

digene[®] HC2 HPV DNA Testi Kullanma Talimatı

IVD



Servikal numunelerde insan papillomavirüs (HPV) DNA'sının 18 düşük risk ve yüksek riskli tipinin kalitatif saptanması için mikrolaka kemiluminesans kullanarak sinyal amplifikasyonlu bir in vitro nükleik asit hibridizasyon analizi

Şunlarla kullanılmak üzere:

digene HC2 DNA Collection Device

digene Numune Nakil Ortamı

Hologic PreservCyt[®] Solüsyonu

BD SurePath[®] Koruyucu Sıvısı



5196-1330



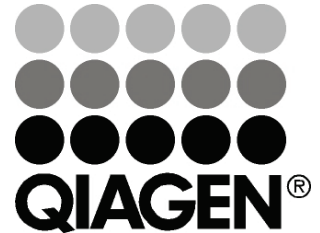
QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
ABD



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALMANYA

L2126tr Rev. 01



İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| İSİM VE KULLANIM AMACI..... | 1 |
| ÖZET VE AÇIKLAMA..... | 2 |
| İŞLEMİN PRENSİBİ..... | 3 |
| SAĞLANAN REAKTİFLER VE MATERYALLER | 4 |
| GEREKEN AMA SAĞLANMAYAN MATERYALLER | 5 |
| UYARILAR VE ÖNLEMLER..... | 6 |
| GÜVENLİK ÖNLEMLERİ | 6 |
| BİLEŞENLER İÇİN GÜVENLİK VE RİSK İFADELERİ | 6 |
| KULLANIM ÖNERİLERİ..... | 8 |
| REAKTİF HAZIRLAMA VE SAKLAMA..... | 9 |
| NUMUNE TOPLAMA VE KULLANIMI | 12 |
| STM İÇİNDE SERVİKAL NUMUNELER | 12 |
| SERVİKAL BIYOPSİLER | 12 |
| PRESERVCYT SOLÜSYONU İÇİNDE SERVİKAL NUMUNELER | 12 |
| SUREPATH KORUYUCU SIVISINDA SERVİKAL NUMUNELER | 13 |
| TEST İŞLEMİ..... | 14 |
| RAPID CAPTURE SYSTEM KULLANILARAK YÜKSEK HACİMLİ ÖRNEK ÇIKTI TESTİ..... | 14 |
| MANUEL YÖNTEM..... | 14 |
| DENATÜRASYON | 16 |
| VORTEKSLEME VE DENATÜRASYON | 19 |
| HİBRİDİZASYON: KOMBİNE PROB KOKTEYLİ (CPC) VE İKİLİ PROB YÖNTEMLERİ..... | 22 |
| HİBRİD YAKALAMA | 24 |
| HİBRİD SAPTAMA..... | 24 |
| YIKAMA | 25 |
| SİNYAL AMPLİFİKASYONU..... | 26 |
| ANALİZ KALİBRASYONU DOĞRULAMA KRİTERLERİ | 27 |
| KESME NOKTASI HESAPLAMA..... | 29 |
| KALİTE KONTROL | 30 |
| NUMUNE SONUÇLARININ YORUMLANMASI | 31 |
| PERFORMANS ÖZELLİKLERİ..... | 32 |
| DÜŞÜK RİSK VE YÜKSEK RİSK HPV ENDİKASYONUNU DESTEKLEYEN VERİLER..... | 32 |
| HIGH-RISK HPV PRİMER TARAMA ENDİKASYONUNU DESTEKLEYEN VERİLER..... | 36 |
| ANALİTİK HASSASİYET..... | 38 |
| KOMBİNE PROB KOKTEYLİ (CPC) PERFORMANSI..... | 39 |
| STM VE PRESERVCYT SOLÜSYON NUMUNELERİNİN EŞDEĞER OLMASI..... | 39 |
| BİR KLİNİK POPÜLASYONDA SUREPATH NUMUNE SONUÇLARININ STM NUMUNELERİYLE KORELASYONU | 40 |
| TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK..... | 40 |
| YÜKSEK RİSK HPV PROBU | 41 |
| ÇAPRAZ REAKTİVİTE..... | 42 |
| ÇAPRAZ REAKTİVİTE PANELİ..... | 42 |
| ÇAPRAZ HİBRİDİZASYON..... | 43 |
| KAN VE DİĞER MADDELERİN STM NUMUNELERİNE ETKİSİ..... | 43 |
| KAN VE DİĞER MADDELERİN PRESERVCYT SOLÜSYONU NUMUNELERİNE ETKİSİ | 43 |
| STM İÇİNDE TOPLANAN KLİNİK NUMUNELERDE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA TESTİNİN TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ..... | 43 |
| RLU/CO | 44 |
| PRESERVCYT SOLÜSYONU İÇİNDE TOPLANAN KLİNİK NUMUNELERDE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA TESTİNİN TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ | 44 |
| RLU/CO | 45 |
| SUREPATH KORUYUCU SIVISINDA TOPLANAN NUMUNELER İLE <i>DIGENE</i> HC2 YÜKSEK RİSK HPV DNA TESTİNİN TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ..... | 45 |
| ANALİZ İŞLEME İÇİN RAPID CAPTURE SYSTEM KULLANILIRKEN SUREPATH SONUCU TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ..... | 46 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| İŞLEMİN SINIRLAMALARI | 47 |
| REFERANSLAR..... | 48 |
| SORUN GİDERME KILAVUZU | 51 |
| KONTAMİNASYON KONTROLÜ..... | 55 |
| QIAGEN İRTİBAT BİLGİSİ..... | 56 |

İSİM VE KULLANIM AMACI

İn vitro diagnostik kullanım için.

Hybrid Capture® 2 (HC2) teknolojisi kullanan *digene* HC2 HPV DNA Testi servikal numunelerde 18 düşük risk ve yüksek risk HPV DNA tipinin kalitatif saptanması için mikropilaka kemiluminesans kullanarak sinyal amplifikasyonlu bir nükleik asit hibridizasyon analizidir.

digene HC2 HPV DNA Testi ile test edilebilecek servikal numuneler arasında şunlar vardır:

- *digene* HC2 DNA Collection Device ile toplanan numuneler
- Bir süpürge tipi toplama cihazı veya fırça/spatül kombinasyonu ile toplanıp PreservCyt Solüsyonuna konan numuneler (tam ayrıntılar için *digene* HC2 Sample Conversion Kit (Örnek Dönüştürme Kiti) kullanma talimatına başvurun)
- SurePath Koruyucu Sıvısında toplanan numuneler (SADECE Yüksek Risk HPV DNA testleri için)
- *digene* Specimen Transport Medium'da (Numune Nakil Ortamı, STM) toplanan biyopsiler

Düşük risk ve yüksek risk HPV Proplarını kullanırken bu testin kullanılması şunlar için endikedir:

- HPV tip 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 ile cinsel yoldan bulaşan HPV enfeksiyonlarının tanısına yardımcı olmak için.
- İki HPV DNA grubu arasında ayırım yapmak için: düşük risk HPV tipleri 6, 11, 42, 43 ve 44 ve yüksek risk HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68; ancak bulunan spesifik HPV tipi belirlenemez.

Yüksek Risk HPV Probu kullanırken testin kullanımı şunlar için endikedir:

- Servikal kanser geliştirilmesi için birincil nedensel faktör olduğu gösterilmiş yüksek riskli HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 saptanması için.
- Servikal kanser gelişmesi veya yüksek dereceli servikal hastalık varlığı açısından artmış riskte kadınları tanımlamak üzere Pap smear ile birlikte veya olmadan kullanılmak üzere bir başlangıç genel popülasyon tarama testi olarak. HPV tanısı yaş arttıkça giderek servikal hastalığa işaret eder.
- Kolposkopi veya diğer takip işlemlerine sevk gereksinimini belirlemek üzere anormal Pap smear sonuçları veya servikal hastalık sonrasında hastalar için bir takip testi olarak.
- Kolposkopi öncesinde Pap smear sonuçları Düşük Dereceli Skuamöz İntrapitelyal Lezyon (LSIL) veya Yüksek Dereceli Skuamöz İntrapitelyal Lezyon (HSIL) bulunan hastalarda bir takip testi olarak. Bu hastalar için *digene* HC2 HPV DNA Test sonucunu doktora yüksek dereceli hastalık yokluğunu belirlemek üzere kadınlarda risk değerlendirmesine yardımcı olarak hasta takibi açısından yardım edecektir.

digene HC2 HPV DNA Test uygun hasta takibi işlemleriyle uyumlu olarak diğer diagnostik ve tarama testleri, fizik muayeneler ve tam tıbbi geçmişten elde edilen klinik bilgiyle birlikte kullanılmalıdır. *digene* HC2 HPV DNA Testi sonuçları hastaların klinik değerlendirmesi ve tedavisi için tek temel olarak **kullanılmamalıdır**.

ÖZET VE AÇIKLAMA

Dişi genital kanalında bazı HPV tiplerinin bulunması kondiloma, Bowenoid papulosis, servikal, vajinal ve vulvar intraepitelyal neoplazi ve karsinom dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir.¹⁻³ Genel olarak bu virüslerin temelde cinsel yolla geçtiği kabul edilir ve yüksek riskli HPV tipleri servikal kanser gelişmesi için temel tanınan risk faktörüdür.⁴⁻⁸

İnsan papillomavirüsleri bir protein kapsidiyle sarılı 8000 baz çiftlik çift iplikçikli dairesel bir DNA molekülü içeren bir ikozahedral viral partikülden (virion) oluşur. Epitelyal hücrelerin enfeksiyonundan sonra viral DNA epitelin tüm kalınlığı boyunca yerleşir ama sağlam virionlar sadece dokunun üst tabakalarında bulunur. Viral DNA lezyonun tipi ve derecesine bağlı olarak virionlar veya epizomal ya da entegre HPV sekansları olarak bulunabilir.

Bugüne kadar HPV in vitro olarak kültürde üretilmemiştir ve immünolojik testler HPV servikal enfeksiyonunun varlığını belirlemek için yetersizdir. Fizik inceleme yoluyla ve Pap yayma veya biyopsi numunelerinde viral replikasyonla ilişkili karakteristik hücresel değişikliklerin varlığıyla anogenital HPV enfeksiyonunun dolaylı bulguları görülebilir. Alternatif olarak biyopsiler HPV DNA varlığını doğrudan saptamak üzere nükleik asit hibridizasyonu ile analiz edilebilir.

Tarihsel olarak HPV 16 ve 18 yüksek riskli kanserle ilişkili HPV'ler ve HPV tipleri 6 ve 11 düşük risk HPV'ler olarak görülmüştür.⁸⁻¹⁰ HPV tipleri 31, 33 ve 35'in kanserle orta derecede ilişkisi olduğu gösterilmiştir.^{2,11-14} Bu faydalı kavramsal çerçeveye rağmen bu 7 HPV tipi servikal neoplazmaların sadece %70 kadarından sorumludur.⁹⁻¹¹ Tip 39, 42, 43, 44, 45, 51,52, 56, 58, 59 ve 68 dahil ek HPV'ler kalan lezyonlarda saptanabilir temel HPV'ler olarak tanımlanmıştır^{15-20,32-36}. Bu HPV tipleri de çeşitli histopatolojik tanı kategorilerindeki relatif dağılımları temelinde düşük, orta ve yüksek risk gruplarına sınıflandırılabilir^{21, 32-37}.

HPV DNA'nın normal servikal epitel bulunan kadınların yaklaşık %10'unda bulunduğu gösterilmiştir ama spesifik kadın gruplarındaki fiili prevalans yaş ve diğer demografik değişkenlerden güçlü şekilde etkilenir.^{2,10,21,31} Prospektif çalışmalar HPV DNA pozitif kadınların %15–28'inde 2 yıl içinde skuamöz intraepitelyal neoplazi (SIL) gelişirken bu rakamın HPV DNA negatif kadınlarda sadece %1-3 olduğunu göstermiştir.^{22,23} Özellikle HPV tipi 16 ve 18 için ilerleme riski (yaklaşık %40) diğer HPV tipleri için olandan daha yüksek bulunmuştur.²²

İŞLEMİN PRENSİBİ

HC2 teknolojisi kullanan *digene* HC2 HPV DNA Testi mikroparka kemiluminesan saptama kullanan sinyal amplifikasyonlu bir hibridizasyon antikor yakalama analizidir. Hedef DNA içeren numuneler spesifik bir HPV RNA probuna hibridize olur. Oluşan RNA:DNA hibridleri RNA:DNA hybridlerine spesifik antikorlarla kaplı bir mikroparka kuyusunun yüzeyine yakalanır. İmmobilize edilmiş hibridler sonra RNA:DNA hibridlerine spesifik alkalen fosfatazla konjüge antikorlarla reaksiyona girer ve bir kemiluminesan substratla saptanır. Her antikora birkaç alkalen fosfataz molekülü konjüge olur. Çok sayıda konjüge antikor her yakalanan hibride bağlanıp önemli ölçüde sinyal amplifikasyonu ile sonuçlanır. Substrat bağlı alkalen fosfataz ile yarıldığında bir luminometrede bağlı ışık üniteleri (RLU'lar) olarak ölçülen ışık saçılır. Saçılan ışığın şiddeti numunede hedef DNA varlığı veya yokluğuna işaret eder.

Kesme Noktası Değerine (Cutoff Value) eşit veya üzerinde bir RLU ölçümü numunede HPV DNA dizileri varlığına işaret eder. Kesme Noktası Değeri altındaki bir RLU ölçümü test edilen spesifik HPV DNA dizilerinin yokluğuna veya analizin saptama limiti altında HPV DNA düzeylerine işaret eder.

digene HC2 HPV DNA Testi ile Rapid Capture® Sistemi (RCS) kullanılarak yüksek hacimli numune çıktılı testler yapılabilir. Bu alet sekiz saatte 352 adede kadar numuneyi işler. Yüksek hacimli örnek çıktılı testi mümkün kılmak üzere analizin numune denatürasyonu, kemiluminesan sinyal saptama ve sonuç bildirimini hariç tüm işlemsel adımları RCS tarafından yapılır.

SAĞLANAN REAKTİFLER VE MATERYALLER

Bir digene HC2 HPV DNA Test kitinde (kat. no. 5196-1330) 96 test vardır. Hasta sonucu sayısı kit başına kullanım sayısına göre değişir:

1 kullanım = 40 hasta sonucu (düşük risk ve yüksek risk)

2 kullanım = 32 hasta sonucu (düşük risk ve yüksek risk)

1 x 0,35 ml **Gösterge Boya**

%0,05 a/h sodyum azit içerir.

1 x 50 ml **Denatürasyon Reaktifi**

Seyreltilmiş sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu.

1 x 5 ml **Prob Seyreltici**

%0,05 a/h sodyum azitli tamponlanmış solüsyon.

