath i pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Ispitivanja su provedena primjenom ispitaka SurePath prikupljenih od sljedećih subpopulacija:

- Žene s normalnim citološkim nalazima (n = 1200)
- Žene s citološkim nalazom ASC-US ili višim od ASC-US (n = 183)

Ručna priprema uzoraka i priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit provedene su za svaki uzorak postgradijentnog staničnog taloga SurePath, nakon čega je uslijedilo automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS i testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (pogledajte Tablica 27 u nastavku).

Tablica 27. Podudaranje rezultata za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath između ručne pripreme uzoraka i pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1383)

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
Svi pozitivni	Snažno pozitivno područje RLU/CO \geq 2,5	Svi negativni	Snažno negativno područje 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

Relativna osjetljivost i specifičnost ispitivanja za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath pripremljene s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit snažno koreliraju s rezultatima dobivenima primjenom metode ručne pripreme uzoraka, što dokazuje donja granica 95-postotnog intervala pouzdanosti i za pozitivno i za negativno podudaranje.

Podudaranje između metoda testiranja

Multicentrično ispitivanje (n = 2270) provedeno je kako bi se ocijenili rezultati kliničkog ispitivanja s pomoću sustava RCS u usporedbi s rezultatima testiranja primjenom ručne metode. Testiranje je provedeno u 3 centra izvan tvrtke QIAGEN, a ispitci pacijenata prikupljeni su u 5 centara za prikupljanje. Skup podataka sastojao se od 1269 cervikalnih ispitaka prikupljenih u otopini PreservCyt Solution i 1001 ispitka prikupljenog u transportnom mediju za ispitke.

Statistička podudaranja između podudarnih ispitaka testiranih s pomoću sustava RCS i ručnim ispitivanjem izračunana su za dotičnu populaciju pacijenata (pogledajte tablice 28. i 29. u nastavku).

Tablica 28. Sažetak podudaranja između automatiziranog ispitivanja s pomoću sustava RCS i ručnog testiranja — ispiti u transportnom mediju za ispitke (n = 1001)

Citološka klasifikacija	Prevalencija HPV-a (%)	Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
		Sve pozitivno	Snažno pozitivno područje (RLU/CO ≥ 2,5)	Sve negativno	Snažno negativno područje (RLU/CO < 0,8)
UNG* < 30 godina	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
UNG ≥ 30 godina	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
Ostalo	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
Svi ispiti u transportnom mediju za ispitke	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

* UNG = unutar normalnih granica.

Tablica 29. Sažetak podudaranja između automatiziranog ispitivanja s pomoću sustava RCS i ručnog testiranja — ispiti PreservCyt (n = 1269)

Citološka klasifikacija	Prevalencija HPV-a (%)	Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
		Sve pozitivno	Snažno pozitivno područje (RLU/CO ≥ 2,5)	Sve negativno	Snažno negativno područje (RLU/CO < 0,8)
UNG* < 30 godina	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
UNG ≥ 30 godina	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
Ostalo	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
Sve ispiti PreservCyt†	20	96,4 (238/247) 93,2 – 98,3	98,6 (211/214) 96,0 – 99,7	98,5 (1007/1022) 97,6 – 99,2	98,9 (990/1001) 98,0 – 99,4

*UNG = unutar normalnih granica.

† Citološki podaci nisu bili dostupni za 4 pacijentice.

Dodatno kliničko ispitivanje provedeno je primjenom arhiviranih ostatnih ispitaka PreservCyt prikupljenih od subpopulacije žena u dobi od 30 godina ili starijih s normalnim citološkim nalazima (pogledajte Tablica 30 u nastavku) s prevalencijom HPV-a od 4,8 %.

Tablica 30. Sažetak podudaranja između automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS i ručnog testiranja — žene UNG u dobi od 30 godina ili starije (n = 2077)

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
Svi pozitivni	Snažno pozitivno područje (RLU/CO ≥ 2,5)	Svi negativni	Snažno negativno područje (RLU/CO < 0,8)
92,0 (92/100)	91,8 (78/85)	99,3 (1964/1977)	99,7 (1944/1949)
84,84 – 96,48	83,77 – 96,62	98,88 – 99,65	99,40 – 99,92

Dobiveno je 7 nepodudarnih rezultata među rezultatima ručnog testiranja i testiranja s pomoću sustava RCS u snažno pozitivnom području. Početni rezultati ručnog ispitivanja za tih 7 ispitaka bili su izvan preporučenog algoritma ponovnog ispitivanja za ispitke PreservCyt; međutim, budući da je dizajn ispitivanja zahtijevao testiranje svih ispitaka u triplicatu, ponovljeni rezultati bili su dostupni za razrješenje nepodudarnosti.

Podaci iz ponovljenog testiranja za svaki od 7 nepodudarnih ispitaka pokazuju da su svi nepodudarni ispitci negativni na DNK HPV-a (pogledajte Tablica 31 u nastavku). Na temelju ponovljenih negativnih rezultata dobivenih za oba replikata, svaki od početno pozitivnih rezultata ručnog testiranja vjerojatno je bio lažno pozitivan.

Tablica 31. Nepodudarni ispitci PreservCyt za žene u dobi od 30 godina ili više s nalazima UNG (n = 7)

Uzorak	Centar	Ručno testiranje (RLU/CO)			Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS (RLU/CO)		
		Početno	1. ponavljanje	2. ponavljanje	Početno	1. ponavljanje	2. ponavljanje
1	A	2,51	0,08	0,08	0,12	0,17	0,14
2	A	20,18	0,08	0,09	0,19	0,24	0,20
3	A	3,88	0,12	0,11	0,17	0,22	0,22
4	A	9,37	0,09	0,09	0,15	0,21	0,20
5	A	6,01	0,17	0,13	0,25	0,30	0,30
6	B	2,97	0,71	0,99	1,59	0,89	0,90
7	C	11,01	0,16	0,14	0,19	0,15	0,21

Rezultati ovog kliničkog ispitivanja ukazuju na sveukupno podudaranje između automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS i ručnog testiranja primjenom bilo ispitaka u transportnom mediju za ispitke ili ispitaka PreservCyt.

Obnovljivost

Sveukupna obnovljivost ručnog testiranja

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

Tri vanjska laboratorija provela su testiranje s istom serijom kompleta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u 3 različita dana s identičnim panelom za obnovljivost. Panel za obnovljivost uključivao je sljedeće ispitke:

- 12 poolova denaturiranih kliničkih ispitaka u transportnom mediju za ispitke
- 3 poola nedenaturiranih kliničkih ispitaka PreservCyt
- negativni kalibrator
- pozitivni kalibrator za visokorizične tipove HPV-a u koncentracijama od 0,5, 1, 2,5, 5 i 10 pg/ml.

Sve sastavnice panela testirane su u triplikatu svaki dan s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Rezultati pokazuju da je obnovljivost ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s kliničkim ispitcima vrlo dobra (pogledajte Tablica 32 u nastavku).

Tablica 32. Sveukupna obnovljivost — multicentrična obnovljivost (svi postupci u svim centrima)

Statistička mjera	Rezultat
Očekivani pozitivni rezultati s dobivenim pozitivnim rezultatom (95-postotni CI)	100,0% (99,0 – 100,0)
Očekivani pozitivni rezultati s dobivenim negativnim rezultatom (95-postotni CI)	99,0% (97,49 – 99,73)
Podudaranje (95-postotni CI)	99,5% (98,70 – 99,86)
Kapa	0,990

Obnovljivost s kliničkim ispitcima u transportnom mediju za ispitke

Ručno testiranje

Provedeno je ispitivanje kako bi se pristupilo obnovljivosti ručnog ispitivanja kliničkih ispitaka u transportnom mediju za ispitke s pomoću ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Panel od 20 sastavnica koji se sastoji od kliničkih poolova (10 pozitivnih i 10 negativnih) pripremljen je kombiniranjem prethodno testiranih ispitaka u transportnom mediju za ispitke. Ispitci su testirani u replikatima od 4 svakog od 5 dana kako bi se dobilo ukupno 20 replikata po ispitku. Testiranje je provedeno primjenom kombinirane mješavine probe koja se sastojala od probe za visokorizične tipove HPV-a i probe za niskorizične tipove HPV-a. Nije se očekivalo da će se obnovljivost testa razlikovati u slučaju primjene samo mješavine probe u testu Probe Mix u testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Izračunana je srednja vrijednost RLU/CO i 95-postotni CI oko srednje vrijednosti (pogledajte Tablica 33 u nastavku).

Tablica 33. Obnovljivost ispitaka u transportnom mediju za ispitke — ručno testiranje (silazni redoslijed prema srednjoj vrijednosti RLU/CO)

ID ispitka	Srednja vrijednost RLU/CO	95-postotni CI	Pozitivan rezultat testa (%) (n/N)
10	3,18	3,02 – 3,35	100 (20/20)
20	1,43	1,36 – 1,50	100 (20/20)
11	1,25	1,20 – 1,28	100 (20/20)
12	1,21	1,15 – 1,27	100 (20/20)
15	1,20	1,14 – 1,25	100 (20/20)
13	1,07	1,01 – 1,11	80 (16/20)
16	1,06	1,01 – 1,09	75 (15/20)
17	1,04	1,00 – 1,06	80 (16/20)
14	0,98	0,92 – 1,02	45 (9/20)
18	0,92	0,87 – 0,96	20 (4/20)
19	0,72	0,68 – 0,75	0 (0/20)
7	0,40	0,33 – 0,46	0 (0/20)
4	0,38	0,35 – 0,39	0 (0/20)
9	0,37	0,32 – 0,41	0 (0/20)
1	0,35	0,32 – 0,36	0 (0/20)
2	0,35	0,31 – 0,37	0 (0/20)
8	0,32	0,29 – 0,34	0 (0/20)
3	0,30	0,27 – 0,31	0 (0/20)
6	0,27	0,24 – 0,30	0 (0/20)
5	0,26	0,23 – 0,28	0 (0/20)

Za 5 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti, 100 od 100 replikata (100,0 %) bilo je pozitivno. Za 5 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti, 60 od 100 (60 %; 95-postotni CI = 49,7 – 69,6) replikata bilo je pozitivno, a 40 od 100 (40 %) bilo je negativno. Za 10 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više ispod granične vrijednosti, 200 od 200 replikata (100 %) bilo je negativno.

Ti rezultati ukazuju na to da se za ispitke koji su 20 % ili više udaljeni od granične vrijednosti može očekivati da će dati dosljedne rezultate. Ispitci blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ti podaci pokazuju da ručno testiranje ispitaka u transportnom mediju za ispitke ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS

Provedeno je ispitivanje kako bi se procijenila obnovljivost automatiziranog ispitivanja ispitaka u transportnom mediju za ispitke s pomoću sustava RCS i ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test unutar postupka, od dana do dana i među laboratorijima. Panel puliranih kliničkih ispitaka od 16 sastavnica (pogledajte Tablica 34 u nastavku) testiran je primjenom jedne serije reagensa, dvaput na dan u 3 različita dana. Svaka je sastavnica panela testirana u kvadriplikatu.