1 x 150 µl **Düşük Risk HPV Probu**

HPV 6/11/42/43/44 RNA probu tamponlanmış solüsyonda (kırmızı kapak).

1 x 100 µl **Yüksek Risk HPV Probu**

HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 RNA probu, tamponlanmış solüsyonda (kırmızı kapak).

1 x 1 ml **Düşük Risk HPV Kalite Kontrol**

5 pg/ml (500.000 kopya/ml) klonlanmış HPV 6 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azit ile STM içinde.

1 x 1 ml **Yüksek Risk HPV Kalite Kontrol**

5 pg/ml (500,000 kopya/ml) klonlanmış HPV 16 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azitle STM içinde.

1 x 2.0 ml **Negatif Kalibratör**

Numune Nakil Ortamında %0,05 a/h sodyum azitle Taşıyıcı DNA.

1 x 1,0 ml **Düşük Risk HPV Kalibratör**

1 pg/ml klonlanmış HPV 11 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azitle STM içinde.

1 x 1,0 ml **Yüksek Risk HPV Kalibratör**

1 pg/ml klonlanmış HPV 16 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azitle STM içinde.

1 x 1 **Yakalama Mikroplakası**

Anti-RNA:DNA hibrid antikorlarla kaplanmış.

1 x 12 ml **Saptama Reaktifi 1**

RNA:DNA hibridlerine alkalin fosfataz konjüge antikorlar, %0,05 a/h sodyum azitle tamponlanmış solüsyonda.

1 x 12 ml **Saptama Reaktifi 2**

CDP-Star®, Emerald II (kemiluminesan substrat) ile.

1 x 100 ml **Wash Buffer Concentrate (Yıkama Tamponu Konsantresi)**

%1,5 a/h sodyum azit içerir.

GEREKEN AMA SAĞLANMAYAN MATERYALLER

Hybrid Capture System *In Vitro* Diagnostik Ekipman ve Aksesuarlar^A

digene Hybrid Capture 2 Sistemi ("*digene* HC2 Sistemi"); bir QIAGEN onaylı luminometre ("DML aleti"), QIAGEN onaylı kişisel bilgisayar ve bilgisayar periferalleri (monitör, klavye, fare, yazıcı ve yazıcı kablosu), *digene* HC2 System Software (HC2 Sistem Yazılımı) ("*digene* assay analysis software" (test analiz yazılımı)), *digene* HC2 System Assay (HC2 Sistem Testi) HPV Protokolleri, LumiCheck Plate Software (LumiCheck Plaka Yazılımı) ve *digene* HC2 Sistem Yazılımı Kullanıcı El Kitabı (*digene* HC2 System Software User Manual) kısımlarından oluşur

Hybrid Capture System Rotary Shaker I
Hybrid Capture System Microplate Heater I
Hybrid Capture System Automated Plate Washer
Hybrid Capture System Çoklu Numune Tüpü (MST) Vortexer 2 (İsteğe bağlı)^B
Dönüştürme Askısı ve Askı kapağı (isteğe bağlı)
digene Numune Askısı ve Askı kapağı (isteğe bağlı)
EXPAND-4 Pipetör ve Standı (isteğe bağlı)^C
digene HC2 DNA Collection Device^D
Tüp Mühürleyici Dispenseri ve kesme cihazı (isteğe bağlı, MST Vortexer 2 ile kullanılır)

Genel Laboratuvar Kullanımı Ekipmanı ve Aksesuarları

1 Dönüştürme Askısı (36 x 21 x 9 cm) veya numune askılarını tutmak için yeterli büyüklükte 65 ± 2°C su banyosu
Mikrosantrifüj (maksimum prob hacmi elde etmek üzere prob flakonlarının santrifüjlenmesi için isteğe bağlı)
Kap atışmanlı vorteks karıştırıcı
Tek kanallı Mikropipetör; 20-200 µl ve 200-1000 µl hacimler için değişken ayarlar
Eppendorf[®] Repeater[®] Pipet veya eşdeğeri gibi tekrarlayan pozitif displasman pipeti
8 kanallı Pipetör: 25-200 µl hacimler için değişken ayarlar
Süre Ölçer
Sodyum hipoklorür solüsyonu, %5 h/h (veya ev tipi çamaşır suyu)
Parafilm[®] veya eşdeğeri
Tek kanallı pipetör (20 - 200 µl ve 200-1000 µl) için tek kullanımlık aerosol bariyeri Pipet Uçları
Eppendorf Repeater Pipet için tek kullanımlık uçlar (25 ve 500 µl)
8 kanallı pipetör için Tek Kullanımlık Uçlar (25 - 200 µl)
Kimtowels[®] Wipers veya eşdeğeri az tiftikli kağıt havlular
Tek kullanımlık tezgah örtüsü
Pudrasız eldivenler
5 ml ve/veya 15 ml tıklamalı kapaklı, yuvarlak altlı Polipropilen Tüpler (Prob seyreltisi için)
2,0 ml kapaklı polipropilen mikrosantrifüj tüpleri

Surepath Koruyucu Sıvısı Numune İşleme için Ek Ekipman ve Aksesuarlar

800 ± 15 x g değerine ulaşabilen ve 15 ml konik polipropilen santrifüj tüplerini tutabilen Sallanan Kova Santrifüj
digene HC2 Sample Conversion Tüpleri (15 ml konik tüpleri)^F
7 ml standart uçlu transfer pipetleri veya eşdeğeri
QIAGEN Numune Taşıma Ortamı
Eppendorf Repeater Pipet için tek kullanımlık uçlar (100 µl)

Rapid Capture System (yüksek hacim örnek çıktılı test için isteğe bağlı)^E
Yıkama Aygıtı
Hibridizasyon Mikroplakaları
Mikroplaka Kapakları
Boş Mikroplaka Stripleri (Costar'dan elde edilebilir, Model no: 2581); Automated Plate Washer (Otomatik Plaka Yıkayıcı) ile kullanılmak üzere isteğe bağlı
Numunenin alınması için Ekstra Ucun Pipet Uçları
Numune Toplama Tüpleri
Numune Toplama Tüpü Askısı
Numune Toplama Tüpü Vidalı Kapakları
Tek Kullanımlık Reaktif Rezervuarları
DuraSeal[™] Tüp Mühürleyici Film
Hibridizasyon Mikrotüpleri
Mikrotüp Askısı
Plaka Mühürleyiciler

PreservCyt Solüsyonu Numune İşleme için Ek Ekipman ve Aksesuarlar

2900 ± 150 x g değerine ulaşabilen ve 10 ml veya 15 ml konik polipropilen santrifüj tüplerini tutabilen Sallanan Kova Santrifüj
5 ml serolojik pipetler veya transfer pipetleri
digene HC2 Sample Conversion Kit^A
Eppendorf Repeater Pipet için tek kullanımlık uçlar (50 ve 100 µl)

Manuel Vorteks İşlemi İçin:

digene HC2 Sample Conversion Tüpleri (15 ml konik)^F, Sarstedt 10 ml Kapaklı Konik tüpler veya VWR[®] veya Corning[®] marka kapaklı 15 ml konik altlı polipropilen santrifüj tüpleri
10 ml veya 15 ml konik tüpleri tutmak için tüp askısı

Multi-Specimen Tube Vortexer 2 İşlemi İçin

digene HC2 Sample Conversion Tüpleri (15 ml konik)^F
Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
Dönüştürme Askısı ve Kapağı (15 ml konik tüplere spesifik)
Tüp Mühürleyici dispenseri ve kesme cihazı
DuraSeal Tüp Mühürleyici Film (MST Vortexer 2 ile kullanılır)

^A QIAGEN'den sadece *digene* HC2 HPV DNA Testleriyle kullanımı onaylanmış ekipman ve materyaller sağlanabilir.

^B Ayrıca Yarı Otomatik RCS Uygulamasını yaparken kullanılması gereklidir.

^C Özel madde. Genişlediğinde 3,2 cm uç aralığının elde edilebilmesi şartıyla diğer özel genişletilebilir çoklu kanal pipetleri kullanılabilir. Alternatif olarak 75 µl pipetleyebilen bir tek kanallı pipet kullanılabilir.

^D *digene* HC2 HPV DNA Testi performans özellikleri sadece belirtilen toplama kitleleriyle belirlenmiştir.

^E Bu analizle yüksek hacim örnek çıktılı test için o sistemin kullanımına spesifik talimat açısından *Rapid Capture System Kullanıcı El Kitabı* (*Rapid Capture System User Manual*) belgesine başvurun.

^F QIAGEN'den sağlanabilen *digene* HC2 Sample Conversion Tüpleri (VWR veya Corning[®] marka), Multi-Specimen Tube Vortexer 2 işlemi kullanılırken uygun analiz performansını sağlamak üzere mutlaka kullanılmalıdır.

UYARILAR VE ÖNLEMLER

TESTİ KULLANMADAN ÖNCE TÜM TALİMATI DİKKATLE OKUYUN.

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ

TÜM NUMUNELERİN enfeksiyöz olabileceği kabul edilmelidir. Bilinen hiçbir test yöntemi numunelerin enfeksiyon bulaştırmayacağı konusunda tam güvence veremez. İnsan numunelerinin uygun ulusal/yerel biyogüvenlik uygulamalarıyla uyumlu olarak kullanılması önerilir. Enfeksiyöz ajanlar içeren veya içermesinden şüphelenilen materyal ile bu biyogüvenlik uygulamalarını kullanın. Bu önlemler arasında verilenlerle sınırlı olmamak üzere şunlar vardır:

1. Ağızınızla pipetlemeyin.
2. Reaktifler veya numunelerin kullanıldığı yerlerde sigara içmeyin ve bir şey yiyip içmeyin.
3. Reaktifler veya numuneleri kullanırken tek kullanımlık pudrasız eldivenler kullanın. Testi yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
4. Tüm numune döküntülerini %0,5 h/h sodyum hipoklorür gibi tüberkülosit bir dezenfektan veya başka uygun bir dezenfektanla temizleyin ve dezenfekte edin.^{42,43}
5. Tüm numuneler, reaktifler ve diğer kontamine olmuş olabilecek materyalleri ulusal ve yerel düzenlemelerle uyumlu olarak dekontamine edin ve atın.

Bazı reaktifler sodyum azit içerir. Sodyum azitin laboratuvar su borularında kurşun veya bakır azit oluşturduğu bildirilmiştir. Bu azitler çekiçle vurma gibi perküsyon durumunda patlayabilir. Kurşun veya bakır azit oluşumunu önlemek için sodyum azit içeren solüsyonları attıktan sonra lavabolardan iyice su akıtın. Azit biriktiğinden şüphelenilen eski lavabolardan kontaminasyonu gidermek için A.B.D. Mesleki Güvenlik ve Sağlık İdaresi şunları önerir: (1) su tutucudan sıvıyı lastik veya plastik bir hortum kullanarak boşaltın, (2) %10 h/h sodyum hidroksit solüsyonu ile doldurun, (3) 16 saat tutun ve (4) iyice su geçirin.

RCS otomatik testi

Yüksek hacim örnek çıktılı test için o sistemin kullanımına spesifik ek Uyarılar ve Önlemler için *Rapid Capture System Kullanıcı El Kitabı (Rapid Capture System User Manual)* belgesine bakınız.

BİLEŞENLER İÇİN GÜVENLİK VE RİSK İFADELERİ

digene HC2 HPV DNA Test kiti bileşenleri için aşağıdaki risk ve güvenlik ifadeleri geçerlidir:

Yıkama Tamponu Konsantresi



İçindekiler: Sodyum azit. Uyarı! Yutulursa zararlıdır. Sudaki organizmalara uzun dönemli etkilerle zararlıdır. Çevreye serbest bırakmaktan kaçınınız. İçeriği/kabı onaylı bir atık atma tesisine atın.

Denatürasyon Reaktif



Sodyum hidroksit içerir: Tehlike! Şiddetli cilt yanıkları ve göz hasarına neden olur. Metaller için çürütücü olabilir. İçeriği/kabı onaylı bir atık atma tesisine atın. GÖZLERDEYSE: Suyla dikkatle birkaç dakika yıkayın. Varsa ve kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Yıkamaya devam edin. CİLTTEYSE (veya saçtaydısa): Hemen tüm kontamine giysileri çıkarın. Cildi suyla yıkayın/duş alın. Hemen bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. Kilit altında saklayın. Koruyucu eldivenler/ koruyucu giysiler/ göz koruması/ yüz koruması kullanın.

Prob Seyreltici



Asetik asit; Poliakrilik asit içerir. Tehlike! Şiddetli cilt yanıkları ve göz hasarına neden olur. İçeriği/kabı onaylı bir atık atma tesisine atın. GÖZLERDEYSE: Suyla dikkatle birkaç dakika yıkayın. Varsa ve kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Yıkamaya devam edin. CİLTTEYSE (veya saçtaysa): Hemen tüm kontamine giysileri çıkarın. Cildi suyla yıkayın/duş alın. Hemen bir ZEHİR MERKEZİ veya doktoru arayın. Kilit altında saklayın. Koruyucu eldivenler/ koruyucu giysiler/ göz koruması/ yüz koruması kullanın.

Yüksek Risk HPV Kalibratör

Uyarı! Hafif cilt tahrişine neden olur. Cilt tahrişi oluşursa: Tıbbi öneri alın/ yardım isteyin.

Düşük Risk HPV Kalibratör

Uyarı! Hafif cilt tahrişine neden olur. Cilt tahrişi oluşursa: Tıbbi öneri alın/ yardım isteyin.

Yüksek Risk HPV Kalite Kontrol

Uyarı! Hafif cilt tahrişine neden olur. Cilt tahrişi oluşursa: Tıbbi öneri alın/ yardım isteyin.

Düşük Risk HPV Kalite Kontrol

Uyarı! Hafif cilt tahrişine neden olur. Cilt tahrişi oluşursa: Tıbbi öneri alın/ yardım isteyin.


Negatif Kalibratör

Uyarı! Hafif cilt tahrişine neden olur. Cilt tahrişi oluşursa: Tıbbi öneri alın/ yardım isteyin.


Daha Fazla Bilgi

Güvenlik Veri Sayfaları: www.qiagen.com/safety

KULLANIM ÖNERİLERİ

1. İn Vitro Diagnostik Kullanım İçin.
2. Servikal fırça sadece hamile olmayan kadınlarda kullanılmak üzere dir.
3. Reaktifleri dış kutu etiketinde  sembolünün yanında belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
4. Analizi sağlanan zaman ve sıcaklık aralıklarının dışında yapmak geçersiz sonuçlara neden olabilir. Belirlenen süre ve sıcaklık aralıklarına girmeyen analizler geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.
5. *digene* HC2 HPV DNA Testi İşlemi, Analiz Kalibrasyon Doğrulama Kriterleri, Kalite Kontrol ve Numune Sonuçlarının Yorumlanması güvenilir test sonuçlarının elde edilmesi için yakından izlenmelidir.
6. Belirtilen tam reaktif hacminin pipetlenmesi ve her reaktife geldikten sonra iyice karıştırılması önemlidir. Aksi halde hatalı test sonuçları oluşabilir. Belirtilen renk değişikliklerinin olmasını sağlamak bu koşulların karşılandığını doğrular.
7. Kit bileşenleri bir ünite olarak test edilmiştir. Başka kaynaklardan veya farklı lotlardan bileşenleri birbirleriyle **değiştirmeyin**.
8. Nükleik asitler çevresel nükleaz degradasyonuna çok duyarlıdır. İnsan cildinde ve insanların kullandığı materyal yüzeylerinde nükleazlar bulunur. Çalışma yüzeylerini temizleyip tek kullanımlık tezgah örtüsüyle örtün **ve tüm analiz adımlarını yaparken pudrasız eldivenler kullanın**.
9. Analiz yapılırken Yakalama Mikroplakası ve Saptama Reaktifi 2'nin eksojen alkalen fosfatazla kontaminasyonunu önlediğinizden emin olun. Alkalin fosfataz içerebilen maddeler arasında Saptama Reaktifi 1, bakteriler, tükürük, saç ve ciltten yağlar vardır. **Yakalama Mikroplakasını yıkama adımından sonra ve Saptama Reaktifi 2 inkübasyonu sırasında örtmek özellikle önemlidir çünkü eksojen alkalin fosfataz Saptama Reaktifi 2 ile reaksiyona girip yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir**.
10. Saptama Reaktifi 2 ürününü doğrudan ışığa uzun süreli maruz kalmadan koruyun. Saptama Reaktifi 2 ürününü bölüntülere ayırdıktan hemen sonra kullanın ve doğrudan güneş ışığından kaçının.
11. Tekrarlayıcı pipetörden reaktif iletimi öncesinden sıvı geçirilmeli ve düzenli olarak büyük hava kabarcıkları açısından kontrol edilmelidir. Tekrarlayıcı pipetör ucunda aşırı miktarlarda büyük hava kabarcıkları hatalı iletime neden olabilir ve pipetörü doldurup tüm sıvıyı atarak ve tekrar doldurarak önlenir. Spesifik kullanma talimatı için pipetör satıcısının talimat el kitaplarına bakınız.
12. Çoklu kanal pipetleme Saptama Reaktifi 1 ve 2 verilmesi için ters pipetleme tekniği (bakınız *Hybrid Detection (Hibrid Saptama)*) kullanılarak yapılmalıdır. Çoklu kanal pipetöründe her pipet ucunu uygun oturma ve dolma açısından kontrol edin.
13. Her mikroplaka kuyusunun Manuel Yıkama Talimatında belirtildiği şekilde iyice yıkandığından emin olmak üzere dikkatli olunmalıdır. Yetersiz yıkama artmış arka alan bulgularına yol açar ve yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir. Kuyularda kalan yıkama tamponu azalmış sinyal veya kötü tekrar üretilebilirlikle sonuçlanabilir.
14. Soğuk durumdan başlandığında Microplate Heater I ürününün 65°C ± 2°C sıcaklığa dengelenmesi için en az 60 dakika bekleyin. Bu ısınma süresini beklememek Hybridization Microplate (Hibridizasyon Mikroplakasının) ürününün erimesine yol açabilir. Daha fazla ayrıntı için bakınız *Microplate Heater I Kullanıcı El Kitabı (Microplate Heater I User Manual)*.

REAKTİF HAZIRLAMA VE SAKLAMA

1. Alındığında kiti 2-8°C'de saklayın. Yıkama Tamponu Konsantresi, Denatürasyon Reaktifi ve Gösterge Boya istendiği şekilde 2-30°C'de saklanabilir.
2. Kutu etiketinde  sembolünün yanında belirtilen son kullanma tarihi veya hazırlan reaktiflerin son kullanma tarihinden (aşağıya bakınız) sonra kullanmayın.
3. Denatürasyon Reaktifi ve Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Probu ve Yıkama Tamponu Konsantresi dışında tüm reaktifler kullanıma hazırdır.

Numuneleri 18 HPV tipinden herhangi biri için test etmek üzere bir Combined-Probe Cocktail (Kombine Prob Kokteyli) (CPC) Yöntemi sağlanmıştır. Bu seçeneği kullanarak test etmek için bir Kombine Prob Kokteyli, seyreltilmiş Düşük Risk HPV Prob Karışımı ve Yüksek Risk HPV Prob Karışımı birlikte *digene* HC2 HPV DNA Test kullanımından önce karıştırılarak hazırlanmalıdır. İkili Prob Yöntemi ayrı Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Prob Karışımı kullanılır. Aşağıdaki talimata bakınız.

Yüksek hacim örnek çıktılı test için *Rapid Capture System Kullanıcı El Kitabı (Rapid Capture System User Manual)* HPV Prob Karışımı, Yıkama Tamponu, Saptama Reaktifi 1 ve Saptama Reaktifi 2 belgesine bakınız çünkü bu talimat bu sistemin yüksek hacim örnek çıktılı test için kullanımına spesifiktir.

| REAKTİF | HAZIRLAMA YÖNTEMİ | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-------------------|------------------------|-------------|------|--------|---------|------|--------|---------|-------------|----------|--------|
| Denatürasyon Reaktifi | <p>Önce Şunları Hazırlayın:</p> <ul style="list-style-type: none">• Denatürasyon Reaktifi şişesine 5 damla Gösterge Boya ekleyin ve iyice karıştırın. Denatürasyon Reaktifi homojen, koyu mor renkte olmalıdır.• Hazırlandıktan sonra Denatürasyon Reaktifi 2-8°C'de saklandığında üç ay stabildir. Yeni son kullanma tarihi ile etiketleyin. Renk solarsa 3 damla Gösterge Boya ekleyin ve kullanmadan önce iyice karıştırın. <p>Uyarı: Denatürasyon Reaktifi çürütücüdür. Uygun koruyucu giysiler, eldiven ve göz/yüz koruması kullanın. Kullanırken dikkatli olun.</p> | | | | | | | | | | | | |
| Düşük Risk HPV Prob Karışımı (Düşük Risk HPV Probu ve Prob Seyreltici reaktiflerinden hazırlanır) | <p>Numune Denatürasyon İnkübasyonu Sırasında Hazırlayın:</p> <p>Önemli: Bazen Prob flakon kapağına sıkışır.</p> <p>Not: Prob ve Prob Karışımı Rnaz kontaminasyonunu önleyin. Pipetleme probu için aerosol bariyer pipet uçları kullanın. Prob Seyreltici visközdür.</p> <p>HPV problemlerini hazırlarken iyice karıştırıldığından emin olun. Karıştırma adımında sıvıda görünür bir vorteks oluşmalıdır. Tam olmayan karıştırma azalmış sinyale neden olabilir.</p> <ul style="list-style-type: none">• Düşük Risk HPV Probu flakonunu sıvıyı flakon dibine getirmek üzere kısa bir süre santrifüje edin. Karıştırmak için parmağınızla yavaşça vurun.• Gerekli Prob Karışımı miktarını belirleyin (25 µl/test). Pipet uçlarında veya flakon kenarında kaybedebilecek hacmi hesaba almak üzere ekstra Prob Karışımı yapılması önerilir. Aşağıda liste halinde verilen önerilen hacimlere başvurun. Her kullanım için önerilen en küçük test sayısı 24'tür. Analiz başına 24 kuyudan azı isteniyorsa kit başına toplam test sayısı sınırlı Prob ve Prob Seyreltici hacimleri nedeniyle azalabilir.• Gerekli miktarda Prob Seyrelticiyi yeni bir tek kullanımlık kaba aktarın. Test sayısına bağlı olarak 5 ml veya 15 ml tıklamalı kapaklı, yuvarlak altlı polipropilen bir tüp önerilir. Prob Karışımı hazırlamak için Prob Seyrelticide 1:25 Düşük Risk HPV Probu seyreltisi hazırlayın. <table border="1"><thead><tr><th>Test/Strip Sayısı</th><th>Hacim Prob Seyreltici*</th><th>Hacim Prob*</th></tr></thead><tbody><tr><td>48/6</td><td>2,0 ml</td><td>80,0 µl</td></tr><tr><td>24/3</td><td>1,0 ml</td><td>40,0 µl</td></tr><tr><td>Kuyu Başına</td><td>0,045 ml</td><td>1,8 µl</td></tr></tbody></table> <p>*Bu değerlere önerilen ekstra hacim dahildir.</p> <ul style="list-style-type: none">• Düşük Risk HPV Probu Prob Seyrelticiye, pipet ucunu menisküsün hemen üzerinde | Test/Strip Sayısı | Hacim Prob Seyreltici* | Hacim Prob* | 48/6 | 2,0 ml | 80,0 µl | 24/3 | 1,0 ml | 40,0 µl | Kuyu Başına | 0,045 ml | 1,8 µl |
| Test/Strip Sayısı | Hacim Prob Seyreltici* | Hacim Prob* | | | | | | | | | | | |
| 48/6 | 2,0 ml | 80,0 µl | | | | | | | | | | | |
| 24/3 | 1,0 ml | 40,0 µl | | | | | | | | | | | |
| Kuyu Başına | 0,045 ml | 1,8 µl | | | | | | | | | | | |

| | <p>tüp iç duvarına karşı yerleştirip içindekileri dışarı vererek pipetleyin. Ucu Prob Seyrelticiye Batırmayın.</p> <ul style="list-style-type: none"> İyice karıştırmak için maksimum hızda en az 5 saniye vorteksleyin. Görünür bir vorteks oluşmalıdır. Düşük Risk HPV Prob Karışımı olarak etiketleyin ve kullanıma hazır oluncaya kadar temiz, kapalı bir kaptan tutun. Kullanılmamış Prob Karışımı atılmalıdır. | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------|----------|----|---------|------------|----|--------|----------|----|
| Yüksek Risk HPV Prob Karışımı | Düşük Risk HPV Prob Karışımını aşağıdaki gibi hazırlayın. "Yüksek Risk HPV Prob Karışımı" olarak etiketleyin. Kullanılmamış Prob Karışımı atılmalıdır. | | | | | | | | | | | | |
| Kombine Prob Kokteyli | Düşük Risk HPV Probu ve Yüksek Risk HPV Probu Karışımlarını yukarıda tanımlandığı şekilde hazırlayın. Tüm seyreltilmiş Düşük Risk HPV Prob Karışımı içeriğini seyreltilmiş Yüksek Risk HPV Prob Karışımı tüpüne ekleyin. En az 5 saniye yüksek hızda vorteksleyerek iyice karıştırın. Görünür bir vorteks oluşmalıdır. "Kombine Prob Kokteyli" olarak etiketleyin. Kullanılmamış Prob Karışımı atılmalıdır. | | | | | | | | | | | | |
| Yıkama Tamponu | <p>Yakalama Adımı Sırasında Hazırlama:</p> <p>Hybrid Capture System Automated Plate Washer için Yıkama Tamponu aşağıda tanımlandığı şekilde hazırlanıp kapalı bir kaptan saklanabilir veya her defasında 1 L hazırlanıp Automated Plate Washer Yıkama Rezervuarlarına yerleştirilebilir. Karıştırma hacimleri için aşağıdaki Tabloya bakınız:</p> <p>Bakım ve Koruma Talimatı için Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına bakınız.</p> <p>Uyarı: Yıkama Tamponu Konsantresi yutulduğunda toksiktir. Uygun koruyucu giysiler, eldivenler ve göz/yüz koruması kullanın. Maruz kalmayı minimuma indirmek üzere hazırlarken Yıkama Tamponu Konsantresine su ekleyin.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Yıkama Tamponu Miktarı Konsantrat</th> <th>Distile veya Deiyonize Su</th> <th>Son Hacim Miktarı Yıkama Tamponu</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1L</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1.933,4 ml</td> <td>2L</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2.900 ml</td> <td>3L</td> </tr> </tbody> </table> <p>Not: Automated Plate Washer gücünü daima açık tutmak çok önemlidir. Bu durum sekiz saat kullanılmadıktan sonra bakım durulamasının yapılmasını mümkün kılar.</p> <p>Her analizden önce Automated Plate Washer Atık Rezervuarının boş ve Durulama Rezervuarının distile veya deiyonize su ile doldurulmuş olduğundan emin olun.</p> <p>Manuel plaka yöntemi için:</p> <ul style="list-style-type: none"> Yıkama tamponu konsantresini iyi karıştırın. 100 ml Yıkama Tamponu Konsantresine 2,9 L distile veya deiyonize su ile Yıkama Aparatında seyreltin ve iyice karıştırın (son hacim 3 L olmalıdır). Kabı kontaminasyon veya buharlaşmayı önlemek için mühürleyin. <p>Hazırlandıktan sonra Yıkama Tamponu 2-30°C'de üç aya kadar stabildir. Yeni son kullanma tarihi ile etiketleyin. Yıkama Tamponu buzdolabına konmuşsa kullanmadan önce 20-25°C dengeleyin.</p> <p>Yıkama Aparatı ve tüpünün bakteriler ve küflerde bulunan alkalen fosfatadan olası kontaminasyonunu önlemek üzere üç ayda bir %0,5 sodyum hipoklorit solüsyonu ile temizlenip distile veya deiyonize suyla iyice durulanması önerilir.</p> | Yıkama Tamponu Miktarı Konsantrat | Distile veya Deiyonize Su | Son Hacim Miktarı Yıkama Tamponu | 33,3 ml | 966,7 ml | 1L | 66,6 ml | 1.933,4 ml | 2L | 100 ml | 2.900 ml | 3L |
| Yıkama Tamponu Miktarı Konsantrat | Distile veya Deiyonize Su | Son Hacim Miktarı Yıkama Tamponu | | | | | | | | | | | |
| 33,3 ml | 966,7 ml | 1L | | | | | | | | | | | |
| 66,6 ml | 1.933,4 ml | 2L | | | | | | | | | | | |
| 100 ml | 2.900 ml | 3L | | | | | | | | | | | |

KULLANIMA HAZIR REAKTİFLER İÇİN HACİMLER**Saptama Reaktifi 1
ve Saptama
Reaktifi 2****Kullanımdan Hemen Önce:**

Reaktifi iyice karıştırın ve sonra uygun Saptama Reaktifi 1 veya Saptama Reaktifi 2 hacmini ölçüp aşağıdaki kılavuz ilkeleri izleyerek temiz tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına koyun. Kontaminasyonu önlemek için bu Reaktifler orijinal şişelerine geri **KONMAMALIDIR: Kullanım sonrasında kullanılmamış materyali atın.** Bir 8 kanallı pipetör kullanılmıyorsa uygun bir tekrarlayıcı pipetör onun yerine kullanılabilir. Bu durumda Reaktifin bölüntüleri aşağıda belirtildiği şekilde gerekli hacmi tutmak için yeterli büyüklükte bir polipropilen tüpe yapılmalıdır.