Tablica 34. Obnovljivost ispitaka u transportnom mediju za ispitke — sastav panela za automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS

Sastavnica panela	Približna vrijednost RLU/CO	Očekivani rezultat testa
1N	< 0,4	Negativan
2N	0,4 – 0,8	Negativan
3P	0,8 – 1,2	Visoko negativan / nisko pozitivan
4P	0,8 – 1,2	Visoko negativan / nisko pozitivan
5P	0,8 – 1,2	Visoko negativan / nisko pozitivan
6P	1,2 – 2,0	Nisko pozitivan
7P	1,2 – 2,0	Nisko pozitivan
8P	1,2 – 2,0	Nisko pozitivan
9P	2,0 – 5,0	Nisko pozitivan
10P	5,0 – 10,0	Srednji pozitivan
11N	< 0,4	Negativan
12N	< 0,4	Negativan
13N	< 0,4	Negativan
14XR	Klinički materijal pozitivan na DNK niskorizičnog HPV-a u kliničkom negativnom poolu u transportnom mediju za ispitke	Visoko negativan / nisko pozitivan
15XR	Plazmid DNK niskorizičnog HPV-a u kliničkom negativnom poolu u transportnom mediju za ispitke	Visoko negativan / nisko pozitivan
16XR	Plazmidna vektorska DNK kontrola u kliničkom negativnom poolu u transportnom mediju za ispitke	Visoko negativan / nisko pozitivan

Dvije sastavnice panela (14XR i 15XR) uključene su radi procjene potencijala za križnu hibridizaciju mješavine probe ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test s ispitcima koji sadržavaju samo DNK niskorizičnih tipova HPV-a 6, 11, 42, 43 i 44. Sastavnica panela 16XR sastojala se od DNK pGEM® u koncentraciji od 1,49 ng/ml i služila je kao vektorska kontrola za sastavnicu panela 15XR. Rezultati ovog testa nisu ukazali na lažno pozitivne rezultate testa zbog prisutnosti DNK niskorizičnih tipova HPV-a u kliničkim ispitcima. Ti su rezultati u skladu s ručnim testiranjem.

Obnovljivost je izračunana prema metodi E5-A koju je opisao NCCLS (Nacionalni odbor za kliničke laboratorijske standarde) (46) (pogledajte Tablica 35 u nastavku). Ta metoda zahtijeva proračun komponenata varijance za svaki od izvora varijabilnosti: laboratorij, dan, postupak i pogreška (definirani kao varijacija unutar ispitivanja i varijacija između ispitivanja).

Tablica 35. Obnovljivost ispitaka u transportnom mediju za ispitke — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS; kvantitativna obnovljivost

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija				Ukupno	Ukupni CV (%)
			Unutar postupka	Između postupaka	Između dana	Između laboratorija		
1N	72	0,13	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	15,10
2N	72	0,36	0,03	0,01	0,03	0*	0,04	11,69
3P	72	0,96	0,06	0,06	0,04	0*	0,09	9,55
4P	72	1,03	0,06	0,18	0,06	0*	0,19	18,81
5P	72	1,41	0,11	0,14	0,15	0,06	0,24	17,00
6P	72	1,73	0,10	0,27	0*	0,11	0,31	18,10
7P	72	1,74	0,12	0,21	0*	0*	0,24	13,78
8P [†]	70	1,95	N/P [‡]	N/P [‡]	N/P [‡]	N/P [‡]	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

* Komponente negativne varijance postavljene su tako da su jednake nuli.

[†] Dva nevažna replikata za sastavnicu panela 8P onemogućila su analizu komponenata varijance zbog nejednakih veličina skupina koje su se uspoređivale.

[‡] N/P: analiza varijance nije moguća zbog manjeg broja replikata nego što je drugih sastavnica panela.

Obnovljivost kliničkih ispitaka PreservCyt

Ručno testiranje

Obnovljivost ručnog ispitivanja ispitaka PreservCyt s pomoću ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test utvrđena je ispitivanjem u kojem su upotrijebljena 24 lažna ispitka s različitim koncentracijama DNK HPV-a. Ispitci su se sastojali od otopine PreservCyt Solution i bijelih krvnih stanica s bakterijama koje su sadržavale plazmid HPV-a 16 i bez njih.

Ispitci su testirani u replikatima od 4 svakog od 5 dana kako bi se dobilo ukupno 20 replikata po ispitku. Svakog od 5 dana ispitivanja pripremljeno je 8 ml uzorka iz svakog ispitka prema uputama za uporabu kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit te su uzorci testirani. Izračunana je srednja vrijednost i 95-postotni CI (pogledajte Tablica 36 u nastavku).

Tablica 36. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — ručno testiranje s ručnom pripremom uzoraka; kvalitativna obnovljivost (silazni redosljed prema srednjoj vrijednosti RLU/CO)

ID ispitka	Srednja vrijednost RLU/CO	95-postotni CI	Pozitivan rezultat testa (%) (n/N)
21	3,51	3,19 – 3,83	100 (20/20)
12	1,58	1,48 – 1,69	100 (20/20)
13	1,42	1,32 – 1,52	100 (20/20)
17	1,38	1,23 – 1,53	90 (18/20)
18	1,36	1,23 – 1,48	95 (19/20)
15	1,32	1,16 – 1,49	85 (17/20)
23	1,17	1,06 – 1,27	75 (15/20)
16	1,14	1,07 – 1,20	75 (15/20)
20	1,10	0,96 – 1,21	85 (17/20)
19	1,06	0,95 – 1,17	45 (9/19)
22	1,05	0,99 – 1,10	70 (14/20)
11	1,04	0,96 – 1,11	65 (13/20)
14	0,94	0,86 – 1,01	25 (5/20)
24	0,77	0,73 – 0,81	0 (0/20)
3	0,28	0,25 – 0,30	0 (0/20)
1	0,27	0,24 – 0,30	0 (0/20)
7	0,27	0,25 – 0,30	0 (0/20)
2	0,27	0,25 – 0,28	0 (0/20)
5	0,26	0,24 – 0,28	0 (0/20)
4	0,24	0,22 – 0,25	0 (0/20)
9	0,23	0,21 – 0,25	0 (0/20)
8	0,22	0,18 – 0,27	0 (0/20)
10	0,22	0,20 – 0,25	0 (0/20)
6	0,19	0,17 – 0,21	0 (0/20)

Za 6 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti, 114 od 120 replikata (95,0 %) bilo je pozitivno. Za 7 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti, 88 od 139 (63,3 %; 95-postotni CI = 54,3 – 70,9) replikata bilo je pozitivno, a 51 od 139 (36,7 %) bilo je negativno. Za 4 ispitka unutar 10% iznad ili ispod granične vrijednosti, 41 od 79 (51,9 %) replikata bilo je pozitivno, a 38 od 79 (48,1 %) bilo je negativno. Za 11 ispitaka sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više ispod granične vrijednosti, 220 od 220 replikata (100 %) bilo je negativno.

Ti rezultati ukazuju na to da se za ispitke koji su 20 % ili više udaljeni od granične vrijednosti može očekivati da će dati dosljedne rezultate. Ispitci blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ti podaci pokazuju da ručno testiranje ispitaka PreservCyt ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS s ručnom pripremom uzoraka

Interno ispitivanje automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS provedeno je na kliničkim ispitcima PreservCyt dobivenima većinom od žena s citološkim nalazom ASC-US ili višim od ASC-US (prevalencija HPV-a 57 %). Ispitci su podijeljeni u 2 alikvota; svaki alikvot je potom pojedinačno obrađen primjenom kompleta *digene* HC2 Sample Conversion Kit i testiran u duplikatu ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Kao i kod drugih kvalitativnih IVD ispitivanja, varijabilnost rezultata ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test dobivenih od kliničkih ispitaka povezuje se prvenstveno s jednim od sljedećih parametara ili njihovom kombinacijom: uzimanje uzoraka, priprema uzoraka i postupak ispitivanja. Budući da su uspoređivani rezultati testa dobiveni od istog kliničkog ispitka, dizajn ispitivanja kontrolirao je varijabilnost koja proizlazi iz uzimanja uzoraka. Obnovljivost rezultata dobivenih od 2 zasebno pripremljena alikvota uzoraka iz istog kliničkog ispitka (u nastavku navedeno kao „između pripremljenih alikvota”) odražava varijaciju zbog kombinacije pripreme uzoraka i postupka testiranja. Obnovljivost rezultata dobivenih od istog alikvota uzoraka (u nastavku navedeno kao „unutar pripremljenog alikvota”) odražava varijaciju koja proizlazi samo iz postupka testiranja (pogledajte Tablica 37 u nastavku).

Tablica 37. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS s ručnom pripremom uzoraka; kvalitativna obnovljivost

Analiza	Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)	
	(n/N)	(n/N)	(n/N)	
	95-postotni CI	95-postotni CI	95-postotni CI	
Unutar pripremljenog alikvota	Svi podaci	99,62 (261/262)	94,7 (160/169)	97,7 (421/431)
		97,9 – 100,0	90,1 – 97,5	95,8 – 98,9
	Snažna pozitivna i snažna negativna područja	100,0 (249/249)	98,2 (160/163)	99,3 (409/412)
	98,5 – 100,0	94,7 – 99,6	97,9 – 99,9	
Između pripremljenog alikvota	Svi podaci	99,6 (264/265)	98,2 (163/166)	99,1 (427/431)
		97,9 – 100,0	94,8 – 99,6	97,6 – 99,8
	Snažna pozitivna i snažna negativna područja	100,0 (249/249)	99,4 (161/162)	99,8 (410/411)
	98,5 – 100,0	96,6 – 100,0	98,7 – 100,0	

Dodatno ispitivanje provedeno je kako bi se procijenila kvantitativna obnovljivost rezultata dobivenih automatiziranim testiranjem s pomoću sustava RCS simuliranih ispitaka PreservCyt. U testiranju su sudjelovala tri ispitna centra, uključujući QIAGEN.

Svaki ispitni laboratorij obavio je i automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS i ručno testiranje s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test dvaput na dan tijekom 5 različitih dana s dobivenim panelom za obnovljivost od 6 sastavnica. Svaka se sastavnica panela sastojala od uzgojenih stanica dodanih u otopinu PreservCyt Solution namijenjenu da pruži približnu vrijednost RLU/CO (pogledajte Tablica 38 u nastavku).

Sastavnice panela pozitivne na DNK HPV-a pripremljene su dodavanjem različitih količina SiHa stanica pozitivnih na DNK HPV-a (iz laboratorijske stanične linije). Negativne sastavnice panela sastojale su se od Jurkat stanica negativnih na HPV (iz druge laboratorijske stanične linije). Konačna stanična koncentracija svih 6 sastavnica panela iznosila je približno 5×10^4 stanica/ml.