**Hacim Saptama
Testler/Stripler****sayısı
Reaktif 1 veya 2**

96/12

şişe içeriği

72/9

7,0 ml

48/6

5,0 ml

24/3

3,0 ml

1 test

0,125 ml

NUMUNE TOPLAMA VE KULLANIMI

digene HC2 DNA Collection Device (Toplama Cihazı) (bir servikal fırça ve *digene* Numune Nakil Ortamından oluşur) kullanılarak toplanan ve taşınan servikal numuneler veya bir süpürge tipi toplama cihazı yada fırça/spatül kombinasyonu ile toplanıp PreservCyt Solüsyonuna konan numuneler veya SurePath Koruyucu Sıvısı içinde toplanan servikal numuneler *digene* HC2 HPV DNA Testi ile kullanılması önerilen yegane numunelerdir. Başka örnek alma cihazlarıyla alınan veya başka nakil ortamlarında taşınan numuneler bu analiz ile kullanılmak üzere yeterli vasıflara sahip değildir. Bu kitin performans özellikleri sadece belirtilen toplama kitleriyle belirlenmiştir. Kolposkopik muayene yapılıyorsa servikal numuneler asetik asit veya iyodür uygulanmasından önce alınmalıdır. Ek numune toplama ve muamele işlemleri için *digene* HC2 DNA Collection Device kullanma talimatına başvurun.

STM İÇİNDE SERVİKAL NUMUNELER

STM numuneleri oda sıcaklığında iki haftaya kadar tutulabilir ve test laboratuvarına soğutulmadan gönderilebilir. Numuneler yalıtımlı bir kap içinde bir gecede veya 2 günde teslim eden bir şirket kullanılarak gönderilmelidir. Test laboratuvarında numuneler eğer analiz bir hafta içinde yapılacaksa 2-8°C'de saklanmalıdır. Analiz bir haftadan daha geç yapılacaksa numuneleri 3 aya kadar -20°C'de saklayın (dondurmadan önce bakınız *Servikal Biyopsiler* altında *Notlar*). STM'ye bakteriyel üremeyi geciktirmek ve DNA bütünlüğünü korumak için bir koruyucu eklenmiştir. Bunun organizmalar veya hücrelerin canlılığını koruması **amaçlanmamıştır**. *digene* HC2 DNA Collection Device hamile kadınlardan numune alınması için kullanılmamalıdır.

SERVİKAL BİYOPSİLER

Yeni toplanmış ve 2–5 mm çapraz keside sahip servikal biyopsiler de *digene* HC2 HPV DNA Testiyle analiz edilebilir. Biyopsi numunesi hemen 1,0 ml STM içine yerleştirilmeli ve -20°C'de dondurulmuş olarak saklanmalıdır. Biyopsi numuneleri gece iletim için 2-30°C'de test laboratuvarına gönderilip işleninceye kadar -20°C'de saklanabilir. Çapı 2 mm'den az biyopsiler kullanılmamalıdır.

Notlar: Kapakların dondurulmuş gönderilen veya saklanan numune tüplerinden fırlamasını önlemek için:

- Daha önce dondurulmuş numune tüplerini göndermeden önce kapakları Parafilm ile kaplayın. Numuneler dondurulmuş olarak veya 20-25°C'de gönderilebilir.
- Numuneleri test yapmak için dondurucudan çıkarırken kapakları hemen Numune Toplama Tüpü Vidalı Kapaklarıyla değiştirin.

PRESERVCYT SOLÜSYONU İÇİNDE SERVİKAL NUMUNELER

Bir süpürge tipi toplama cihazı veya fırça/spatül kombinasyonu ile toplanıp PreservCyt Solüsyonuna ThinPrep® Pap Testi lamları yapmak üzere toplanan numuneler de *digene* HC2 HPV DNA Testi ile kullanılabilir. Numuneler rutin şekilde toplanmalı ve ThinPrep Pap Test lamları Hologic talimatına göre hazırlanmalıdır.

Not: *digene* HC2 HPV DNA Test için en az 4 ml PreservCyt Solüsyonu kalmalıdır. Pap testi hazırlandıktan sonra 4 ml altında kalan numuneler yetersiz materyal içerebilir ve *digene* HC2 HPV DNA Test ile yalancı negatif sonuç verebilir.

PreservCyt Solüsyonu numuneleri toplandıktan sonra *digene* HC2 HPV DNA Test için işleme öncesinde üç aya kadar 2°C ve 30°C sıcaklıkları arasında tutulabilir. PreservCyt Solüsyonu numuneleri dondurulamaz. Bu numuneleri işlemek için bakınız *PreservCyt Numune Hazırlama İşlemi*.

SUREPATH KORUYUCU SIVISINDA SERVİKAL NUMUNELER

(SADECE Yüksek Risk HPV DNA testi için)

SurePath numuneleri için manuel örnek hazırlama SurePath Pap Testi lamalarının hazırlanmasının sonucunda oluşan post gradiyent hücre peleti kullanılarak yapılır. SurePath Pap Testi lamalarını BD PrepStain® Slide Processor için geçerli talimata göre hazırlayın.

Önemli: SurePath Pap lamı hazırlanmasından hemen sonra rezidüel hücre peletini içeren santrifüj tüpüne 2,0 ml SurePath Koruyucu Sıvısı pipetlenmelidir. Bu işlem *digene* HC2 HPV DNA Testinin yapılması için post-gradiyent hücre peleti bütünlüğünü korur.

SurePath Koruyucu Sıvılı post gradiyent hücre peleti *digene* HC2 HPV DNA Testi için örnek hazırlama öncesinde 2–30°C'de 4 haftaya kadar saklanabilir.

Post gradiyent hücre peleti SurePath numuneleri bu kullanma talimatında belirtildiği şekilde hazırlanır. Manuel örnek hazırlamanın sonucu testin hibridizasyon adımına ilerlemeye hazır bir denatüre edilmiş örnektir.

TEST İŞLEMİ

Numuneler enfeksiyöz ajanlar içerebilir ve uygun şekilde muamele edilmelidir. *digene* HC2 HPV DNA Test yüksek hacimli örnek çıktı testi Rapid Capture System aleti kullanılarak veya bu kullanma talimatında talimat verildiği şekilde manuel olarak yapılabilir.

RAPID CAPTURE SYSTEM KULLANILARAK YÜKSEK HACİMLİ ÖRNEK ÇIKTI TESTİ

Rapid Capture System, yüksek hacimli örnek çıktı testi için *digene* HC2 HPV DNA Test ile kullanılabilen bir genel kullanımlık otomatik pipetleme ve seyreltme sistemidir. Bu sistem, kullanıcı girişiminin gerekmediği 3,5 saatlik bir dönem dahil sekiz saatte 352 adete kadar numuneyi alabilir; 13 saatte 704 adede kadar numune sonucu elde edilebilir. Numunelerin test yapmaya hazırlık için denatürasyonu, numunelerin RCS platformuna yerleştirilmesinden önce RCS'den bağımsız olarak yapılır. Ayrıca hem manuel hem RCS yöntemlerinde çevrim dışı DML cihazı kullanılarak kemiluminesan sinyal saptama ve sonuç bildirimini gerçekleştirilir. *digene* HC2 HPV DNA Testi işlem adımlarının her biri manuel test işlemiyle tam olarak aynı sırada yapılır. RCS Uygulaması numuneler ve gerekli analiz Kalibratörleri ve Kalite Kontrolleri içeren 4 adede kadar mikropolanın üst üste işlenmesini mümkün kılar.

Rapid Capture System kullanırken gerekli işlemler ve tanımlayıcı bilgi için bu kullanma talimatına ek olarak aletle sağlanan *Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı (Rapid Capture System User Manual)* belgelerine başvurun.

MANUEL YÖNTEM

Kurulum

1. Soğuk durumdan başlandığında Microplate Heater I **ürününün $65 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklığa dengelenmesi için en az 60 dakika bekleyin.** Daha fazla ayrıntı için bakınız *Microplate Heater I Kullanıcı El Kitabı (Microplate Heater I User Manual)*.
2. Su banyosunun 65°C sıcaklıkta olduğunu ve su seviyesinin numune tüplerindeki tüm hacmi örtmeye yeterli olduğunu doğrulayın.
3. Numuneleri ve **tüm** gerekli Reaktifleri buzdolabından **analize başlamadan önce çıkartın.** 15 - 30 dakika boyunca $20-25^\circ\text{C}$ 'ye gelmelerini bekleyin.
Not: Herhangi bir önceden denatüre edilmiş numuneyi ve kit reaktifini oda sıcaklığına dengelemeden önce PreservCyt Solüsyonu ve SurePath numunelerini hazırlayın.
4. Analiz plaka düzenini oluşturmak üzere *digene* tahlil analiz yazılımı kullanın. Bir plaka düzeni oluşturma talimatı için ilgili kullanıcı el kitabına başvurun.
5. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve test edilecek numuneleri test edilecekleri sırayla bir test tüpü askısına yerleştirin. **Negatif Kalibratör, Düşük Risk HPV Kalibratör ve Yüksek Risk HPV Kalibratör ÖNCE test edilmelidir.** Negatif Kalibratör (NC), Düşük Risk HPV Kalibratör (LRC) veya Yüksek Risk HPV Kalibratör (HRC), Düşük Risk Kalite Kontrol (QC1-LR), Yüksek Risk Kalite Kontrol (QC2-HR) ve numuneleri bir 8 mikropolaka kuyusu sütun konfigürasyonunda çalıştırın. Aşağıdaki *Örnek Düzene* bakınız.

| 24 Mikroplaka kuyusu Çalışması için Örnek Düzen: | | | |
|--|--------------|----------|-----------|
| Sıra | Sütun | | |
| | 1 | 2 | 3 |
| A | NC | Numune 1 | Numune 9 |
| B | NC | Numune 2 | Numune 10 |
| C | NC | Numune 3 | Numune 11 |
| D | LRC veya HRC | Numune 4 | Numune 12 |
| E | LRC veya HRC | Numune 5 | Numune 13 |
| F | LRC veya HRC | Numune 6 | Numune 14 |
| G | QC1-LR | Numune 7 | Numune 15 |
| H | QC2-HR | Numune 8 | Numune 16 |

6. Kombine Prob Kokteyli (CPC) kullanılıyorsa NC, LRC ve HRC üçlü olarak aynı mikroplakada Kombine Prob Kokteyli ile test edilir. NC için A1, B1 ve C1 kuyuları kullanın ve LRC ve HRC için sırasıyla D1, E1, F1, G1, H1 ve A2 kuyularını kullanın. B2 ve C2 kuyusunu sırasıyla QC1-LR ve QC2-HR Kalite Kontroller ve D2 ile başlayan numuneler için kullanın. **CPC işlemi Rapid Capture System ile kullanılmak üzere doğrulanmamıştır.**

7. İkili Prob Yöntemi için Düşük Risk HPV Prob Karışımı testlerini mikroplakanın sol tarafında ve Yüksek Risk HPV Prob Karışımı testlerini mikroplakanın sağ tarafında yapın.

ÖNCE Negatif Kalibratör (NC) ve Düşük Risk Kalibratör (LRC) ürünlerini üçlü olarak Düşük Risk HPV Prob Karışımı ile test edin. Sonra Kalite Kontrolleri (QC1-LR ve QC2-HR) ve numuneleri tek tek ve ayrıca Düşük Risk HPV Prob Karışımı ile test edin. NC replikatlarını A1, B1, C1'e koyun; LRC replikatlarını D1, E1, F1'e koyun; QC1-LR'yi G1'e koyun; QC2-HR'yi H1'e koyun; ve numuneleri A2 ile başlayarak koyun.

SONRA NC ve Yüksek Risk Kalibratör (HRC) ürününü Yüksek Risk HPV Prob Karışımı ile üçlü olarak test edin. Sonra QC1-LR ve QC2-HR'yi tek tek ve ayrıca Yüksek Risk HPV Prob Karışımı ile test edin. NC replikatlarını A7, B7, C7'ye koyun; HRC replikatlarını D7, E7, F7'ye koyun; QC1-LR G7'ye koyun; QC2-HR H7'ye koyun; numuneleri A8 ile başlayarak koyun. Yukarıdaki örnek düzene bakınız.

Yazılımda Kalibratör/Kalite Kontrol/numune kurulumu için ilgili kullanıcı el kitabına başvurun.

8. Alternatif olarak Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Probu ile test edilen Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneler için iki ayrı mikroplaka kullanılabilir. NC ve LRC üçlü olarak test edilir ve QC1-LR ve QC2-HR Düşük Risk HPV Prob Karışımı ile tek bir mikroplakada tek tek test edilir ve NC ve HRC üçlü olarak test edilir ve QC1-LR ve QC2-HR Yüksek Risk HPV Prob Karışımı ile ikinci bir mikroplakada tek tek test edilir. NC için A1, B1 ve C1 kuyularını ve LRC veya HRC için sırasıyla D1, E1, F1 kuyularını kullanın. QC1-LR ve QC2-HR Kalite Kontroller için sırasıyla G1 ve H1 kuyularını kullanın.
9. Numuneler, CPC Yöntemi kullanılıyorsa Kombine Prob Kokteyli ile tek tek veya İkili Prob Yöntemi kullanılıyorsa Düşük Risk HPV Prob Karışımı ile tek tek ve Yüksek Risk HPV Prob Karışımı ile tek tek test edilebilir.

DENATÜRASYON

Notlar:

- **Uyarı:** Denatürasyon Reaktif çürütücüdür. Kullanırken dikkatli olun ve pudrasız eldivenler kullanın.
- **Önemli:** Bazı servikal numuneler Denatürasyon Reaktif eklendiğinde renk değişikliklerini maskeleyebilecek kan veya diğer biyolojik materyal içerebilir. Denatürasyon Reaktif eklenmeden önce koyu renkli numuneler bu adımda uygun renk değişimini vermeyebilir. Bu durumlarda doğru renk değişimini göstermemek analiz sonuçlarını etkilemez. Uygun karşım Kalibratörler ve Kalite Kontrollerin renk değişimi gözlenerek doğrulanabilir.
- Denatürasyon ve hibridizasyon adımları sırasında su banyosundaki su seviyesinin tüp içindeki tüm numune hacmini örtmeye yeterli olduğunu doğrulayın.
- Kalibratörler, Kontroller ve numuneler denatürasyon adımı hazırlanıp gece boyunca 2- 8°C veya 3 aya kadar -20°C sıcaklıkta saklanabilir. Her çözme döngüsünde oda sıcaklığında maksimum 2 saat olmak üzere maksimum 3 dondurma/çözme döngüsü kullanılabilir. Kullanmadan önce iyice karıştırın.
- Denatürasyon ve inkübasyon sonrasında numuneler artık enfeksiyöz kabul edilmez.²⁶ Ancak laboratuvar personeli halen ulusal ve yerel önlemlere uymalıdır.
- Numune toplama cihazını Denatürasyon öncesinde çıkarmayın.
- Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için tüm Kalibratör, Kalite Kontrol ve STM numune materyalinin Denatürasyon Reaktifine temas etmesi önemlidir. Denatürasyon Reaktif eklendikten sonra karıştırma kritik bir adımdır: **Multi-Specimen Tube Vortexer 2 cihazının 100 (maksimum hız) değerine ayarlandığından ve karıştırma sırasında sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkayacağı şekilde görünür bir sıvı vorteksi görüldüğünden emin olun. Manuel vorteksleme yapılıyorsa her Kalibratör, Kalite Kontrol ve numunenin her biri tam hızda 5 saniye vortekslenerek ayrı ayrı sıvı vorteksi tüpün tüm iç yüzeyini yıkayacak şekilde karıştırıldığından ve sonrasında tüpün bir kez ters düz edildiğinden emin olun.**

Kalibratörler, Kalite Kontroller ve STM Numune Hazırlama İşlemi

1. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve STM numunesi tüplerinden kapakları çıkarın ve atın.
Not: Numune tüplerinden çıkarılan kapakların enfeksiyöz olabileceği kabul edilir. Ulusal/yerel düzenlemelerle uyumlu olarak atın.
2. Denatürasyon Reaktifini Gösterge Boya ile bir tekrarlayan veya ayarlanabilir pipetör kullanarak her Kalibratör, Kalite Kontrol veya STM numunesini pipetleyin. Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden tüplerin kenarlarına dokunmamaya dikkat edin. Gerekli Denatürasyon Reaktif hacmi numune hacminin yarısında eşittir. Her Kalibratör, Kalite Kontrol ve numune tipi için kesin hacim aşağıdaki tabloda liste halinde verilmiştir.

Şişede kalan Denatürasyon Reaktifini ulusal/yerel laboratuvar işlemlerine göre atmadan önce seyreltin.

| Kalibratör, Kalite Kontrol veya Numune | Gerekli Denatürasyon Reaktif Hacimleri |
|---|--|
| Negatif Kalibratör | 1000 µl |
| Düşük Risk veya Yüksek Risk HPV Kalibratör | 500 µl |
| Düşük Risk veya Yüksek Risk Kalite Kontroller | 500 µl |
| Servikal Numune | 500 µl |

3. Numuneleri aşağıdaki iki yöntemden birini kullanarak karıştırın.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 Yöntemi

Not: MST Vortexer 2 ile karıştırılan *digene* HC2 DNA Collection Device numuneleri Hibridizasyon Mikroplakası ve Microplate Heater I yöntemi ile **mutlaka** hibridize edilmelidir.

- Kalibratör, Kalite Kontroller ve STM numune tüplerini DuraSeal Tüp Mühürleyici Film ile filmi askıdaki tüpler üzerine çekerek örtün.
- Askı kapağını film kaplı tüpler üzerine yerleştirin ve kapağı iki yan klipsle yerine kilitleyin. Filmi kesme cihazı ile kesin.
- Askıyı Multi-Specimen Tube Vortexer 2 üzerine yerleştirin ve askıyı klempile sabitleyin. Hız ayarının 100 (maksimum hız) olduğundan emin olun ve vorteksleyici güç anahtarını AÇIK pozisyona çevirin. Tüpleri 10 saniye boyunca vorteksleyin.

Manuel Ayrı Tüp Vorteksleme Yöntemi

- Kalibratör, Kalite Kontroller ve STM numune tüpleri üzerine temiz Numune Toplama Tüpü Vidalı Kapakları kullanarak tekrar kapak kapatın.
- Her tüpü yüksek hızda 5 saniye ayrı olarak vorteksleyerek iyice karıştırın.
- Her numune tüpünü tüp içi kapak ve kenarı yıkamak için bir kez ters çevirin.
- Tüpü tekrar askıya koyun.

Kullanılan vorteksleme yönteminden bağımsız olarak **karıştırma sırasında sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkayacağı şekilde her tüp içinde görünür bir sıvı vorteksi olmalıdır**. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneler mor renk almalıdır.

4. Tüpleri $65 \pm 2^\circ\text{C}$ su banyosunda bir askı içinde 45 ± 5 dakika inkübe edin (denatüre edilmiş Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneler hemen test edilebilir veya yukarıda Notlar içinde tanımlandığı şekilde saklanabilir). Bu inkübasyon sırasında HPV Prob Karışımı hazırlayın. Bakınız *Reaktif Hazırlama ve Saklama* kısmı.

PreservCyt Solüsyon Numune Hazırlama İşlemi

Notlar:

- Tüm ayrıntılar için *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına başvurun.
- Bir 4 ml PreservCyt Solüsyonu bölüntüsünü işleme koymak manuel test yapıldığında 2 test için yeterli miktar üretir. İşlenebilecek minimum hacim 4 ml'dir.
- PreservCyt Solüsyonunu 36 adet veya altında gruplar halinde hazırlayın; aksi halde peletler süpernatant dekantasyonu sırasında yerinden oynayabilir. Bu durum dekantasyon adımı sırasında hücre peleti büyüklüğünü devam ettirmek için önemlidir. Ek PreservCyt Solüsyonları flakonları hazırlıyorsanız bunları ilk grup hazırlanması tamamlanmadan hazırlamaya başlamayın.

Reaktif Hazırlama

digene HC2 HPV DNA Testiyle sağlanan Denatürasyon Reaktifini (DNR) (bakınız *Reaktif Hazırlama ve Saklama*) veya *digene* HC2 Sample Conversion Kitiyle sağlanan DNR'yi kullanın. *digene* HC2 Sample Conversion Kitiyle sağlanan DNR'yi hazırlamak için DNR şişesine 3 damla Gösterge Boyası ekleyin ve iyice karıştırın. Solüsyon homojen, koyu mor renkte olmalıdır. Hacim gerekliliklerini belirlemek için Tablo 1'i kullanın.

Tablo 1
Hacim Gereklilikleri: Reaktif Hazırlama

| Test Sayısı | PreservCyt Solüsyonu Hacmi | Dönüştürme Tamponu Hacmi |
|-------------|----------------------------|--------------------------|
| 1-2 | 4 ml | 0,4 ml |
| 3 | 6 ml | 0,6 ml |
| 4 | 8 ml | 0,8 ml |
| 5 | 10 ml | 1,0 ml |
| 6 | 12 ml | 1,2 ml |

1. Bir *digene* HC2 Numune Dönüştürme tüpü, 10 ml konik Sarstedt tüpü veya 15 ml VWR yada Corning marka konik tüpü uygun numune tanımlama numarasıyla etiketleyin.
2. Her defasında bir numune kullanarak:
 - a. PreservCyt flakonunu hücreler homojen dağılmış görününceye kadar elle kuvvetlice sallayın.
 - b. Hücreler çok hızlı çöktüğünden hemen uygun hacimde PreservCyt numunesini etiketli tüpe pipetleyin. PreservCyt solüsyonunu hücresel materyalin tüpün iç kısmına yapışmasını minimuma indirmek üzere konik tüpün altına iletin.
3. Her tüpe uygun hacimde Örnek Dönüştürme Tamponu ekleyin (bakınız Tablo 1).
4. Her tüpün kapağını kapatıp kap ataşmanlı vorteks karıştırıcı kullanarak içeriğini iyice karıştırın.
Not: MST Vortexer 2 işlemi santrifügasyon öncesinde Örnek Dönüştürme Tamponlu PreservCyt Solüsyonu numunelerini vortekslemek için doğrulanmamıştır ve bu nedenle bu adım için kullanılmamalıdır.
5. Tüpleri bir sallanan kova rotor içinde 15 ± 2 dakika boyunca $2.900 \pm 150 \times g$ hızında santrifüje edin.
6. Santrifügasyon sırasında Numune Nakil Ortamı/Denatürasyon Reaktifi karışımını (STM/DNR) Tablo 2 uyarınca 2:1 oranında hazırlayın.

Not: STM/DNR Karışımı testin yapıldığı her gün taze olarak hazırlanmalıdır.

- a. Gerekli STM/DNR karışımının total hacmini belirlemek için PreservCyt Solüsyonu numunesinin başlangıç hacmini bir kılavuz olarak kullanın ve sonra "tüp başına" STM ve DNR hacimlerini işlenecek numune sayısı ile çarpın (bakınız Tablo 2).

Tablo 2
Hacim Gereklilikleri: STM/DNR

| Test Sayısı | PreservCyt Solüsyonu Hacmi | Son STM/DNR Karışımı için tüp başına STM Hacmi* | Son STM/DNR Karışımı için tüp başına DNR Hacmi* | Tüpe eklenen STM/DNR Karışımı |
|-------------|----------------------------|---|---|-------------------------------|
| 1-2 | 4 ml | 120 µl | 60 µl | 150 µl |
| 3 | 6 ml | 170 µl | 85 µl | 225 µl |
| 4 | 8 ml | 220 µl | 110 µl | 300 µl |
| 5 | 10 ml | 270 µl | 135 µl | 375 µl |
| 6 | 12 ml | 320 µl | 160 µl | 450 µl |

* Bu sütunlarda liste halinde verilen hacimler doğrudan numune tüpüne eklenmemelidir.

- b. Solüsyonu vortekslemeyle iyice karıştırın.

7. Tüpleri santrifüjden birer birer çıkarın ve bir askı veya Dönüştürme Askısına yerleştirin. Her tüpün altında pembe/turuncu bir pelet olmalıdır.
Not: Santrifügasyondan sonra görünür bir pelet olmayan numuneler test için kabul edilebilir değildir ve atılmalıdır.
8. Her tüpü ayrı olarak kullanarak:
 - a. Kapağı çıkarın ve temiz tiftiksiz bir kağıt havlu üzerine köşeye koyun.
 - b. Süpernatantta dikkatle dekantasyon yapın.
 - c. Ters çevrilmiş tüp pozisyonunu koruyun ve artık tüpten sıvı damlamayınca kadar emici tiftiksiz kağıt havlular üzerine yavaşça dokunun (yaklaşık 6 kez). Her seferinde kağıt havlunun temiz bir bölgesini kullanın. Kurutma sırasında hücre peletlerinin tüpte aşağı kaymasına izin **vermeyin**.
Notlar:
 - Emici tiftiksiz kağıt havlunun aynı bölgesine birden fazla kez dokunmayın.
 - Kağıt havluya dokunma yoluyla maksimum PreservCyt Solüsyonu gidermek önemlidir. Ancak kağıt havluya dokunduktan sonra kalan PreservCyt Solüsyonu görmek normaldir.
 - d. Tüpü bir askı veya Dönüştürme Askısına yerleştirin.

VORTEKSLEME VE DENATÜRASYON

Manuel Vorteksleme İşlemi

1. Her pelete uygun hacimde STM/DNR ekleyin (bakınız Tablo 2). Her tüpün kapağını kapatın ve her tüpü ayrı olarak en yüksek hız ayarında en az 30 saniye vorteksleyerek peletleri tekrar süspansiyon haline getirin. Peletin tekrar süspansiyon haline getirilmesi zorsa ek 10-30 saniye veya pelet tüp altından gevşeyip yüzer hale gelinceye kadar vorteksleyin. Bir pelet ek vortekslemeden sonra (maksimum toplam 2 dakika) çözünmemiş halde kalırsa numune tanımlamasını kaydedin ve sonraki adıma geçin.
2. Tüpleri bir askıya yerleştirin.
3. Askıyı 15 ± 2 dakika boyunca bir $65 \pm 2^\circ\text{C}$ su banyosuna yerleştirin. Su seviyesinin tüplerdeki tüm sıvıyı örtmeye yetecek düzeyde olduğundan emin olun.
4. Askıyı numunelerle su banyosundan çıkarın ve numuneleri tek tek 15-30 saniye vorteksleyin.
Not: Bu noktada tüm peletlerin tamamen tekrar süspansiyon haline geldiğinden emin olun. Hala görünür pelet olan numuneler test için kabul edilebilir değildir ve atılmalıdır.
5. Askıyı tekrar $65 \pm 2^\circ\text{C}$ su banyosuna koyun ve denatürasyona 30 ± 3 dakika daha devam edin.
6. *Hibridizasyon* Adımına devam edin veya denatüre numunelerin saklanması ve muamelesi için *İsteğe Bağlı Durma Noktası* kısmına bakınız.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 İşlemi

Notlar:

- Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 işlemi süpernatant santrifügasyon ve dekantasyonu sonrasında PreservCyt Solüsyonu numunelerinin işlenmesi için doğrulanmıştır.
- PreservCyt Solüsyonu numune işlenmesi için sadece MST Vortexer 2 tasarlanmıştır.
- Dönüştürme Askısı ve Kapağı özellikle *digene* HC2 Sample Conversion Tüpleri (VWR veya Corning marka 15 ml konik tüpler) almak üzere tasarlanmıştır. Kullanıcı her seferinde Dönüştürme Askısında sadece tek tüp tipi kullanılmalıdır. Diğer markalar kullanım açısından doğrulanmamıştır.
- Dönüştürme Askısı ve Kapağı için belirtilen vorteksleme sürelerine katı şekilde uymak gereklidir.
- *digene* HC2 DNA Test kiti Kalibratörleri veya Kalite Kontrolleri vortekslenirken Dönüştürme Askısı ve Kapağı kullanılamaz. STM tüplerinin yüksekliği Dönüştürme Askısı ve Kapağı kullanılarak yeterli vortekslemeyi önler.