Tablica 38. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS s ručnom pripremom uzoraka; sastavnice panela za kvantitativnu obnovljivost

Sastavnica panela	Vrsta stanice	Približna vrijednost RLU/CO	Očekivani rezultat testa
1N	Jurkat	< 1,0	Negativan
2N	Jurkat	< 1,0	Negativan
3P	SiHa i Jurkat	5,0 – 8,0	Nisko pozitivan
4P	SiHa i Jurkat	5,0 – 8,0	Nisko pozitivan
5P	SiHa	30,0 – 50,0	Srednji pozitivan
6P	SiHa	200,0	Visoko pozitivan

Obnovljivost je izračunana prema metodi E5-A koju je opisao NCCLS (Nacionalni odbor za kliničke laboratorijske standarde) (46) (pogledajte Tablica 39 u nastavku). Ta metoda zahtijeva proračun komponenata varijance za svaki od izvora varijabilnosti: laboratorij, dan, postupak i pogreška (definirani kao varijacija unutar ispitivanja i varijacija između ispitivanja). Svaka od 6 sastavnica panela testirana je u kvadrilikatu u svakom od 10 postupaka (2 postupka na dan tijekom 5 dana testiranja) u svakom od 3 ispitna laboratorija.

Tablica 39. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS s ručnom pripremom uzoraka; kvantitativna obnovljivost

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija				Ukupno	Ukupni CV (%)
			Unutar postupka	Između postupaka	Između dana	Između laboratorija		
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

* Komponente negativne varijance postavljene su tako da su jednake nuli.

Kako bi se ovo početno ispitivanje obnovljivosti dopunilo podacima za ispitke koji su vrlo blizu granične vrijednosti ispitivanja, provedeno je dodatno precizno ispitivanje u centru izvan tvrtke QIAGEN s pomoću sustava RCS.

Panel se sastojao od 1 negativne, 2 negativne ili nisko pozitivne te 2 nisko pozitivne sastavnice. Svaka je sastavnica panela pripremljen dodavanjem uzgojenih Jurkat i SiHa stanica u otopinu PreservCyt Solution kako bi pružio ciljne vrijednosti RLU/CO (pogledajte Tablica 40 u nastavku).

Taj je vanjski centar proveo automatizirano ispitivanje s pomoću sustava RCS primjenom jedne serije reagensa za ispitivanje *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za svaki postupak ispitivanja, provodeći ispitivanje 2 puta na dan u 3 različita dana s dobivenim panelom sa simuliranim ispitcima PreservCyt od 5 sastavnica. Svaka je sastavnica panela podijeljena na 4 uzorka i sva su 4 uzorka testirana na istoj mikrotitar pločici (pogledajte Tablica 41 u nastavku).

Tablica 40. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS s ručnom pripremom uzoraka; sastavnice panela za kvantitativnu obnovljivost blizu granične vrijednosti ispitivanja

Sastavnica panela	Približna vrijednost RLU/CO	Očekivani rezultat testa
1N	0,2	Negativan
2N	0,8 – 1,2	Visoko negativan / nisko pozitivan
3P	0,8 – 1,2	Visoko negativan / nisko pozitivan
4P	1,2 – 2,0	Nisko pozitivan
5P	1,2 – 2,0	Nisko pozitivan

Tablica 41. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS s ručnom pripremom uzoraka; kvantitativna obnovljivost blizu granične vrijednosti ispitivanja

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija			Ukupno	Ukupni CV (%)
			Unutar postupka	Između postupaka	Između dana		
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

* Komponente negativne varijance postavljene su tako da su jednake nuli.

Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Provedeno je interno ispitivanje pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit na kliničkim ispitcima PreservCyt prikupljenima od žena s jednim od dvaju sljedećih citoloških nalaza:

- ASC-US ili viši od ASC-US
- nalaz negativan na intraepitelnu leziju ili malignitet (NILM)

Dva su uzorka uklonjena iz svakog ispitka. Svaki je uzorak zasebno pripremljen s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit nakon čega su rezultati utvrđeni automatiziranim testiranjem na sustavu RCS s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Kao i kod drugih kvalitativnih IVD ispitivanja, varijabilnost rezultata ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test dobivenih od kliničkih ispitaka povezuje se prvenstveno s jednim od sljedećih parametara ili njihovom kombinacijom: uzimanje uzoraka, priprema uzoraka i postupak ispitivanja. Budući da su uspoređivani rezultati testa dobiveni od istog kliničkog ispitka (navedeno kao „između uzoraka”), dizajn ispitivanja kontrolirao je varijabilnost koja proizlazi iz uzimanja uzoraka. Obnovljivost rezultata (pogledajte Tablica 42 u nastavku) dobivenih od 2 zasebno pripremljena uzorka iz istog kliničkog ispitka odražava varijaciju koja proizlazi iz pripreme uzoraka i postupka testiranja.

Tablica 42. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost među uzorcima

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	Ukupno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI
99,0 (95/96) 94,3 – 99,8	96,4 (161/167) 92,4 – 98,3	97,3 (256/263) 94,6 – 98,7

Dodatno ispitivanje provedeno je kako bi se procijenila obnovljivost rezultata s pomoću simuliranih ispitaka PreservCyt. Nakon pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit uslijedilo je automatizirano testiranje na sustavu RCS s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Osam pozitivnih sastavnica panela pripremljeno je dodavanjem SiHa ili HeLa stanica pozitivnih na DNK HPV-a u stanice C-33 A negativne na DNK HPV-a u otopini PreservCyt Solution, dok su 2 sastavnice panela negativne na DNK HPV-a sadržavale samo stanice C-33 A negativne na DNK HPV-a.

Tri različita rukovatelja provela su testiranje u jednome danu na 3 različita instrumenta QIASymphony SP i s 3 različite serije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit sa sastavnicama panela 2N, 3E, 5P, 7P i 9P. Sastavnice panela 2N, 3E, 5P i 7P testirane su s 18 replikata u 3 različita postupka, čime su dobivene 54 podatkovne točke za svaku sastavnicu panela. Sastavnica panela 9P testirana je sa 16 replikata u 3 različita postupka, čime je dobiveno 48 podatkovnih točaka.

Jedan rukovatelj proveo je *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test u 3 različita dana na 3 različita instrumenta QIASymphony SP i s jednom serijom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit sa sastavnicama panela 1N, 4E, 6P, 8P i 10P. Sastavnice panela 1N, 4E, 6P i 8P testirane su s 18 replikata u 8 različitih postupaka, čime su dobivene 144 podatkovne točke za svaku sastavnicu panela. Sastavnica panela 10P testirana je sa 16 replikata u 8 različitih postupaka, čime je dobiveno 128 podatkovnih točaka.

Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti, 572 od 572 (100,0 %) su bila pozitivna. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti, 98 od 198 (49,5 %) bilo je pozitivno, a 100 od 198 (50,5 %) bilo je negativno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više ispod granične vrijednosti, 198 od 198 (100,0 %) bilo je negativno (pogledajte Tablica 43 u nastavku).

Tablica 43. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost

Sastavnica panela	Vrsta stanice	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija	pozitivan rezultat testa (%) (n/N)
1N	C-33 A	0,37	0,05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0,41	0,06	0 (0/54)
3E	HeLa i C-33 A	0,81	0,11	6 (3/54)
4E	SiHa i C-33 A	1,09	0,18	66 (95/144)
5P	HeLa i C-33 A	3,17	0,46	100 (54/54)
6P	SiHa i C-33 A	4,81	0,74	100 (144/144)
7P	HeLa i C-33 A	6,77	0,97	100 (54/54)
8P	SiHa i C-33 A	9,41	1,39	100 (144/144)
9P	HeLa i C-33 A	13,72	2,81	100 (48/48)
10P	SiHa i C-33 A	28,13	5,08	100 (128/128)

Ti rezultati ukazuju na to da se za ispitke koji su 20 % ili više udaljeni od granične vrijednosti može očekivati da će dati dosljedne rezultate. Ispitci blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ti podaci pokazuju da priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit nakon koje slijedi testiranje ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Rezultati internog ispitivanja također su upotrijebljeni za procjenu kvantitativne obnovljivosti rezultata dobivenih nakon pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit (pogledajte Tablica 44 i Tablica 45 u nastavku).

Tablica 44. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost s istim rukovateljem

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija			Procijenjena ukupna standardna devijacija	Procijenjeni ukupni CV (%)
			Unutar postupaka	Između postupaka	Između kombinacija*		
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

* između kombinacija instrumenata QIASymphony SP i različitih dana.

Tablica 45. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost u istome danu

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija		Procijenjena ukupna standardna devijacija	Procijenjeni ukupni CV (%)
			Unutar postupaka	Između postupaka†		
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

† Postupak se sastoji od kombinacije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit, instrumenta QIASymphony SP i rukovatelja.

Kvantitativna obnovljivost vrlo je visoka, na što ukazuju sve vrijednosti koeficijenta varijacije (Coefficient of Variation, CV) koje ostaju ispod 25 %. Standardne devijacije između postupaka mogu se usporediti s odgovarajućom vrijednosti unutar postupaka, što ukazuje na dosljedne rezultate neovisno o upotrijebljenom instrumentu ili seriji kompleta.

Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Provedeno je interno ispitivanje pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit na kliničkim ispiticima PreservCyt prikupljenima od žena s citološkim nalazom ASC-US ili NILM. Dva su uzorka uklonjena iz svakog ispitka. Svaki je uzorak zasebno pripremljen s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit nakon čega su rezultati utvrđeni automatiziranim testiranjem na sustavu RCS s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Kao i kod drugih kvalitativnih IVD ispitivanja, varijabilnost rezultata ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test dobivenih od kliničkih ispitaka povezuje se prvenstveno s jednim od sljedećih parametara ili njihovom kombinacijom: uzimanje uzoraka, priprema uzoraka i postupak ispitivanja. Budući da su uspoređivani rezultati testa dobiveni od istog kliničkog ispitka (navedeno kao „između uzoraka”), dizajn ispitivanja kontrolirao je varijabilnost koja proizlazi iz uzimanja uzoraka. Obnovljivost rezultata (pogledajte Tablica 46 u nastavku) dobivenih od 2 zasebno pripremljena uzorka iz istog kliničkog ispitka odražava varijaciju koja proizlazi iz pripreme uzoraka i postupka testiranja.

Tablica 46. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; kvalitativna obnovljivost među uzorcima

Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95-postotni CI	95-postotni CI	95-postotni CI
95,3	96,7	96,2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89,4 – 98,0	92,3 – 98,5	93,3 – 97,9

Dodatno ispitivanje provedeno je kako bi se procijenila obnovljivost rezultata s pomoću simuliranih ispitaka PreservCyt. Nakon pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit uslijedilo je automatizirano testiranje na sustavu RCS s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tri različita rukovatelja provela su test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test na različite dane primjenom različitih instrumenata i različitih serija reagensa s panelom s 9 sastavnica. Svaka je sastavnica panela testirana u duplikatu u 24 različita postupka, čime je dobiveno 48 podatkovnih točaka za svaku sastavnicu panela. Osam pozitivnih sastavnica panela pripremljeno je dodavanjem SiHa ili HeLa stanica pozitivnih na DNK HPV-a u stanice H9 negativne na DNK HPV-a u otopini PreservCyt Solution, dok je jedna sastavnica panela negativna na DNK HPV-a sadržavala samo stanice H9 negativne na DNK HPV-a.

Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti, 237 od 240 (98,8 %) bilo je pozitivno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti, 95 od 144 (66,0 %) bilo je pozitivno, a 49 od 144 (34,0 %) bilo je negativno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više ispod granične vrijednosti, 48 od 48 (100,0 %) bilo je negativno (pogledajte Tablica 47 u nastavku).