1. Her etiketli 15 ml tüpü kağıt havluya dokunduktan sonra her birini Dönüştürme Askısında uygun pozisyona yerleştirin.
2. Her pelete uygun hacimde STM/DNR karışımı ekleyin (Tablo 2).
3. 15 ml konik tüpleri DuraSeal tüp mühürleyici filmle filmi askıdaki tüpler üzerine çekerek örtün.
4. Askı kapağını film kaplı tüpler üzerine yerleştirin ve kapağı iki yan klempile yerine kilitleyin. Kapak sıkıca sabitlendikten sonra filmi kesme cihazıyla kesin.
5. Kırmızı saplı kolu yatay pozisyonda olacak şekilde yukarı hareket ettirin.
6. Dönüştürme Askısı ve Kapağı MST Vortexer 2 üzerine Dönüştürme Askısının büyük çentikli köşesi sağ ön köşede yer alacak şekilde yerleştirin. Askı ve kapağı MST Vortexer 2 platformu üzerinde kılavuzlara sıkıca oturacak şekilde konumlandırın. Askıyı kırmızı saplı kolu aşağıya dikey pozisyona hareket ettirerek yerine sabitleyin. Bu işlem askıyı yerine kilitlet.
7. Hız ayarınının 100 (maksimum hız) ve Pulser geçiş anahtarınının KAPALI durumda olduğundan emin olun.
8. Vorteksleyici güç anahtarını AÇIK pozisyona çevirin. **Tüpleri 30 saniye boyunca vorteksleyin.**
9. Vorteksleyici güç anahtarını KAPALI pozisyona çevirin.
10. Dönüştürme Askısı ve Kapağı MST Vortexer 2 üzerinden kırmızı saplı kolu yukarı kaldırarak çıkarın.
11. Askıyı 15 ± 2 dakika boyunca bir 65 ± 2°C su banyosuna yerleştirin. Su seviyesinin tüplerdeki tüm sıvıyı kaplamaya yeterli olduğundan emin olun.
12. 15 dakika inkübasyondan sonra askıyı numunelerle su banyosundan çıkarın.
13. Sıçramayı önlemek için askıyı MST Vortexer 2 üzerine yerleştirmeden önce fazla suyu kurutun.
14. Dönüştürme Askısı ve Kapağını MST Vortexer 2 üzerine *Adım 6* içinde tanımlandığı şekilde sabitleyin.
15. Hız ayarınının 100 olduğundan emin olun ve Vorteksleyici güç anahtarını AÇIK pozisyona çevirin. **Tüpleri 1 dakika vorteksleyin.**
16. Vorteksleyici güç anahtarını KAPALI pozisyona çevirin.
Not: MST Vortexer 2 İşlemi Manuel Vorteksleme İşlemini kullanırken gerektiği şekilde hücre peletlerini görsel kontrol etme gereksinimini ortadan kaldıracak bir biçimde karıştırma hızı, süreleri ve sürecini standart hale getirir.
17. Askıyı tekrar 65 ± 2°C su banyosuna koyun ve denatürasyona 30 ± 3 dakika daha devam edin.
18. Askıyı su banyosundan çıkarın, askıyı kurulayın ve vortekse sabitleyin.
19. Vorteksleyici güç anahtarını AÇIK pozisyona çevirin. **Maksimum ayarda 10 saniye vorteksleyin.**
20. Vorteksleyici güç anahtarını KAPALI pozisyona çevirin. Askıyı çıkarın.
21. Askı Kapağı ve DuraSeal tüp mühürleyici filmi numunelerden hemen çıkarın.
22. *Hibridizasyon* Adımına devam edin veya denatüre numunelerin saklanması ve muamelesi için *İsteğe Bağlı Durma Noktası* kısmına bakınız.

SurePath Numune Hazırlama İşlemi (SADECE Yüksek Risk HPV DNA testi için)

Sitolojik işleme sonrasında şu şekilde devam edin:

1. Gözlenen sıvı hacminin 2,8 ml'ye eşit olduğundan emin olun.

DİKKAT: Rezidüel hücre peleti 1 ml'den az sıvı içeriyor gibiyse sitoloji sonrasında SurePath Koruyucu Sıvısının eklenmemiş olması ve numunenin yüksek risk HPV DNA testi açısından uygun OLMAMASI mümkündür.

2. Numunelerin oda sıcaklığına dengelendiğinden emin olun.
3. Numuneyi bir sallanan kova rotor içinde 10 ± 1 dakika boyunca 800 ± 15 x g hızında santrifüje edin.
4. Tüpleri santrifüjden çıkarın.

5. Santrifügasyondan sonra süpernatantta dikkatle dekantasyon yapın ve fazla sıvıyı gidermek için her tüpü emici kağıt havlulara yavaşça dokunun (yaklaşık 3 kez). Her tüpteki peleti izleyin **Hücre peletlerinin kağıt havluya dokunma sırasında tüpte aşağı kaymasına izin vermeyin.**
6. Tüpleri askıya yerleştirin.
7. Bir tekrarlayan veya ayarlanabilir pipetör kullanarak her pelete 200 µl STM ekleyin.
Not: Tüpler kapak kapatılmadan karıştırılabilir.
8. Her peleti, her tüpü ayrı olarak yüksek hızda 15 saniye vorteksleyerek tekrar süspansiyon haline getirin. Peletin tekrar süspansiyon haline getirilmesi zorsa ek 5-30 saniye veya pelet tüp altından gevşeyip yüzer hale gelinceye ve çözünüyor gibi görününceye kadar vorteksleyin.
9. Bir tekrarlayan veya ayarlanabilir pipetör kullanarak her numuneye 100 µl hazırlanmış Denatürasyon Reaktifi (Gösterge Boyalı) pipetleyin.
DİKKAT: Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden tüplerin kenarlarına dokunmamaya dikkat edin.
Kalan Denatürasyon Reaktifi atılıyorsa lütfen koroziv maddelerin atılması için yerel, bölgesel ve ulusal düzenlemelere uyun.
10. Her tüpü yüksek hızda 5 saniye ayrı olarak vorteksleyerek iyice karıştırın.
Not: Tüpler kapak kapatılmadan karıştırılabilir.
Bir 15 ml konik tüpü uygun numune tanımlamasıyla ve tipiyle etiketleyin (örneğin SurePath numune tipi için "SP") ve bir askıya yerleştirin.
Not: Yarı otomatik analiz işleme için Rapid Capture System kullanılıyorsa *digene* Dönüştürme Askısına (gümüş askı) uygun şekilde yerleştirmek için VWR veya Corning marka 15 ml konik tüpler kullanılmalıdır.
11. Tüm tüp hacmini vidalı kapaklı bir 15 ml konik tüpe tek kullanımlık, 7-ml standart uçlu bir transfer pipeti veya eşdeğeri kullanarak aktarın¹.
12. 15 ml konik tüplerin kapağını kapatın.
13. Bir 65 ± 2°C su banyosunda 90 ± 5 dakika inkübe edin.
DİKKAT: Bu inkübasyon süresi diğer onaylı numune tipleri için gerekenden daha uzundur.
14. Eğer HPV testi aynı gün tamamlanacaksa, *digene* HC2 DNA Testi kalibratörlerini bu kullanma talimatına göre denatüre edin.
15. Örnek askısını su banyosundan çıkarın.

İsteğe Bağlı Durma Noktası

Denatürasyondan sonra STM numuneleri ve dönüştürülmüş PreservCyt ve SurePath numuneleri gece boyunca 2-8°C veya 3 aya kadar -20°C sıcaklıkta saklanabilir. Gece boyunca buzdolabında saklama için numuneler DuraSeal film ve Askı Kapağı yerleştirilmiş olarak Dönüştürme Askısında bırakılabilir. -20°C'de saklama öncesinde Askı Kapağı ve DuraSeal film çıkarılmalı ve tüpler üzerine kapaklar yerleştirilmelidir. Her durumda numuneler oda sıcaklığına (20 - 25°C) dengelenmeli ve Hibridizasyon adımına ilerlemeden önce iyice vortekslenmelidir.

Not: Denatüre numuneleri kuru buzda göndermeyin veya saklamayın.

Her çözme döngüsünde oda sıcaklığında maksimum 2 saat olmak üzere maksimum 3 dondurma/çözme döngüsü kullanılabilir.

¹ QIAGEN doğrulama testleri VWR marka 15 ml konik tüpler kullanmıştır

HİBRİDİZASYON: KOMBİNE PROB KOKTEYLİ (CPC) VE İKİLİ PROB YÖNTEMLERİ

Notlar:

- HPV Prob Karışımları visközdür. Prob Karışımının iyice karıştırıldığından ve her mikroplaka kuyusuna gerekli miktarın tamamen verildiğinden emin olun. Bakınız Reaktif *Hazırlama ve Saklama* kısmı.
- Denatüre numune -20°C'de saklandıysa numunenin 20-25°C'ye çözünmesini bekleyin ve hibridizasyonla devam etmeden önce numuneyi iyice vorteksleyin.
- Microplate Heater I'i kullanımdan en az 60 dakika önce 65 ± 2°C sıcaklığa ön ısıtın. Gerektiği şekilde daha ileri talimat için *Microplate Heater I Kullanıcı El Kitabı (Microplate Heater I User Manual)* bakınız.

Hibridizasyon Plakası ve Microplate Heater I Kullanılarak Hibridizasyon Yöntemi

Not: *digene* HC2 DNA Collection Device ile STM içinde toplanan ve MST Vortexer 2 yöntemi ile işlenen numuneler **sadece** Microplate Heater I yöntemi kullanılarak hibridize edilebilir.

1. Bir Hibridizasyon Mikroplakası alın ve etiketleyin.
2. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneleri inkübasyondan sonra su banyosundan çıkarın. Çoklu Numune Tüpü Vortexer 2 kullanılıyorsa tüm STM numuneleri askısını maksimum hız ayarında minimum 5 saniye vorteksleyin. PreservCyt Solüsyonu veya Surepath numuneleri için tüm Konversiyon Askısını maksimum hız ayarında minimum 10 saniye vorteksleyin. Alternatif olarak her tüpü en az 5 saniye ayrı ayrı vorteksleyin.
3. Her Kalibratör, Kalite Kontrol veya numuneden 75 µl'yi boş bir hibridizasyon mikroplakası kuyusunu *Kurulum* içinde **oluşturulan** plaka düzenini izleyerek pipetleyin. Kuyuların kenarlarına dokunmaktan kaçının ve hava kabarcıkları oluşmasını sınırlayın. Kalibratörler, Kalite Kontroller veya numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçınmak için her transfer için temiz bir ekstra uzun pipet ucu kullanın. Numune toplama cihazını numune nakil tüpünden çıkarmayın. Denatüre numuneler Numune Toplama Tüpü Vidalı Kapaklarıyla kapatılabilir ve tüplerde kalan numune toplama cihazlarıyla saklanabilir. Denatüre PreservCyt numuneleri orijinal kapaklarıyla kapatılabilir.
Not: Numune bölüntüleri doğru şekilde aktarılmazsa yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir. Numune aktarılması sırasında 75 µl bölüntüyü çıkarırken pipet ucunu tüpün içine dokundurmayın.
4. Son numuneyi aktardıktan sonra plakayı bir plaka kapağı ile kapatın ve **hibridizasyon mikroplakasını 10 dakika 20-25°C'de inkübe edin.**
5. Hazırlanmış ve iyice vortekslenmiş Prob Karışımını tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına bölüntüleyin. Prob Karışımından 25 µl'yi Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneleri içeren her kuyuya 8 kanallı bir pipetör ve her sıra için yeni uçlar kullanarak dikkatle pipetleyin. Prob hacmini her hibridizasyon kuyusuna geriye sıçramadan kaçınarak verin. Kuyuların kenarlarına dokunmaktan kaçının. Plaka kapağını mikroplakaya, denatürasyon inkübasyonu süresince yerleştirin.
6. Hibridizasyon Mikroplakasını bir plaka kapağıyla örtün ve 1100 ± 100 devir/dk hızında ayarlanmış bir Hybrid Capture System Rotary Shaker I cihazında 3 ± 2 dakika sallayın. *Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneler sallandıktan sonra sarı renge dönmelidir.* Mor kalan kuyular uygun miktarda Prob Karışımı almamış olabilir. Mor kalan numunelere ek 25 µl Prob Karışımı koyun ve tekrar sallayın. Kuyular bu işlemde sonra mor kalırsa numuneler tekrar test edilmelidir.

Notlar:

- Salladıktan sonra PreservCyt Solüsyonu numuneleri sarı yerine pembeye dönmelidir.
- Hibridizasyon Mikroplakasını Microplate Heater I içine koyarken sıçramaya neden olmamak için dikkatli olunmalıdır.

7 $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 'ye önceden ısıtılmış ve dengelenmiş bir Microplate Heater I içinde 60 ± 5 dakika inkübe edin.

Mikrotüpler ve Su Banyosu Kullanarak Hibridizasyon Yöntemi

Notlar:

- Karıştırma için MST Vortexer 2 yöntemi ve hibridizasyon için su banyosu yöntemi kullanarak STM içinde *digene* HC2 DNA Collection Device ile toplanmış numunelerin işlenmesi **doğrulanmamıştır**. *digene* HC2 DNA Collection Device ile STM içinde toplanan ve MST Vortexer 2 yöntemi ile işlenen numuneler **sadece** Microplate Heater I yöntemi kullanılarak hibridize edilebilir.
- Denatüre numune -20°C 'de saklandıysa numunenin $20-25^\circ\text{C}$ 'ye çözünmesini bekleyin ve hibridizasyonla devam etmeden önce numuneyi iyice vorteksleyin.

1. Gereken miktarda temiz hibridizasyon mikrotüpünü etiketleyip mikrotüp askısına yerleştirin.
2. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneleri inkübasyondan sonra su banyosundan çıkarın. Her tüpü bölüntüleri çıkarmadan hemen önce en az 5 saniye ayrı olarak vorteksleyin.
3. Her Kalibratör, Kalite Kontrol veya numuneden $75 \mu\text{l}$ 'i boş bir hibridizasyon mikrotüpünün Kurulum içinde **oluşturulan** plaka düzenini izleyerek pipetleyin. Mikrotüplerin yanlarına dokunmaktan kaçının ve hava kabarcıkları oluşmasını sınırlayın. Kalibratörler, Kalite Kontroller veya numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçınmak için her transfer için temiz bir Ekstra Uzun Pipet Ucu kullanın. Numune toplama cihazını numune nakil tüpünden çıkarmak gerekmez. Denatüre numuneler Numune Toplama Tüpü Vidalı Kapaklarıyla kapatılabilir ve tüplerde kalan numune toplama cihazlarıyla saklanabilir.

Not: Numune bölüntüleri doğru şekilde aktarılmazsa yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir. Numune aktarılması sırasında $75 \mu\text{l}$ bölüntüyü çıkarırken pipet ucunu tüpün içine dokundurmuyun.

4. Son numuneyi aktardıktan sonra **hibridizasyon mikrotüplerini $20-25^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika inkübe edin**.
5. Hazırlanmış ve iyice vortekslenmiş Prob Karışımını Tek Kullanımlık Reaktif Rezervuarına bölüntüleyin. Prob Karışımından $25 \mu\text{l}$ 'i Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneleri içeren her mikrotüpe 8 kanallı bir pipetör ve her sıra için yeni uçlar kullanarak dikkatle pipetleyin. Prob hacmini her hibridizasyon mikrotüpüne geriye sıçramadan kaçınarak verin. Tüplerin kenarlarına dokunmaktan kaçının. Askıyı tüm tüplerin uygun miktarda Prob Karışımı aldığından emin olmak için alttan inceleyin.
6. Mikrotüpleri bir plaka mühürleyici ile örtün. Askı kapağını askının üstüne yerleştirin. Mikrotüp askısını 1100 ± 100 devir/dk olarak ayarlanmış bir Rotary Shaker I cihazında 3 ± 2 dakika sallayın. *Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneler sallandıktan sonra sarı renge dönmelidir*. Mor kalan tüpler uygun miktarda Prob Karışımı almamış olabilir. Mor kalan numunelere ek $25 \mu\text{l}$ Prob Karışımı koyun ve tekrar sallayın. Tüpler bu işlemde sonra mor kalırsa numuneler tekrar test edilmelidir.