Tablica 47. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; kvalitativna obnovljivost

Sastavnica panela	Vrsta stanice	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija	Positivan rezultat testa (%) (n/N)
1N	H9	0,17	0,03	0 (0/48)
2E	H9 i HeLa	1,00	0,16	56 (27/48)
3E	H9 i HeLa	1,16	0,57	54 (26/48)
4E	H9 i SiHa	1,18	0,23	88 (42/48)
5P	H9 i SiHa	1,89	0,20	100 (48/48)
6P	H9 i HeLa	2,05	0,43	96 (46/48)
7P	H9 i SiHa	2,97	0,45	100 (48/48)
8P	H9 i HeLa	5,67	0,61	100 (48/48)
9P	H9 i SiHa	9,91	1,63	98 (47/48)

Ti rezultati ukazuju na to da se za ispitke koji su 20 % ili više udaljeni od granične vrijednosti može očekivati da će dati dosljedne rezultate. Ispitci blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ti podaci pokazuju da priprema uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit nakon koje slijedi testiranje ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Rezultati internog ispitivanja također su upotrijebljeni za procjenu kvantitativne obnovljivosti rezultata dobivenih nakon pripreme uzoraka za ispitke PreservCyt s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (pogledajte Tablica 48 u nastavku).

Tablica 48. Obnovljivost ispitaka PreservCyt — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; kvantitativna obnovljivost

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija			Procijenjena ukupna standardna devijacija	Procijenjeni ukupni CV (%)
			Unutar postupaka	Između postupaka	Između kombinacija*		
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

* Između kombinacija kompleta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kits, upotrijebljenog sustava RCS, upotrijebljenog instrumenta QIASymphony SP i rukovatelja.

Obnovljivost kliničkih ispitaka SurePath

Ručno testiranje

Obnovljivost ručnog testiranja uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test utvrđena je u ispitivanju u 3 različita laboratorija. Sastavnice panela testirane su primjenom granične vrijednosti od 1,0 RLU/CO u različite dane i različitim postupcima primjenom identičnog skupa sastavnica panela poznatog pozitivnog ili negativnog statusa za HPV. Panel se sastojao od 5 pozitivnih, 2 visoko negativne / nisko pozitivne te 5 negativnih sastavnica.

Svaka sastavnica panela pripravljena je kombiniranjem jedinstvenih kliničkih ispitaka prikupljenih u tekućinu SurePath Preservative Fluid s poznatim negativnim i pozitivnim statusom za HPV kako bi se dobile željene ciljne vrijednosti RLU/CO. Svaka sastavnica panela testirana je u duplikatu dvaput na dan u razdoblju od 5 dana u svakom od 3 laboratorija koji su sudjelovali (pogledajte Tablica 49 u nastavku).

Tablica 49. Obnovljivost uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath — ručno testiranje; kvalitativna obnovljivost

Sastavnica panela	Srednja vrijednost RLU/CO	Pozitivan rezultat testa (%) (n/N)
1	0,20	0,0 (0/60)
2	0,21	0,0 (0/60)
3	0,22	0,0 (0/60)
4	0,28	3,3 (2/60)
5	0,36	3,3 (2/60)
6	0,83	21,7 (13/60)
7	1,17	43,3 (26/60)
8	19,47	100,0 (60/60)
9	25,65	100,0 (60/60)
10	81,52	100,0 (60/60)
11	154,18	100,0 (60/60)
12	765,29	100,0 (60/60)

Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS

Obnovljivost rezultata za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath dobivenih automatiziranim testiranjem s pomoću sustava RCS uspoređena je s rezultatima dobivenima ručnim testiranjem. Testirana su dva zasebna alikvota iz istog obrađenog uzorka postgradijentnog staničnog taloga SurePath (iz istog ispitka) (pogledajte Tablica 50 u nastavku).

Tablica 50. Obnovljivost uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath — automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS; podudaranje rezultata između automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS i ručnog testiranja

Pozitivno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI		Negativno podudaranje (%) (n/N) 95-postotni CI	
Svi pozitivni	Snažno pozitivno područje (RLU/CO ≥ 2,5)	Svi negativni	Snažno negativno područje (RLU/CO < 0,80)
99,0 (417/421)	100,0 (375/375)	97,7 (1057/1079)	98,7 (1050/1064)
97,6 – 99,7	99,0 – 100,0	96,9 – 98,75	97,8 – 99,28

Priprema uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Provedeno je ispitivanje kako bi se procijenila obnovljivost rezultata s pomoću simuliranih ispitaka SurePath. Nakon pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit uslijedilo je automatizirano testiranje na sustavu RCS s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Četiri pozitivne sastavnice panela pripravljene su dodavanjem SiHa stanica pozitivnih na DNK HPV-a u stanice H9 negativne na DNK HPV-a u tekućini SurePath Preservative Fluid, dok je jedna sastavnica panela negativna na DNK HPV-a sadržavala samo stanice H9 negativne na DNK HPV-a u tekućini SurePath Preservative Fluid.

Tri različita rukovatelja provela su testiranje u 6 različitim dana na 3 različita instrumenta QIASymphony SP i s 3 različite serije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit sa sastavnicama panela 1N, 2E, 3P, 4P i 5P. Sastavnice panela 1N, 2E, 3P i 4P testirane su s 18 replikata u 37 različitih postupaka, čime je dobiveno 666 podatkovnih točaka za sastavnice 2E i 3P te 665 podatkovnih točaka za sastavnice panela 1N i 4P. Sastavnica panela 5P testirana je sa 16 replikata u 37 različitih postupaka, čime je dobiveno 590 podatkovnih točaka. Četiri su podatkovne točke isključene zbog nedovoljnog volumena kako je označio instrument QIASymphony SP za vrijeme pripreme uzoraka.

Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti, 1921 od 1921 (100,0 %) bilo je pozitivno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti, 410 od 666 (61,6 %) bilo je pozitivno, a 256 od 666 (38,4 %) bilo je negativno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više ispod granične vrijednosti, 664 od 665 (99,8 %) bilo je negativno (pogledajte Tablica 51 u nastavku).

Tablica 51. Obnovljivost ispitaka SurePath — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost

Sastavnica panela	Vrsta stanice	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija	Pozitivan rezultat testa (%) (n/N)
1N	H9	0,38	0,06	0,2 (1/665)
2E	SiHa i H9	1,06	0,17	61,6 (410/666)
3P	SiHa i H9	4,51	0,78	100,0 (666/666)
4P	SiHa i H9	8,34	1,57	100,0 (665/665)
5P	SiHa i H9	24,69	5,12	100,0 (590/590)

Ti rezultati ukazuju na to da se za ispitke SurePath koji su 20 % ili više udaljeni od granične vrijednosti može očekivati da će dati dosljedne rezultate. Ispitci SurePath blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ti podaci pokazuju da priprema uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit nakon koje slijedi testiranje ispitivanjem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Rezultati internog ispitivanja također su upotrijebljeni za procjenu kvantitativne obnovljivosti rezultata dobivenih nakon pripreme uzoraka za ispitke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Tri različita rukovatelja provela su testiranje u 6 različitim dana na 3 različita instrumenta QIASymphony SP i s 3 različite serije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit sa sastavnicama panela 1N, 2E, 3P, 4P i 5P. Sastavnice panela 1N, 2E, 3P i 4P testirane su s 18 replikata, čime su dobivene 162 podatkovne točke za svaku sastavnicu panela. Sastavnica panela 5P testirana je sa 16 replikata, čime su dobivene 144 podatkovne točke (pogledajte Tablica 52 u nastavku).

Tablica 52. Obnovljivost ispitaka SurePath — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija			Procijenjena ukupna standardna devijacija	Procijenjeni ukupni CV (%)
			Unutar postupaka	Između dana	Između kombinacija*		
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

* Postupak se sastoji od kombinacije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit, instrumenta QIASymphony SP i rukovatelja na određeni dan.

Kvantitativna obnovljivost vrlo je visoka, na što ukazuju sve vrijednosti koeficijenta varijacije (Coefficient of Variation, CV) koje ostaju ispod 26%. Standardne devijacije između postupaka mogu se usporediti s odgovarajućom vrijednosti unutar postupaka, što ukazuje na dosljedne rezultate neovisno o upotrijebljenom instrumentu ili seriji kompleta.

Priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Provedeno je ispitivanje kako bi se procijenila obnovljivost rezultata s pomoću simuliranih uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath. Nakon pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit uslijedilo je automatizirano testiranje na sustavu RCS s pomoću testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Materijal stanične kulture u 70-postotnoj tekućini SurePath Preservative Fluid upotrijebljen je kako bi oponašao uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath. Četiri pozitivne sastavnice panela pripremljene su dodavanjem SiHa stanica pozitivnih na DNK HPV-a u stanice H9 negativne na DNK HPV-a u tekućini SurePath Preservative Fluid, dok je jedna sastavnica panela negativna na DNK HPV-a sadržavala samo stanice H9 negativne na DNK HPV-a u tekućini SurePath Preservative Fluid.

Četiri različita rukovatelja provela su testiranje u 6 različitim dana na 3 različita instrumenta QIASymphony SP i s 3 različite serije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit sa sastavnicama panela 1, 2, 3, 4 i 5. Sastavnice panela 1, 2, 3 i 4 testirane su s 18 replikata u 37 različitih postupaka, čime je dobiveno 666 podatkovnih točaka za sastavnice panela 1 i 3 te 665 podatkovnih točaka za sastavnice panela 2 i 4. Dvije su podatkovne točke isključene zbog nedovoljnog volumena kako je označio instrument QIASymphony SP za vrijeme pripreme uzoraka. Sastavnica panela 5 testirana je sa 16 replikata u 37 različitih postupaka, čime su dobivene 592 podatkovne točke.

Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više iznad granične vrijednosti, 1923 od 1923 (100,0 %) bilo je pozitivno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO unutar 20 % iznad ili ispod granične vrijednosti, 416 od 665 (62,6 %) bilo je pozitivno, a 249 od 665 (37,4 %) bilo je negativno. Za sastavnice panela sa srednjom vrijednosti RLU/CO na 20 % ili više ispod granične vrijednosti, 666 od 666 (100 %) bilo je negativno (pogledajte Tablica 53 u nastavku).

Tablica 53. Obnovljivost uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvalitativna obnovljivost

Sastavnica panela	Vrsta stanice	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija	CV (%)	Pozitivan rezultat testa (%) (n/N)
1	H9	0,12	0,02	18,77	0,0 (0/666)
2	SiHa i H9	0,96	0,11	11,15	62,6 (416/665)
3	SiHa i H9	4,72	0,56	11,89	100,0 (666/666)
4	SiHa i H9	9,34	0,98	10,46	100,0 (665/665)
5	SiHa i H9	24,9	3,37	13,55	100,0 (592/592)

Ti rezultati ukazuju na to da se za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath koji su 20 % ili više udaljeni od granične vrijednosti može očekivati da će dati dosljedne rezultate. Uzorci postgradijentnog staničnog taloga SurePath blizu granične vrijednosti dali su približno jednake brojeve pozitivnih i negativnih rezultata. Ti podaci pokazuju da priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit nakon koje slijedi testiranje testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test daje obnovljive rezultate.

Rezultati internog ispitivanja također su upotrijebljeni za procjenu kvantitativne obnovljivosti rezultata dobivenih nakon pripreme uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Četiri različita rukovatelja provela su testiranje u 6 različitim dana na 3 različita instrumenta QIASymphony SP i s 3 različite serije kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit sa sastavnicama panela 1, 2, 3, 4 i 5. Sastavnice panela 1, 2, 3 i 4 testirane su s 18 replikata, čime su dobivene 162 podatkovne točke za svaku sastavnicu panela. Sastavnica panela 5 testirana je sa 16 replikata, čime su dobivene 144 podatkovne točke (pogledajte Tablica 54 u nastavku).

Tablica 54. Obnovljivost uzoraka postgradijentnog staničnog taloga SurePath — priprema uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit; kvantitativna obnovljivost

Sastavnica panela	n	Srednja vrijednost RLU/CO	Standardna devijacija			Procijenjena ukupna standardna devijacija	Procijenjeni ukupni CV (%)
			Unutar postupaka	Između dana	Između kombinacija*		
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

* Između kombinacija različitih dana, rukovatelja, serija kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit i instrumenata QIASymphony SP.

Kvantitativna obnovljivost vrlo je visoka, na što ukazuju sve vrijednosti koeficijenta varijacije (Coefficient of Variation, CV) koje ostaju ispod 20%. Standardne devijacije između postupaka mogu se usporediti s odgovarajućom vrijednosti unutar postupaka, što ukazuje na dosljedne rezultate neovisno o upotrijebljenom instrumentu ili seriji kompleta.

Križna reaktivnost

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

Testirane su sljedeće bakterije i sve su imale negativne rezultate u testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter Iwoffii* (ATCC® 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 or 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* (soj Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*

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

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

Testirani su sljedeći virusni ili plazmidni DNK ili humani serum i svi su imali negativne rezultate u testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

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

Jedini plazmid koji je pokazao križnu reaktivnost u testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test bio je pBR322. Križna reaktivnost između pBR322 i mješavine probe nije neočekivana jer je prilikom izoliranja umetka HPV-a teško ukloniti sav vektorski pBR322 DNK. Prisutnost homolognih sekvenci pBR322 zabilježena je u humanim genitalnim ispitcima, a do lažno pozitivnih rezultata moglo bi doći u slučaju prisutnosti visokih razina bakterijskog plazmida. Međutim, 298 kliničkih ispitaka koji su nakon provedenog ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test bili pozitivni nije imalo pozitivne rezultate zbog pBR322 kada su ispitani probom pBR322. Stoga se vjerojatnost da će rezultat ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test biti lažno pozitivan zbog homolognih sekvenci pBR322 u kliničkim ispitcima čini niskom.

Križna hibridizacija

Osamnaest različitih tipova HPV-a (visokorizičnih i niskorizičnih) testirano je testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pri koncentracijama od 4 ng/ml DNK HPV-a. Sve ciljne sekvence visokorizičnih tipova HPV -a bile su pozitivne. Ovo je ispitivanje također pokazalo da postoji malena količina križne hibridizacije između HPV tipova 6 i 42 i testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Ispitci pacijenata s visokim razinama (4 ng/ml ili višim) HPV tipova 6 ili 42 mogu dati lažno pozitivne rezultate ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Klinički je značaj toga da će pacijenti s razinama HPV tipova 6 ili 42 od 4 ng/ml ili višima možda biti nepotrebno upućeni na kolposkopiju.

Također se pokazalo da test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test križno reagira s HPV tipovima 40, 53 i 66. Ti su tipovi rijetki i ne postoji dovoljno dokaza kako bi se utvrdila točna korelacija između infekcije tim tipovima i razvoja bolesti visokog stupnja (15). U literaturi je također zabilježeno da kompleksne probe slične onima koje se upotrebljavaju u ovom testu mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate zbog križne hibridizacije s HPV tipovima 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ili MM9 (35). Premda nekoliko od tih tipova HPV-a predstavlja rijetke ili nove tipove koji se ne susreću često kod bolesti visokog stupnja, pacijenti čiji ispitci sadržavaju visoke razine DNK tih tipova HPV-a mogu biti netočno upućeni na kolposkopiju.

Učinak krvi i drugih tvari na ispitke u transportnom mediju za ispitke

Učinak krvi i drugih potencijalno interferirajućih definiranih ili nedefiniranih tvari procijenjen je testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Puna krv, irigacijsko sredstvo, krema protiv gljivica i kontracepcijski gel (sredstva koja se često mogu naći u cervikalnim ispitcima) dodani su pozitivnim i negativnim ispitcima u transportnom mediju za ispitke (poolovi kliničkih ispitaka i neklinički ispitci) u koncentracijama koje se mogu pronaći u cervikalnim ispitcima.

Nisu zabilježeni lažno pozitivni rezultati ni s kojim od četiri sredstva ni u kojoj koncentraciji. Međutim, lažno negativni rezultat može se prijaviti u kliničkim ispitcima s razinama DNK HPV-a blizu granične vrijednosti za test (1 pg/ml) ako su prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica ili kontracepcijskog gela. No, vrlo je malo vjerojatno da će se klinički ispitak gotovo u potpunosti sastojati od jedne od tih tvari jer se vrat maternice rutinski čisti prije uzimanja ispitaka za papa test ili za testiranje na HPV.

Učinak krvi i drugih tvari na ispitke PreservCyt

Ručna priprema uzoraka

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

Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit

Učinci krvi i drugih potencijalno interferirajućih tvari u ispitcima PreservCyt ocijenjeni su primjenom kompleta QIAAsymphony DSP HPV Media Kit za pripremu uzoraka i automatiziranog ispitivanja s pomoću sustava RCS te ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Testirani su učinci sljedećih potencijalno interferirajućih tvari:

- Krema protiv gljivica
- Protuupalna krema
- Krv
- Kontracepcijski gel
- Irigacijsko sredstvo
- Dezodorans u čepićima za intimnu njegu
- Lubrikant u gelu
- Spermicid

Svaka je tvar dodana negativnim i pozitivnim kliničkim poolovima. Nisu zabilježeni lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati ni sa kojom od tvari u koncentracijama u kojima ih je moguće naći u cervikalnim ispitcima. Međutim, lažno negativni rezultat može se prijaviti u kliničkim ispitcima s razinama DNK HPV-a blizu granične vrijednosti za test ako su prisutne visoke koncentracije kreme protiv gljivica, vaginalnog lubrikanta u gelu ili krvi. No, vrlo je malo vjerojatno da će se klinički ispitak gotovo u potpunosti sastojati od jedne od tih tvari jer se vrat maternice rutinski čisti prije uzimanja ispitaka za papa test ili za testiranje na HPV.

Priprema uzoraka s pomoću kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit

Učinak pune krvi u ispitcima PreservCyt ocijenjen je primjenom kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit za pripremu uzoraka i ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test za testiranje. Vidljivo krvavi klinički ispiti odabrani su i testirani primjenom metode ručne pripreme uzoraka i metode automatizirane pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit. Uspoređeni su rezultati za 238 ispitaka te je dobiveno ukupno podudaranje od 94,12 % i McNemarova p vrijednost od 0,2850, što ukazuje na to da ne postoji statistički značajna razlika u kliničkim radnim značajkama između metode ručne pripreme uzoraka i metode automatizirane pripreme uzoraka s pomoću kompleta QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit.

Testirani su učinci sljedećih potencijalno interferirajućih tvari:

- Irigacijsko sredstvo
- Krema protiv gljivica
- Kontracepcijski gel
- Mononuklearne stanice iz periferne krvi (PBMC)

- Lubrikant u gelu
- Dezodorirajući sprej za intimnu njegu
- Spermicid
- Magnetske čestice
- Tekućina TopElute Fluid

Svaka je tvar dodana to negativnom i pozitivnom staničnom poolu u koncentracijama u kojima se može naći u cervikalnim ispitcima ili u kojima bi mogla biti dodana tijekom pripreme uzoraka. Nisu zabilježeni lažno pozitivni rezultati ni sa kojom tvari ni u kojoj koncentraciji. Nisu zabilježeni lažno negativni rezultati uz iznimku kontracepcijskog gela.

Ne prikupljajte cervikalni ispitak PreservCyt za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP AXpH DNA Kit ako je u njemu prisutan kontracepcijski gel.

Učinak krvi i drugih tvari na ispitke SurePath

Priprema uzoraka za uzorke SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Učinci krvi i drugih potencijalno interferirajućih tvari u uzorcima SurePath ocijenjeni su primjenom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit za pripremu uzoraka i automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS te testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Testirani su učinci sljedećih potencijalno interferirajućih tvari:

- Krema protiv gljivica
- Protuupalna krema
- Krv
- Kontracepcijski gel
- Irigacijsko sredstvo
- Dezodorans u čepićima za intimnu njegu
- Lubrikant u gelu
- Spermicid

Svaka je tvar dodana negativnim i pozitivnim kliničkim poolovima. Nisu zabilježeni lažno pozitivni rezultati ni sa kojom od tvari u koncentracijama u kojima ih je moguće naći u cervikalnim ispitcima.

Nisu zabilježeni lažno negativni rezultati uz iznimku sljedećih tvari:

- Kontracepcijski gel uzrokovao je lažno negativne rezultate pri vrlo niskoj koncentraciji.
- Ako je u ispitku prisutna visoka koncentracija kreme protiv gljivica, lažno negativni rezultat može biti prijavljen za kliničke ispitke s razinama DNK HPV-a blizu granične vrijednosti za test. No, vrlo je malo vjerojatno da će se klinički ispitak gotovo u potpunosti sastojati od kreme protiv gljivica jer se vrat maternice rutinski čisti prije uzimanja ispitaka za papa test ili za testiranje na HPV.

Ne prikupljajte cervikalni ispitak SurePath za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit ako su u njemu prisutni krema protiv gljivica ili kontracepcijski gel.

Priprema uzoraka za uzorke postgradijentnog staničnog taloga SurePath s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit

Učinci krvi i drugih potencijalno interferirajućih tvari u uzorcima postgradijentnog staničnog taloga SurePath ocijenjeni su primjenom kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit za pripremu uzoraka i automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS te testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Testirani su učinci sljedećih potencijalno interferirajućih tvari:

- Krema protiv gljivica
- Protuupalna krema
- Krv
- Kontracepcijski gel
- Irigacijsko sredstvo
- Dezodorans u čepićima za intimnu njegu
- Lubrikant u gelu
- Spermicid

Svaka je tvar dodana negativnim i pozitivnim kliničkim poolovima koji su zatim obrađeni na sustavu BD PrepMate System kako bi oponašali uzorak postgradijentnog staničnog taloga SurePath. Zabilježen je po jedan lažno pozitivan rezultat za krv i kremu protiv gljivica; međutim, statistička je analiza pokazala da nema značajne interferencije. Nisu zabilježeni lažno pozitivni rezultati ni sa kojom drugom tvari u koncentracijama u kojima ih je moguće naći u cervikalnim ispitcima.