Not: Salladıktan sonra PreservCyt Solüsyonu numuneleri sarı yerine pembeye dönmelidir.

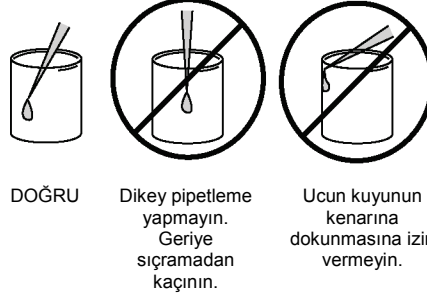
7. Bir $65 \pm 2^\circ\text{C}$ su banyosunda 60 ± 5 dakika inkübe edin. Su banyosundaki su seviyesinin tüm hibridizasyon karışımı hacmini örtmeye yeterli olduğundan emin olun. Mikrotüp askısı su banyosunda yüzer.

Not: Eğer daha önce yapılmadıysa *digene* test analizi yazılımını kullanarak bir plaka düzeni dosyası oluşturun.

HİBRİD YAKALAMA

1. Plaka çerçevesinden gereken sayıda Yakalama Mikroplakası kuyusu dışında tümünü çıkarın. Kullanılmamış mikroplaka kuyularını orijinal torbaya koyup tekrar mühürleyin. Bir gazlı kalemle her sütunu 1, 2, 3 olarak işaretleyin. . . . Mikroplakayı uygun bir tanımlayıcı ile etiketleyin. Numuneler kuyulara Kurulum altında hazırlanmış örnek düzene göre eklenir.
2. Kalibratörler, Kontroller ve numuneleri içeren Hibridizasyon Mikroplakasını Microplate Heater I içinden dikkatle çıkarın. Plaka kapağını hemen çıkarın ve temiz bir yüzeye koyun. Alternatif olarak mikrotüp askısını su banyosundan çıkarın. Askı kapağını hemen çıkarın ve plaka mühürleyiciyi yavaşça askıda yukarı ve askı üzerinden çekin.
3. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numunelerin tüm içeriğini (yaklaşık 100 µl) Hibridizasyon Mikroplakası kuyuları veya Mikrotüplerinden karşılık gelen Yakalama Mikroplakasının alt kısmına 8 kanallı bir pipetör kullanarak aktarın. Aktarılmış her sütun için 8 kanallı pipetör üzerinde yeni pipet uçları kullanın ve tam numune aktarımını sağlamak üzere her pipet ucunun iyice akarak boşalmasına izin verin. İsterseniz pipetör pipet uçlarının **ortası** yakalama mikroplakası kuyularının üst kenarı üzerine dayanarak sabitlenebilir (bakınız Şema 1).

ŞEMA 1: DOĞRU PİPETLEME



4. Yakalama mikroplakasını plaka kapağı veya plaka mühürleyici ile örtün ve Rotary Shaker I üzerinde 1100 ± 100 devir/dk hızında 20-25°C'de 60 ± 5 dakika sallayın.
5. Bu inkübasyon sırasında Yıkama Tamponunu hazırlayın ve Automated Plate Washer Durulama ve Atık rezervuarlarını kontrol edin. Bakınız Reaktif Hazırlama ve Saklama kısmı.
6. Yakalama adımı tamamlandığında Yakalama Mikroplakasını Rotary Shaker I üzerinden çıkarın ve plaka kapağı veya plaka mühürleyiciyi dikkatle çıkarın. Kuyulardan sıvıyı bir lavaboya dökerek giderin; plakayı lavabo üzerinde tamamen ters çevirin ve lavabonun alt kısmına fazla yakın dekantasyonla geri sıçramaya neden olmamaya dikkat ederek aşağı doğru hareketle sıkıca sallayın. **Plakayı ters çevirmeyin**; temiz Kimtowels Wipers veya eşdeğeri tiftiksiz kağıt havlular üzerine 2-3 kez sıkıca vurarak emdirin. Kuyulardan tüm sıvıların giderildiğinden ve plakanın üstünün kuru olduğundan emin olun.

HİBRİD SAPTAMA

Notlar:

- 8 kanallı bir pipetör kullanarak plakada soldan sağa yöne eklemeler yapın.
- Reaktif iletiminin tutarlılığını arttırmak üzere ters pipetleme tekniğinin kullanılması önerilir. Bu teknikte pipet uçları başlangıçta pipetörün aspirat/verme kontrolü (piston) kullanılarak ikinci durdurucu kullanımıyla fazla doldurulur. Aşağıdaki işleme bakınız. Uçları plakaya iletim öncesinde fazla reaktifi gidermek üzere tek kullanımlık reaktif rezervuarına silin.
- İsterseniz pipetör pipet uçlarının ortası mikroplaka kuyularının üst kenarı üzerine dayanarak sabitlenebilir. Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden mikroplaka kuyularının kenarlarına dokunmamaya dikkat edin. Daha önce gösterilen Şema 1'e bakınız.

1. Uygun Saptama Reaktifi 1 hacmini tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına bölüntüleyin (talimat için *Reaktif Hazırlama ve Saklama* Kısımına bakınız). Yakalama Mikroplakasının her kuyusuna 8 kanallı bir pipetör ve ters pipetleme tekniğini kullanarak dikkatle 75 µl Saptama Reaktifi 1'i pipetleyin.

Ters Pipetleme İşlemi:

- a) 8 kanallı pipetöre uçları takın; tüm uçların sıkıca oturduğundan emin olun.
- b) Pipetörün pistonunu ilk durdurucudan öteye ikinci durdurucuya itin.
- c) Uçları Saptama Reaktifi 1 solüsyonuna batırın.
- d) Pistonu yavaşça bırakın ve solüsyonun uçlara dolmasına izin verin.
- e) Solüsyonu (75 µl) pistonu ilk durdurucuya kadar basarak mikroplaka kuyularına verin. Pistonu pipet uçları Saptama Reaktifi 1 solüsyonuna tekrar batıncaya kadar serbest bırakmayın.
- f) Tüm kuyular doluncaya kadar uçları tekrar doldurup tekrarlayın. Mikroplaka kuyularını soldan sağa doldurun. Pembe renk şiddetini gözleyerek tüm kuyuların dolduğunu doğrulayın. Tüm kuyulardaki şiddet benzer olmalıdır.

2. Plakaları plaka kapağı veya temiz Parafilm (veya eşdeğeri) ile kaplayın ve 20-25°C'de 30-45 dakika inkübe edin.

YIKAMA

Yakalama plakasını aşağıdaki iki yöntemden birini kullanarak yıkayın.

Automated Plate Washer Yöntemi

Not: Automated Plate Washer'ı daima **AÇIK** tutun. Durulama Rezervuarının dolu ve Atık Rezervuarının boş olduğundan emin olun. Automated Plate Washer sistemi temizlemek için rutin olarak durular. Gerektiği şekilde daha ileri talimat için Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına bakınız.

HER KULLANIMDAN ÖNCE:

- Yıkama Rezervuarının Yıkama Tampon Solüsyonuyla en azından 1 L işaretine kadar dolduğundan emin olun. Değilse Yıkama Tamponu solüsyonu hazırlayın. Bakınız Reaktif Hazırlama ve Saklama kısmı.
- Durulama Rezervuarının deiyonize veya distile suyla doldurulmuş olduğundan emin olun.
- Atık Rezervuarının boş ve kapağın sıkıca takılmış olduğundan emin olun.
- Automated Plate Washer her yıkamadan önce kendi kendine otomatik olarak sıvı doldurur ve her yıkamadan sonra durulama yapar.

1. Plaka kapağını çıkarın ve plakayı Automated Plate Washer platformuna yerleştirin.
2. Gücün açık olduğunu ve ekranda "Digene Wash Ready" (Digene Yıkama Hazır) veya "P1" yazdığından emin olun.

Not: Sadece kısmi bir yakalama kuyusu stripi kullanılıyorsa, yıkama öncesinde sütunu tamamlamak için boş mikroplaka kuyularının yakalama plakasına yerleştirilmesi gerekecektir.

3. Yıkacak strip sayısını "Rows" (Sıralar) tuşuna basıp sonra ayarlamak için "+" veya "-" kısmına basarak seçin. "Digene Wash Ready" (Digene Yıkama Hazır) ve "P1" kısmını dönmek için "Rows" (Sıralar) tuşuna basın.
4. Başlamak için "Start/Stop" (Başlat/Durdur) kısmına basın.
5. Yıkayıcı yaklaşık 10 dakika sürecek şekilde altı doldurma ve aspirasyon döngüsü yapacaktır. Program sırasında kısa bir duraklama olacaktır yani plakayı vaktinden önce çıkarmayın. Automated Plate Washer yıkaması bittiğinde "Digene Wash Ready" veya "P1" gösterecektir.
6. Program bittiğinde mikroplakayı yıkayıcıdan çıkarın. Plakalar beyaz görünmeli ve mikroplaka kuyularında kalan pembe sıvı bulunmamalıdır.

Manuel Yıkama Yöntemi

1. Saptama Reaktifi 1'i kuyulardan plaka üstüne temiz Kimtowels Wipers veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havlular koyup dikkatle ters çevirerek giderin. Ters çevirmeden önce kağıdın plakanın tüm yüzeyiyle temas halinde olduğundan emin olun. Plakanın 1-2 dakika sıvılarını boşaltmasını bekleyin. Kimtowels Wipers veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havlular üzerine iyice dokunarak kurutun. Kullanılmış kağıt havluları daha sonraki adımlarda alkale fosfataz kontaminasyonundan kaçınmak için dikkatle atın.
2. Yıkama Aygıtını kullanarak plakayı elle 6 kez yıkayın. Her kuyu, kuyu üstlerinden Saptama Reaktifi 1 gidermek üzere taşınca kadar yıkayın. Yıkama A1 kuyusunda başlar ve yılan hareketi gibi sağa ve aşağıya doğru devam eder. Tüm kuyular doldurulduktan sonra sıvıyı lavaboya güçlü bir aşağı doğru hareketle dekantasyon yapın. İkinci yıkama kuyu H12'de başlayıp yılan gibi sola ve yukarı devam eder. Bu 2 yıkama dizisi kuyu başına toplam 6 yıkama olacak şekilde 2 kez daha tekrarlanır.
3. Yıkamadan sonra plakayı temiz Kimtowels Wipers veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havlular üzerine ters çevirip 3-4 kez sıkıca vurarak kurutun. Kağıt havluları değiştirip tekrar sıvıyı giderin. Plakayı ters tutun ve 5 dakika sularını akıtmasını bekleyin. Plakayı bir kez daha bu şekilde kurutun.
4. Plakalar beyaz görünmeli ve mikropplaka kuyularında kalan pembe sıvı bulunmamalıdır.

SİNYAL AMPLİFİKASYONU

NOTLAR:

- Saptama Reaktifi 2 kullanmak için yeni bir eldiven çifti kullanın.
 - Saptama Reaktifi 2 kontaminasyonundan kaçınmak için tek kullanımlık reaktif rezervuarına **sadece** analizi yapmak için gerekli reaktif miktarını bölüntüleyin. Bakınız Reaktif Hazırlama Kısmı. **Saptama Reaktifi 2'yi orijinal şişesine geri koymayın. Kullanım sonrasında kullanılmamış materyali atın.**
 - Saptama Reaktifi 2 eklenmesi kesintisiz olarak yapılmalıdır. Tüm kuyuların inkübasyon süresi mümkün olduğunca yakın olmalıdır.
 - Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden mikropplaka kuyularının yanlarına dokunmamaya veya pipet uçlarına reaktif sıçratmamaya dikkat edin (Bakınız Şema 1).
1. Yakalama Mikropplakasının her kuyusuna 75 µl Saptama Reaktifi 2'yi 8 kanallı bir pipetör kullanarak daha önce tanımlandığı şekilde dikkatle pipetleyin. *Tüm mikropplaka kuyuları sarı renk almalıdır.* Renk şiddetini gözleyerek tüm kuyuların dolduğunu doğrulayın. Tüm kuyulardaki şiddet benzer olmalıdır.
 2. Mikropplakaları bir plaka kapağı ve temiz Parafilm (veya eşdeğeri) ile kaplayın ve 20-25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçının.
 3. DML aletindeki mikropplakayı 15 dakika inkübasyondan sonra (ve en geç 30 dakika inkübasyondan sonra) okuyun.
 4. Analize spesifik yazılım protokolü ilgili test bilgisinin doğrudan yazılıma girilmesini mümkün kılar.
 5. Tam bir mikropplaka kullanılmıyorsa kullanılmış mikropplaka kuyularını mikropplaka tutucudan çıkarın, tutucuyu distile veya deiyonize suyla iyice durulayın, ve kurutup sonraki analiz için ayırın.

ANALİZ KALİBRASYONU DOĞRULAMA KRİTERLERİ

Test Kalibrasyonu Doğrulama reaktifler ve sağlanan Kalibratör ve Kalite Kontrol materyallerinin doğru çalıştığından ve analiz kesme noktası değerinin doğru şekilde saptanmasını mümkün kıldığından emin olmak için yapılır. *digene* HC2 HPV DNA Testi her analiz için kalibrasyon gerektirir ve bu nedenle her analizi aşağıdaki kriterleri kullanarak doğrulamak gereklidir. Bu doğrulama işleminin dahili kalite kontrol testinin yerini alması amaçlanmamıştır. *digene* tahlil analiz yazılımı analiz protokolleri otomatik olarak aşağıdaki kriterleri doğrular.

1 Negatif Kalibratör

Negatif Kalibratör her test analizi ile üçlü olarak test edilmelidir. Negatif Kalibratör ortalaması devam etmek için ≥ 10 ve ≤ 250 RLU olmalıdır. Negatif Kalibratör sonuçları $\leq \%25$ varyasyon katsayısı (%CV) göstermelidir. $\%CV >25$ ise, ortalamadan en uzak RLU değerini bir dışarıda kalan olarak kaldırın ve ortalama değeri kalan iki değeri kullanarak tekrar hesaplayın. Ortalama ile iki değerin her biri arasındaki fark $\leq \%25$ ise adım 2 ile devam edin. Aksi halde, analiz kalibrasyonu doğrulama geçersizdir ve analiz tüm hasta numuneleri için tekrarlanmalıdır. Bunun sonucunda hasta numune sonuçları bildirilmemelidir.