Lažno negativni rezultati zabilježeni su za kremu protiv gljivica, protuupalnu kremu i kontracepcijski gel. Ne prikupljajte cervikalni ispitak SurePath za automatiziranu pripremu uzoraka s pomoću kompleta QIASymphony DSP HPV Media Kit ako su u njemu prisutni krema protiv gljivica, protuupalna krema ili kontracepcijski gel.

Prijenos

Sustav RCS osmišljen je kako bi minimizirao kontaminaciju ispitaka ili prijenos ostatne alkalne fosfataze uporabom jednokratnih vršaka za pipete za aspiraciju reagensa i ispitaka. Kako bi potvrdila ovu značajku dizajna, tvrtka QIAGEN provela je nekoliko ispitivanja kako bi ocijenila povećava li uporaba sustava RCS potencijal za prijenos ili križnu kontaminaciju ispitaka u usporedbi s ručnom metodom. Više instrumenata RCS upotrijebljeno je kako bi se ocijenio potencijal za prijenos sa sustava na sustav.

U jednom je ispitivanju materijalu negativne kontrole dodano 2 ng i 20 ng plazmida DNK HPV-a za pripremu visoko pozitivnih ispitaka u transportnom mediju za ispitke. Koncentracija od 20 ng/ml dala je vrijednosti RLU približno 3 – 5 puta više od onih koje su se očekivale za najviši pozitivni klinički ispitak tijekom rutinskog kliničkog ispitivanja. Ti su simulirani visoko pozitivni ispiti postavljeni na mikrotitar pločici u uzorku šahovnice te su se izmjenjivali s jažicama koje su sadržavale samo negativnu kontrolu (testne jažice). Taj je dizajn razmatrao potencijalne aditivne učinke uzastopnih visoko pozitivnih ispitaka. Mikrotitar pločice zatim su testirane primjenom ručne metode i metode automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS. Nakon obrade uspoređeni su brojevi lažno pozitivnih testnih jažica. Automatizirano testiranje s pomoću sustava RCS nije proizvelo više testnih jažica s lažno pozitivnim rezultatom nego ručno ispitivanje s navedenim simuliranim ispiticima u transportnom mediju za ispitke, čak ni kad je mikrotitar pločica sadržavala slijed iznimno visoko pozitivnih ispitaka.

U drugoj ocjeni prijenosa, ispiti PreservCyt pacijenata pozitivnih na HPV kombinirani su kako bi se izradio panel ispitaka s različitim razinama kemiluminiscencije radi dobivanja vrijednosti RLU/CO koje su reprezentativne za raspon očekivan tijekom rutinskog kliničkog automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS. Pozitivni ispiti imali su približan raspon 200 – 1800 RLU/CO. Kako bi se ocijenio potencijalni prijenos, uključujući potencijalne aditivne učinke uzastopnih visoko pozitivnih ispitaka, pozitivne sastavnice panela postavljene su na mikrotitar pločice u uzorku šahovnice pokraj jažica s negativnim kontrolama. Te su pločice zatim testirane primjenom metode automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS.

Rezultati ove ocjene prijenosa, pri kojoj su se upotrebljavali poolovi ispitaka pacijenata, upućuju na potencijalnu lažno pozitivnu stopu od 0,3 % zbog učinka prijenosa prilikom provođenja automatiziranog ispitivanja s pomoću sustava RCS i ispitivanja *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Iskustvo tvrtke QIAGEN u provođenju testova s poolovima ispitaka PreservCyt ukazuje na to da puliranje ispitaka PreservCyt pacijenata stvara ispitke koji ne pokazuju karakteristike slične ispiticima pojedinačnih pacijenata. Iako učinci ovog puliranja na potencijal automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS za prijenos nisu poznati, dodatna pretklinička ispitivanja automatiziranog testiranja s

pomoću sustava RCS nisu ukazala na povećani potencijal za dobivanje lažno pozitivnih rezultata zbog prijenosa. Te su procjene provedene primjenom umjetnih ispitaka plazmida s koncentracijama DNK gotovo 5 puta višima od onih zabilježenih u kliničkom okruženju.

U trećoj ocjeni prijenosa izrađeni su testni ispitci dodavanjem fluorescentne boje u koncentracijama reprezentativnima za dinamički raspon vrijednosti RLU ispitivanja u pozadinske matrice čija je viskoznost približno odgovarala onoj kliničkih ispitaka i reagensa za ispitivanje *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Ti su testni ispitci zatim obrađeni primjenom 3 zasebna instrumenta RCS te je ocijenjen potencijal za prijenos svakog od sljedećih ključnih koraka postupka sustava RCS:

- prijenos ispitka
- prijenos s pločice na pločicu
- dodavanje probe
- protresanje mikrotitar pločice
- ispiranje mikrotitar pločice

Rezultirajuća fluorescencija izmjerena je pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 485 nm i emisijskoj valnoj duljini od 535 nm te je bila dovoljno osjetljiva za otkrivanje događaja prijenosa reda veličine 1:20.000, koji bi odgovarao lažno pozitivnom rezultatu s testom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (tj., 1 pg u 20 ng). Rezultati te ocjene nisu pokazali nijedan događaj prijenosa tijekom bilo kojeg od ključnih koraka postupka sustava RCS koji bi doveo do lažno pozitivnih rezultata testa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Stabilnost reagensa na sustavu

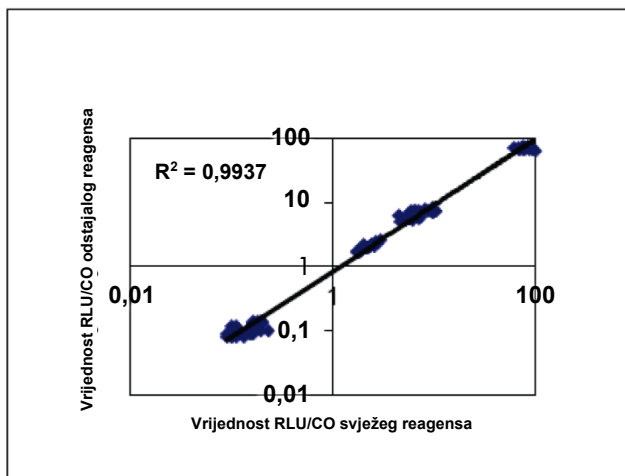
Tvrтка QIAGEN ocijenila je radne značajke automatiziranog testiranja s pomoću sustava RCS prilikom uporabe reagensa koji su ostali na platformi sustava tijekom duljih razdoblja. Reagensi za koje je najvjerojatnije da će biti podložni produljenom držanju na sustavu uključuju mješavinu probe, DR1, DR2 i mikrotitar pločicu za hvatanje.

Radne značajke testa procijenjene su primjenom svježe pripremljenih reagensa i reagensa koji su ostavljeni da odstoje na instrumentu RCS pri sobnoj temperaturi u razdoblju od 16 sati (kako bi simulirali 2 radne smjene u laboratorijskom okruženju). Testiranje simuliranih kliničkih ispitaka provedeno je na 2 instrumenta RCS na svaki od 2 dana testiranja s definiranom matricom reagensa (pogledajte Tablica 55 u nastavku).

Tablica 55. Dizajn ispitivanja za stabilnost reagensa na sustavu

Instrument RCS	1. dan	2. dan
1	Odstajali reagensi	Svježi reagensi
2	Svježi reagensi	Odstajali reagensi

Grafikon svih podatkovnih točaka RLU/CO prikazan je na Slika 3 u nastavku. Grafikon i regresijska analiza za odstajale reagense nasuprot svježima ukazuju na podudaranje između odstajalih i svježih reagensa.



Slika 3. Grafikon raspršenosti koji prikazuje usporedbu vrijednosti kalibratora i kontrolnih vrijednosti ispitivanja primjenom odstajalih i svježih reagensa.

Dodatna analiza rezultata podudaranja pokazuje da se kvalitativni rezultati nisu promijenili prilikom uporabe odstajalih reagensa (pogledajte Tablica 56 u nastavku).

Tablica 56. Podudaranje između svježih i odstajalih reagensa

Statistička mjera	Rezultat
Ukupno podudaranje (%)	100,0%
(n/N)	(96/96)
95-postotni CI	97,97 – 100,0
Pozitivno podudaranje (%)	100,0%
(n/N)	(64/64)
95-postotni CI	97,97 – 100,0
Negativno podudaranje (%)	100,0%
(n/N)	(32/32)
95-postotni CI	97,97 – 100,0
R ²	0,9937
Nagib	0,97
Sjecište	0,47
Kapa	1,0

Analiza podataka pokazala je da su rezultati statistički identični za svježe i odstajale reagense, što ukazuje na to da su reagensi dovoljno stabilni kad ih se postavi na instrument u razdoblju od 16 sati.

Reference

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

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












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

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

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

Simboli

Simboli u sljedećoj tablici primjenjuju se na povezanim naljepnicama proizvoda.

Simbol	Definicija simbola
 96/384	Sadržava dovoljno za 96/384 testova
	Kôd serije
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Simbol s oznakom CE-IVD
	Kataloški broj
	Proizvođač
	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici
	Upotrijebiti do
	Ograničenje temperature
	Prije upotrebe pročitajte upute
	Globalni broj trgovačke jedinice

Vodič za rješavanje problema

Komentari i prijedlozi

Neispravna promjena boje ili izostanak promjene boje zabilježeni tijekom denaturacije

- | | |
|---|--|
| a) DNR nije ispravno pripremljen | Pobrinite se da DNR sadržava indikatorsku boju te da je tamnoljubičaste boje. |
| b) DNR nije dodan | Provjerite je li DNR dodan ispitku mjerenjem volumena ispitka (očekivani volumen je 1,5 ml). Ako volumen ukazuje na to da DNR nije dodan, ispravno ga dodajte, promiješajte i nastavite s testom ako nakon toga opazite ispravnu promjenu boje. |
| c) Ispitak sadržava krv ili druge materijale koji maskiraju promjenu boje | Točno opisana promjena boje ne očekuje se s ovim vrstama ispitaka; to ne bi trebalo štetno utjecati na rezultate testa. |
| d) pH vrijednost ispitka mogla bi biti neuobičajeno kisela | Ako nije prisutan nijedan drugi uzrok, ispitak je možda neuobičajeno kiseo te se stoga očekivana promjena boje neće dogoditi. Uzmite novi ispitak prije primjene octene kiseline u cerviksu jer će neodgovarajući pH ispitka štetno utjecati na rezultate testa. |

Kontrole kvalitete daju netočne rezultate

- | | |
|--|---|
| a) Za test je odabran neispravan protokol ispitivanja | Ako je protokol ispitivanja neispravan za test koji se provodi, ponovno očitajte mikrotitar pločicu unutar 30 minuta nakon dodavanja DR2 primjenom ispravnog protokola ispitivanja. |
| b) Obrnuto postavljanje kontrola kvalitete QC1-LR i QC2-HR | Ponovno testirajte ispitke. |

Komentari i prijedlozi

- c) Obrnuto postavljanje kalibratora HRC i kontrole kvalitete QC2-HR Ponovno testirajte ispitke.

Neispravna promjena boje zabilježena tijekom hibridizacije

- a) Neodgovarajuće miješanje mješavine probe s denaturiranim kalibratorima, kontrolama kvalitete i/ili ispitcima; ili mješavina probe nije dodana; ili je dodan neispravan volumen reagensa Protresite mikrotitar pločicu za hibridizaciju ili stalak s mikroepruvetama dodatne 2 minute. Ako su neke mikroeprevete ili jažice mikrotitar pločice i dalje ljubičaste, dodajte dodatnih 25 µl ispravne mješavine probe i dobro promiješajte. Ako nakon dodavanja mješavine probe i ponovnog miješanja i dalje ne dođe do ispravne promjene boje, a ispitak nije sadržavao krv ili druge materijale, ponovno testirajte ispitak.
- b) Ispitak sadržava krv ili druge materijale koji maskiraju promjenu boje Točno opisana promjena boje ne očekuje se s ovim vrstama ispitaka; to ne bi trebalo štetno utjecati na rezultate testa.
- c) Ispitak je imao < 1000 µl transportnog medija za ispitke Provjerite volumen izvornog ispitka. Volumen bi trebao biti 1425 µl ± 20 µl (nakon uklanjanja 75 µl alikvota za testiranje). Ako volumen iznosi < 1425 µl, izvorni je ispitak sadržavao < 1000 µl transportnog medija za ispitke. Uzmite novi ispitak.

Test ne prolazi provjeru ispitivanja; nema signala u pozitivnim kalibratorima, kontrolama kvalitete ili u ispitcima

- a) Proba nije dodana u diluens za probe Pripremite mješavinu probe kako je opisano u ovim uputama za uporabu. Pažljivo označite epruvete.
- b) Proba je kontaminirana RNazom tijekom pripreme Tijekom pipetiranja probe upotrebljavajte vrške pipeta s pregradama za aerosole i nosite rukavice. Mješavinu probe pripremite u sterilnom spremniku. Upotrebljavajte samo čiste nove jednokratne spremnike za reagense.

Komentari i prijedlozi

- | | |
|--|--|
| c) Neodgovarajuće miješanje mješavine probe | Nakon dodavanja probe u diluens za probe, vrlo temeljito promiješajte na vorteks miješalici pri velikoj brzini najmanje 5 sekundi. Mora se napraviti vidljivi vrtlog. |
| d) Neodgovarajuće miješanje mješavine probe i denaturiranog ispitka | Nakon dodavanja mješavine probe i ispitka u svaku jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju ili mikroepruvetu za hibridizaciju, protresite ih na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ± 100 o/min 3 ± 2 minute. Provjerite je li došlo do promjene boje iz ljubičaste u žutu u svakoj jažici mikrotitar pločice ili u svakoj mikroepruveti. |
| e) Neispravno vrijeme ili temperatura tijekom koraka hibridizacije | Hibridizirajte 60 ± 5 minuta na temperaturi od 65 ± 2 °C. Provjerite temperaturu grijača Microplate Heater I ili vodene kupelji. Pobrinite se da su grijač Microplate Heater I ili vodena kupelj postavljeni da griju ispitke na ispravnu temperaturu te da su unaprijed zagrijani 60 minuta prije uporabe. Pobrinite se da je razina vode dovoljna da bi zagrijala ispitke na ispravnu temperaturu. Vodene bi kupelji trebalo periodično kalibrirati. |
| f) Neodgovarajuće miješanje tijekom koraka hvatanja | Protresite na tresilici Rotary Shaker I 60 ± 5 minuta na temperaturi od $20 - 25$ °C kako je opisano u ovim uputama za uporabu. Kalibracijom provjerite brzinu tresilice Rotary Shaker I. (Pogledajte <i>Korisnički priručnik za tresilicu Rotary Shaker I</i>). |
| g) Izostanak dodavanja ispravne količine DR1 ili inkubiranja tijekom određenog vremena | Pipetirajte 75 µl DR1 u svaku jažicu mikrotitar pločice s pomoću 8-kanalne pipete. Inkubirajte 30 – 45 minuta na $20 - 25$ °C. |
| h) Izostanak dodavanja ispravne količine DR2 ili inkubiranja tijekom određenog vremena | Pipetirajte 75 µl DR2 u svaku jažicu mikrotitar pločice s pomoću 8-kanalne pipete. Inkubirajte 15 – 30 minuta na $20 - 25$ °C. |

Komentari i prijedlozi

- i) Kvar DML instrumenta ili neispravno programiranje Pogledajte važeći korisnički priručnik za DML instrument i korisnički priručnik za softver za dodatne upute ili se obratite tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

Povišene vrijednosti RLU u kalibratorima, kontrolama kvalitete i/ili ispitcima (≥ 200 RLU u mnogo ili u svim jažicama mikrotitar pločice); moguće je da test neće proći provjeru ispitivanja

- a) DNR nije dodan; dodan je neispravan volumen reagensa; neodgovarajuće miješanje DNR s ispitcima, kalibratorima i kontrolama kvalitete Pobrinite se da ponavljajuća pipeta ispravno pipetira prije dodavanja DNR. Kalibrirane pipete su ključne. Dodajte pola volumena DNR u svaku epruvetu i dobro promiješajte. Da biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, pobrinite se da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete. Kalibratori, kontrole kvalitete i ispitci trebali bi poprimiti ljubičastu boju nakon dodavanja DNR.
- b) Slabo curenje na DML instrumentu; vratašca nisu zabrtvljena; brtva oko vratašca je potrgana Provjerite pozadinsko očitavanje (mjerenje neobrađenih podataka) DML instrumenta očitavanjem prazne mikrotitar pločice. Očitavanje veće od 50 RLU naznačuje da postoji slabo curenje. Pogledajte važeći korisnički priručnik za DML instrument za upute ili se obratite tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.
- c) Kontaminacija DR2 ili jažica mikrotitar pločice za hvatanje reagensom DR1 ili vanjskom alkalnom fosfatazom Pogledajte „Provjera DR2 na kontaminaciju”, stranica 127.
- d) Kontaminirani pufer za ispiranje Pogledajte „Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode”, stranica 127.
- e) Kontaminirani automatizirani uređaj za pranje pločica Pogledajte „Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode”, stranica 127.

Komentari i prijedlozi

- | | |
|--|---|
| f) Neodgovarajuće ispiranje jažica mikrotitar pločice za hvatanje nakon inkubacije DR1 | Jažice mikrotitar pločice za hvatanje isperite temeljito puferom za ispiranje 6 puta, bilo prepunjivanjem jažica ili primjenom automatiziranog uređaja za ispiranje pločica. Nakon ispiranja ne bi trebalo biti vidljivih ostataka ružičaste tekućine u jažicama mikrotitar pločice. Pogledajte <i>Korisnički priručnik za automatizirani uređaj za ispiranje pločica</i> za upute o testiranju radi utvrđivanja kontaminacije ili kvarova. |
| g) Kontaminacija jažica mikrotitar pločica reagensom DR1 | Pobrinite se da su sve radne površine čiste i suhe. Budite oprezni prilikom uporabe DR1. Izbjegavajte aerosole. |
| h) Sušenje otopine za hibridizaciju tapkanjem na istom području papirnatih ručnika Kimtowels ili sličnih papirnatih ručnika koji ne otpuštaju vlakna | Nemojte ponovno sušiti tapkanjem na prethodno iskorištenim papirnatim ručnicima Kimtowels ili sličnim papirnatim ručnicima koji ne otpuštaju vlakna. |
| i) Upotrijebljeni su neispravni papirnatih ručnici za sušenje | Upotrebjavajte papirnatih ručnike Kimtowels ili slične papirnatih ručnike koji ne otpuštaju vlakna za sušenje tapkanjem. |

Niski omjeri PC/NC ili velik broj nisko pozitivnih ispitaka s omjerima < 2,0 (> 20 %); moguće je da test neće proći provjeru ispitivanja

- | | |
|------------------------------------|--|
| a) Neodgovarajuća priprema ispitka | <p>Dodajte ispravan volumen DNR i dobro promiješajte na vorteks miješalici. Da biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, pobrinite se da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete.</p> <p>Kod ispitaka PreservCyt pobrinite se da se obave ispravno miješanje i resuspenzija staničnog taloga prije inkubacije radi denaturacije.</p> <p>Trebala bi se vidjeti izrazita promjena boje iz prozirne u tamnoljubičastu. Inkubirajte 45 ± 5 minuta na 65 ± 2 °C.</p> |
|------------------------------------|--|

Komentari i prijedlozi

- | | |
|---|--|
| b) Mješavine probe neodgovarajuće je promiješana ili je dodano nedovoljno mješavine probe | Pripremite mješavinu probe kako je opisano. Dobro promiješajte vrtložnim miješanjem i pobrinite se da se napravi vidljivi vrtlog. Mješavina probe mora se dodati u epruvete s pipetama s pozitivnim pomakom ili u višekanalnu pipetu kako bi se osiguralo ispravno pipetiranje. |
| c) Neodgovarajući volumen mješavine probe dodan je u svaku mikroeprevetu ili jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju | Pobrinite se da 8-kanalna pipeta ispravno pipetira prije dodavanja mješavine probe. Dodajte 25 µl mješavine probe u svaku mikroeprevetu ili jažicu mikrotitar pločice koje sadržavaju denaturirane kalibratore, kontrole kvalitete i ispitke. Boja bi se trebala promijeniti od tamnoljubičaste do žute nakon dodavanja i temeljitog miješanja. Ispitci PreservCyt trebali bi poprimiti ružičastu boju umjesto žute. |
| d) Gubitak aktivnosti DR1 | Čuvajte DR1 na temperaturi od 2 – 8 °C. Upotrijebite ga prije isteka roka trajanja. |
| e) Nedostatno hvatanje | Korak hvatanja trebao bi se provoditi na tresilici Rotary Shaker I postavljenoj na 1100 ±100 o/min. Kalibracijom potvrdite brzinu tresilice. |
| f) Neodgovarajuće ispiranje | Jažice mikrotitar pločice isperite temeljito puferom za ispiranje 6 puta, bilo prepunjivanjem jažica ili primjenom automatiziranog uređaja za ispiranje pločica. |
| g) Kontaminirani pufer za ispiranje | Pogledajte „Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode”, stranica 127. |

Komentari i prijedlozi

Niz pozitivnih ispitaka s vrijednostima RLU koje su približno jednake

- a) Kontaminacija jažica mikrotitar pločice za hvatanje tijekom testa Prekrijte mikrotitar pločicu za hvatanje tijekom svake inkubacije. Izbjegavajte izlaganje epruveta kontaminaciji aerosolom prilikom provođenja ispitivanja. Tijekom rukovanja nosite rukavice bez pudera.
- b) Kontaminacija DR2 Pazite da ne kontaminirate izvorni reagens prilikom pipetiranja DR2 u jažice mikrotitar pločice za hvatanje. Izbjegavajte kontaminaciju DR2 aerosolima iz DR1 ili iz laboratorijske prašine itd.
- c) Kvar automatiziranog uređaja za ispiranje pločica Pogledajte „Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode”, stranica 127, ili pogledajte *Korisnički priručnik za automatizirani uređaj za ispiranje pločica* za upute o testiranju radi utvrđivanja kontaminacije ili kvarova.

Širok raspon koeficijenta varijacije među replikatima

- a) Netočno pipetiranje Provjerite pipetu kako biste osigurali da se pipetiraju obnovljivi volumeni. Rutinski kalibrirajte pipete.
- b) Nedovoljno miješanje Dobro promiješajte u svim koracima. Vrtložno promiješajte prije i nakon inkubacije radi denaturacije te nakon dodavanja mješavine probe. Pobrinite se da se napravi vidljivi vrtlog.
- c) Nepotpuni prijenos tekućine iz mikroepreveta za hibridizaciju ili jažica mikrotitar pločica za hibridizaciju u jažice mikrotitar pločice za hvatanje Tijekom koraka prijenosa s mikrotitar pločice za hibridizaciju ili mikroeprevete za hibridizaciju u jažice mikrotitar pločice za hvatanje pobrinite se da se prenesu obnovljivi volumeni.

Komentari i prijedlozi

- | | |
|--|--|
| d) Neodgovarajući uvjeti ispiranja | Jažice mikrotitar pločice isperite temeljito puferom za ispiranje 6 puta, bilo prepunjivanjem jažica ili primjenom automatiziranog uređaja za ispiranje pločica. |
| e) Kontaminacija jažica mikrotitar pločica reagensom DR1 | Pobrinite se da su sve radne površine čiste i suhe. Budite oprezni prilikom uporabe DR1. Izbjegavajte aerosole. |

Lažno pozitivni rezultati dobiveni za ispitke za koje je poznato da su negativni

- | | |
|---|--|
| a) Kontaminiran DR2 | Pobrinite se da ne dođe do križne kontaminacije ispitaka dok alikvotirate DR2 među ispitcima. Ako upotrebljavate samo dio kompleta, alikvotirajte volumen potreban za test u čisti jednokratni spremnik za reagense prije punjenja pipete. |
| b) Kontaminacija jažica mikrotitar pločica reagensom DR1 | Jažice mikrotitar pločice isperite temeljito puferom za ispiranje 6 puta, bilo prepunjivanjem jažica ili primjenom automatiziranog uređaja za ispiranje pločica. Nakon ispiranja ne bi trebalo biti vidljivih ostataka ružičaste tekućine u jažicama mikrotitar pločice. |
| c) Sušenje tapkanjem na istom području papirnatih ručnika Kimtowels ili sličnih papirnatih ručnika koji ne otpuštaju vlakna u nekoliko redaka | Nemojte sušiti tapkanjem na području papirnato ručnika koje je prethodno korišteno. |

Komentari i prijedlozi

- d) Neodgovarajuća priprema ispitka
- Dodajte ispravan volumen DNR i dobro promiješajte na vorteks miješalici. Da biste izbjegli lažno pozitivne rezultate, pobrinite se da tekućina oplahuje cijelu unutarnju površinu epruvete.
- Kod ručne pripreme ispitaka PreservCyt pobrinite se da se obave ispravno miješanje i resuspenzija staničnog taloga prije inkubacije radi denaturacije. Pogledajte Upute za uporabu za komplet *digene* HC2 Sample Conversion Kit.
- Trebala bi se vidjeti izrazita promjena boje iz prozirne u tamnoljubičastu. Inkubirajte 45 ± 5 minuta na temperaturi od 65 ± 2 °C. Kod ručne pripreme ispitaka SurePath pobrinite se da se ispitci inkubiraju 90 ± 5 minuta na 65 ± 2 °C.
- e) Neodgovarajući uvjeti ispiranja
- Jažice mikrotitar pločice isperite temeljito puferom za ispiranje 6 puta, bilo prepunjivanjem jažica ili primjenom automatiziranog uređaja za ispiranje pločica.
- f) Kontaminacija vrška pipete nenedenaturiranim materijalom tijekom prijenosa denaturiranog ispitka u mikroeprevetu za hibridizaciju ili na jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju
- Denaturacijski korak postupka obrade ispitka mora se izvesti prema uputama opisanim u ovim uputama za uporabu. Neodgovarajuće vrtložno miješanje ispitka, preokretanje epruvete i agitacija mogu rezultirati nedovršenom denaturacijom endogenih nespecifičnih RNK-DNK hibrida u cervikalnim ispitcima. Kod ispitaka PreservCyt ili SurePath posebno postoji vjerojatnost da će ti hibridi biti prisutni na unutarnjim stijenkama epruvete za denaturaciju ispitka. Kako biste spriječili prijenos tog nenedenaturiranog staničnog materijala, vršak pipete ne smije dodirivati stijenke epruvete za denaturiranje ispitaka tijekom prijenosa denaturiranog ispitka u mikroeprevetu za hibridizaciju ili jažicu mikrotitar pločice za hibridizaciju.

Komentari i prijedlozi

Povišene vrijednosti RLU negativnog kalibratora (> 200 RLU); ostatak testova provodi se prema očekivanjima

- | | |
|---|--|
| a) DR2 je inkubiran na temperaturi višoj od 20 – 25 °C | Ponovno provedite test i pobrinite se da se koraci hvatanja i otkrivanja inkubiraju na temperaturi od 20 – 25 °C. |
| b) DR2 je inkubiran dulje od 30 minuta | Očitajte mikrotitar pločicu nakon 15 minuta inkubacije (i ne kasnije od 30 minuta inkubacije) na temperaturi od 20 – 25 °C. |
| c) DR2 ili pufer za ispiranje kontaminirani su alkalnom fosfatazom ili detekcijskim reagensom 1 (DR1) | Pogledajte „Provjera DR2 na kontaminaciju”, stranica 127, ili „Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode”, stranica 127. |

Test ne prolazi provjeru ispitivanja; povišene vrijednosti $PC\bar{X}/NC\bar{X}$

- | | |
|--|--|
| Obrnuto postavljanje kalibratora HRC i kontrole kvalitete QC2 HR | Ponovno testirajte ispitke. Pažljivo pročitajte naljepnice na bočicama s kalibratorom i kontrolom kvalitete kako biste spriječili obrnuto postavljanje tih reagensa. |
|--|--|

Provjera DR2 na kontaminaciju

1. Pipetirajte 75 µl alikvotiranog, ostatnog DR2 ili DR2 iz originalne bočice u praznu jažicu mikrotitar pločice za hvatanje.

Napomena: Testiranje DR2 u replikatima od 3 omogućuje optimalnu procjenu radnih značajki.

2. Inkubirajte 15 minuta na 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
3. Izmjerite mikrotitar pločicu s pomoću DML instrumenta.

Kontrola za DR2 trebala bi iznositi < 50 RLU.

Ako su vrijednosti DR2 < 50 RLU, DR2 se može upotrijebiti za ponavljanje testa.

Ako je kontaminiran (> 50 RLU), nabavite novi komplet i ponovite test.

Provjera kontaminacije uređaja za ispiranje i/ili izvora vode

1. Označite jažice brojevima 1 – 4. Pipetirajte 75 µl DR2 u 4 odvojene jažice mikrotitar pločice za hvatanje.

Jažica 1 služi kao kontrola za DR2.

2. Pipetirajte 10 µl pufera za ispiranje iz boce za ispiranje u jažicu 2 mikrotitar pločice.
3. Dopustite da pufer za ispiranje teče kroz cijevi uređaja za ispiranje. Pipetirajte 10 µl pufera za ispiranje iz cijevi u jažicu 3 mikrotitar pločice.
4. Uzmite alikvot vode koja je upotrijebljena za pripremu pufera za ispiranje. Pipetirajte 10 µl vode u jažicu 4 mikrotitar pločice.
5. Inkubirajte 15 minuta na 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
6. Izmjerite mikrotitar pločicu s pomoću DML instrumenta.

Kontrola za DR2 (jažica 1) trebala bi iznositi < 50 RLU.

Usporedite vrijednost RLU iz jažica 2, 3 i 4 s kontrolom vrijednosti RLU za DR2. Pojedinačni RLU za jažice 2, 3 i 4 ne bi trebao premašivati vrijednost od 50 RLU kontrole vrijednosti RLU za DR2.

Vrijednosti koje premašuju 50 RLU kontrole za DR2 upućuju na kontaminaciju. Pogledajte „Metoda ručnog ispiranja”, stranica 54, za upute za čišćenje i održavanje uređaja za ispiranje.

Provjera kontaminacije automatiziranog uređaja za ispiranje pločica

1. Označite jažice brojevima 1 – 5. Pipetirajte 75 µl DR2 u 5 odvojene jažice mikrotitar pločice za hvatanje.

Jažica 1 služi kao kontrola za DR2.

2. Pipetirajte 10 µl pufera za ispiranje iz boce za ispiranje na uređaju za ispiranje pločica u jažicu 2 mikrotitar pločice.
3. Pipetirajte 10 µl tekućine za ispiranje iz boce za ispiranje vodom na uređaju za ispiranje pločica u jažicu 3 mikrotitar pločice.
4. Pritisnite gumb **Prime** (Pripremi) na tipkovnici uređaja za ispiranje pločica, omogućujući da pufer za ispiranje teče kroz vodove. Pipetirajte 10 µl pufera za ispiranje iz spremnika u jažicu 4 mikrotitar pločice.
5. Pritisnite gumb **Rinse** (Isperi) na tipkovnici uređaja za ispiranje pločica, omogućujući da tekućina za ispiranje teče kroz vodove. Pipetirajte 10 µl pufera za ispiranje iz spremnika u jažicu 5 mikrotitar pločice.
6. Prekrijte i inkubirajte 15 minuta na temperaturi od 20 – 25 °C. Izbjegavajte izravnu sunčevu svjetlost.
7. Izmjerite mikrotitar pločicu s pomoću DML instrumenta.

Kontrola za DR2 (jažica 1) trebala bi iznositi < 50 RLU.

Usporedite vrijednost RLU iz jažica 2, 3, 4 i 5 s kontrolom vrijednosti RLU za DR2.

Pojedinačni RLU za jažice 2, 3, 4 i 5 ne bi trebao premašivati vrijednost od 50 RLU kontrole vrijednosti RLU za DR2.

Vrijednosti koje premašuju 50 RLU kontrole za DR2 upućuju na kontaminaciju uređaja za ispiranje pločica.

Postupak dekontaminacije potražite u *Korisničkom priručniku za automatizirani uređaj za ispiranje pločica*.

Kontaktni podaci

Pogledajte list s informacijama za kontakt tvrtke QIAGEN isporučen s kompletom testa kako biste se obratili svom lokalnom predstavniku tvrtke QIAGEN.

Značajne izmjene

Značajne izmjene u ovoj reviziji ovih uputa za uporabu za *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test sažete su u tablici u nastavku:

Odjeljak	Stranica	Izmjena(e)
Upozorenja i mjere opreza	20	Nove informacije u vezi s GHS-om
Cervikalni bioptati	26	Bioptati veličine do 5 mm
Zaštitni znakovi	132	Uklonjeni patenti

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

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

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

Ugovor o ograničenoj licenciji za *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test

Uporabom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se smije upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim uputama za upotrebu i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim uputama za uporabu.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu upotrebu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati, osim ako je drugačije odredila tvrtka QIAGEN.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog kompleta potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s kompletom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na adresi www.qiagen.com.

© 2012–2018 QIAGEN, sva prava pridržana.