2 Kalibratörler

Kalibratör(ler) her analiz ile üçlü olarak test edilmelidir. CPC için her iki kalibratör üçlü olarak test edilmelidir. Kalibratör sonuçları $\leq \%15$ varyasyon katsayısı (%CV) göstermelidir. CPC için, LRC, HRC ve kombine LRC-HRC için $\%CV, \leq \%15$ değerinde bir $\%CV$ göstermelidir. $\%CV >15$ ise, ortalamadan en uzak RLU değerini bir dışarıda kalan olarak kaldırın ve ortalama kalibratör değerini kalan kalibratör değeri kullanarak tekrar hesaplayın. Sadece 1 LRC ve 1 HRC replikatı silinebilir. Kalibratörlerin $\%CV$ değeri $\leq \%15$ ise adım 3 ile devam edin. Aksi halde, analiz kalibrasyonu doğrulama geçersizdir ve analiz tüm hasta numuneleri için tekrarlanmalıdır. Bunun sonucunda hasta numune sonuçları bildirilmemelidir.

Kalibratörler için yukarıda tanımlanan analiz kalibrasyonu doğrulama *digene* tahlil analizi yazılımı tarafından otomatik olarak yapılır ve veri analizi raporuna yazdırılır. **HPV için *digene* tahlil analiz protokolleri Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Kalibratörleri için $\%CV$ değerinin $\leq \%15$ olduğunu otomatik olarak doğrular.** Ancak *digene* tahlil analiz yazılımı v1.0.2 ve v1.0.3, kalibratörler için $\%CV >\%25$ olmadıkça testi geçersiz duruma getirmez. Bu nedenle kullanıcı *digene* tahlil analiz yazılımı tarafından hesaplanan $\%CV$ değerinin $\leq \%15$ olduğunu manuel olarak doğrulamalı ve aşağıdaki tabloda Durum 1 için belirtildiği şekilde ilerlemelidir. Kalibratör replikatları için $\%CV$ değeri 15 ile 25 arasındaysa aşağıdaki tabloda Durum 2 veya 3 için talimata başvurun ve belirtilen "Kullanıcı Eylemi" ile ilerleyin.

| Durum | LRC ve/veya HRC Replikatlari için Rapor %CV | <i>digene</i> tahlil analiz yazılımının gerçekleştirdiği eylem | Kullanıcı Eylemi |
|-------|---|--|--|
| 1 | $\leq \%15$ | Analiz "Valid (Geçerli)" olarak bildirilir | Sonuçlar bildirilebilir; başka eylem gerekmez. |
| 2 | $\%15$ ile $\%25$ arasında | Dışarıda kalan çıkarılmaz ve analiz "Valid (Geçerli)" olarak bildirilir | Ortamadan en uzaktaki Kalibratör RLU değerini kaldırın. İki kalan değerle Kalibratör $\%CV$ değerini hesaplayın. Kalan RLU değerleri için $\%CV > \%15$ ise analiz geçersizdir. Sonuçlar bildirilmemelidir. Kalan RLU değerleri için $\%CV \leq \%15$ ise analiz kesme noktasını tekrar hesaplayın ve sonra bu kesme noktasını kullanarak her numune için RLU/kesme noktası oranını tekrar hesaplayın. Bu tekrar hesaplanan değerler bildirilebilir. |
| 3 | $\%15$ ile $\%25$ arasında | Kalibratör başına bir dışarıda kalan çıkarılır ve analiz "Valid (Geçerli)" olarak bildirilir | Analiz geçersizdir. Sonuçlar bildirilmemelidir. Analiz tekrarlanmalıdır. |
| 4 | $> \%25$ | Bir dışarıda kalan çıkarılır ve analiz "Invalid (Geçersiz)" olarak bildirilir | Analiz geçersizdir. Sonuçlar bildirilmemelidir. Analiz tekrarlanmalıdır. |

Yukarıda Durum 2 içinde belirtildiği şekilde %CV değerini manuel olarak hesaplamak için kullanıcı kalan replikat RLU değerlerinin standart sapmasını (STDEV) (n-1) kalan replikat RLU değerlerinin ortalamasına (LRC veya HRC veya her ikisi) bölmeli ve sonucu 100 ile çarpmalıdır.

%CV değerini Microsoft® Excel® (*digene* tahlil analiz yazılımının önceki versiyonuyla sağlanmıştır) kullanarak hesaplamak için kullanıcı Kalibratör replikatlarının standart sapmasını *STDEV* formülünü kullanarak hesaplayabilir ve Kalibratörün ortalama RLU değerini *AVERAGE* formülünü kullanarak belirleyebilir. Bu iki değer elde edildikten sonra STDEV değerini AVERAGE değerine bölün ve %CV elde etmek için sonucu 100 ile çarpın.

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

%CV hesaplama, analiz kesme noktasını tekrar hesaplama veya numuneler için RLU/kesme noktasını tekrar hesaplama hakkında sorular varsa lütfen yerel QIAGEN Temsilcinizi arayın.

Kalibratör tekrar üretilebilirliğini belirlemek ve manuel tekrar hesaplamaların gerekli olabileceği sıklığı tahmin etmek üzere *digene* HC2 HPV DNA Testi ile yapılan 152 analiz çalışmasının yer aldığı üç klinik değerlendirmenin sonuçları birleştirilmiştir. Sonuçlar bu 152 çalışma için ortalama %CV değerinin 8.1 olduğunu göstermiştir. Test çalışması başına kalibratörün üç replikatının hepsi dikkate alındığında >%15 CV kalibratör tekrar üretilebilirliği 152 çalışmanın sadece 17'sinde görülmüş (%11,2) ve bu 17 test çalışmasının 10'u 15-25 arasında %CV vermiştir (Durum 2). %CV >15 veren 17 test çalışması için tek bir dışarıda kalan kaldırılmış ve %CV tekrar hesaplanmıştır. Durum 2 için Kullanıcı Eylemi sonrasında test çalışmalarının sadece birinde %CV >15 kalıp test sonucunu geçersiz hale getirmiştir. Kalan 151 test çalışmasının %CV değerleri 6,0 ortalama %CV verecek şekilde hesaplanmıştır.

3. Kalibratör ortalaması (LRC veya HRC) ve Negatif Kalibratör ortalaması (NC) sonuçları her prob için LRC/NC veya HRC/NC oranını hesaplamak için kullanılır. *digene* tahlil analiz yazılımının protokollerinin önceki versiyonları (V1.0.2 ve V1.0.3) kabul edilebilir aralıkları doğru olarak hesaplamaz. Bu oranlar, numune sonuçlarının yorumlanabilmesinden önce analiz kalibrasyonunu doğrulamak üzere şu kriterleri karşılamalıdır.

| CPC YÖNTEMİ | İKİLİ PROB YÖNTEMİ |
|---|---|
| Analiz Kalibrasyonu Doğrulama Kabul Edilebilir Aralıklar | Analiz Kalibrasyonu Doğrulama Kabul Edilebilir Aralıklar |
| $2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$ | $2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (LR tarafı) |
| $2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$ | $2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (HR tarafı) |
| $2,0 \leq (LRC \text{ ve } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$ | |

4. Prob setlerinin her biri için uygun $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$ veya $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ oranlarını hesaplayın. Oranlar $\geq 2,0$ ve ≤ 15 ise, sonraki adıma ilerleyin. Oranların herhangi biri $< 2,0$ veya > 15 ise **analiz o spesifik prob için geçersizdir ve tekrarlanmalıdır**. Çalışma içindeki tüm hasta numunelerini tekrarlayın. **Not:** Negatif Kalibratör ve Pozitif Kalibratörler için kabul edilebilir aralıklar sadece bir DML aleti için belirlenmiştir.

KESME NOKTASI HESAPLAMA

Yukarıda belirtilen kriterlere göre bir analiz doğrulandıktan sonra pozitif numuneleri belirlemek için Kesme Noktası Değerleri şu şekildedir:

1) Kombine Prob Kokteyli Yöntemi: $(\text{LRC replikatları} + \text{HRC replikatları})$
Replikat sayısı

2) İkili Prob Yöntemi: Düşük Risk HPV Probu Kesme Noktası = $\text{LRC}\bar{x}$
Yüksek Risk HPV Probu Kesme Noktası = $\text{HRC}\bar{x}$

| Örnek Kesme Noktası Hesaplamaları | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| şunlar için: | | Düşük Risk veya Yüksek Risk HPV Probu İkili Prob Yöntemi | Düşük Risk HPV Probu CPC Yöntemi | Yüksek Risk HPV Probu CPC Yöntemi | Kombine HPV Probu CPC Yöntemi |
| | NC RLU Değerleri | LRC veya HRC RLU Değerleri | LRC RLU Değerleri | HRC RLU Değerleri | LRC ve HRC RLU Değerleri |
| | 97 | 312 | 330 | 235* | 330 |
| | 101 | 335 | 305 | 295 | 305 |
| | 91 | 307 | 385 | 279 | 385 |
| | | | | | 295 |
| | | | | | 235* |
| | | | | | 279 |
| Ortalama RLU Değeri | 96 | 318 | 340 | 287* | 318,8* |
| %CV | 4,9 | 4,7 | 12,0 | 3,9* | 13,0 |
| $\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$ | - | 3,31 | 3,54 | 3,00 | 3,32 |

Pozitif Kalibratör için ortalama RLU değeri analiz kesme noktası değerini belirler. Bu nedenle, Pozitif Kesme Noktası değeri ($\text{LRC}\bar{x}$) = 318 şeklindedir.

* 6 replikatın hepsi için ortalama %CV 16,8'dir. Değeri 235 üzerinde olan replikat bir dışarıda kalan olarak silinmiştir. Kalan replikatlar için %CV 318,8 ortalama ile 13,0'dır. HRC için başlangıç %CV 11,5'tir.

Uygun Kesme Noktası Değeri için tüm RLU değerleri bir orana dönüştürülmelidir. Örneğin Düşük Risk HPV Probu ile test edilen tüm analizler Numune RLU/Düşük Risk Kesme Noktası Değeri olarak ifade edilmelidir. Aynı işlem Yüksek Risk HPV Probu veya CPC Probu ile test edilen numuneler için yapılmalıdır.

Notlar: Tüm numuneler için RLU/CO değerleri ve pozitif/negatif sonuçlar DML aleti *Veri Analizi Raporu* içinde bildirilmiştir.

Rapid Capture System alet uygulaması için RCS HPV yazılım protokolü geçerli Pozitif Kalibratör replikatlarının RLU değeri ortalamasına 0,8 şeklinde bir Calibration Adjustment Factor (Kalibrasyon Ayarlama Faktörü) (CAF) uygulayacak şekilde programlanmıştır. Bu CAF testin performans özelliklerinin manuel analiz işlemine eşdeğer kalması için gereklidir. Bu değişiklik sadece Rapid Capture System aleti uygulaması kullanılarak yapılan analizler için geçerlidir. Bu nedenle, doğru test sonuçları oluşturmak üzere her spesifik test yöntemi için kullanılacak doğru yazılım protokolünü seçmek çok önemlidir. Uygun Kesme Noktası Değeri için tüm RLU değerleri bir orana dönüştürülmelidir. Örneğin tüm analizler bir Numune RLU/CO değeri olarak ifade edilmelidir.

KALİTE KONTROL

digene HC2 HPV DNA Testiyle kalite kontrol örnekleri sağlanmıştır. Kalite kontrollerin Lot Numaraları ve Son Kullanma Tarihlerini nasıl bileceğiniz konusunda talimat için uygun kullanıcı el kitabına başvurun. Bu kalite kontroller her test çalışmasına dahil edilmelidir ve her kalite kontrolün RLU/CO değeri çalışmanın geçerli sayılabilmesi için aşağıdaki kabul edilebilir aralıklar dahilinde olmalıdır. **Kalite kontroller bu aralıklar dahilinde değilse, analiz geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.** Bunun sonucunda herhangi bir geçersiz çalışma için herhangi bir hasta çalışması bildirilmemelidir.

| Kalite Kontrol | HPV Tipi | Beklenen Sonuç (RLU/Kesme Noktası Değeri) Düşük Risk HPV Probu | | | |
|----------------|----------------------|--|----------|----------|-----|
| | | Minimum | Maksimum | Ortalama | %CV |
| QC1-LR | Düşük Risk (HPV 6) | 2 | 8 | 5,0 | 25 |
| QC2-HR | Yüksek Risk (HPV 16) | 0,001 | 0,999 | 0,5 | 25 |

| Kalite Kontrol | HPV Tipi | Beklenen Sonuç (RLU/Kesme Noktası Değeri) Yüksek Risk HPV Probu | | | |
|----------------|----------------------|---|----------|----------|-----|
| | | Minimum | Maksimum | Ortalama | %CV |
| QC1-LR | Düşük Risk (HPV 6) | 0,001 | 0,999 | 0,5 | 25 |
| QC2-HR | Yüksek Risk (HPV 16) | 2 | 8 | 5,0 | 25 |

| Kalite Kontrol | HPV Tipi | Beklenen Sonuç (RLU/Kesme Noktası Değeri) CPC HPV Probu | | | |
|----------------|----------------------|---|----------|----------|-----|
| | | Minimum | Maksimum | Ortalama | %CV |
| QC1-LR | Düşük Risk (HPV 6) | 2 | 8 | 5,0 | 25 |
| QC2-HR | Yüksek Risk (HPV 16) | 2 | 8 | 5,0 | 25 |

1. Kite sağlanan Kalite Kontrol materyalleri klonlanmış HPV DNA hedefleridir ve vahşi tip HPV'den türetilmemiştir. Bu, *digene* HC2 HPV DNA Testi ile sağlanan kalibratörler için kullanılan materyal tipiyle aynıdır.
2. Bu kalite kontrol materyali PreservCyt Solüsyonu veya SurePath Koruyucu Sıvısının işlenmesi için uygun kontrol görevi yapmaz.
3. Bu test kitiyle sağlanan Kalite Kontroller dahili kalite kontrol için kullanılmalıdır. Yerel ve/veya ülke düzenlemeleri veya akreditasyon organizasyonlarının kılavuz ilkeleri veya gerekliliklerine ek kalite kontroller test edilebilir.

NUMUNE SONUÇLARININ YORUMLANMASI

Not: *digene* HC2 HPV DNA Testi kesme noktası olan 1 pg/ml, analiz başına 5.000 HPV kopyası veya 100.000 HPV kopya/ml değerlerine eşdeğerdir.

1. **Sadece Düşük Risk HPV Probu ile** RLU/Kesme Noktası Değeri oranları $\geq 1,0$ olan STM Numuneleri HPV tip 6, 11, 42, 43 veya 44'ün 1 veya birkaçı için "Pozitif" kabul edilir.
2. **Sadece Yüksek Risk HPV Probu ile** RLU/Kesme Noktası Değeri oranları $\geq 1,0$ olan STM Numuneleri HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'in 1 veya birkaçı için "Pozitif" kabul edilir.
3. PreservCyt numuneleri test edilirken bir numunenin RLU/CO oranı $\geq 1,0$ ve $< 2,5$ ise QIAGEN numunelerin tekrar test edilmesini önerir. Başlangıç tekrar test sonucu pozitif ise ($\geq 1,0$ RLU/CO) numune pozitif olarak bildirilebilir ve başka tekrar test yapılması gerekmez. Ancak, ilk tekrar test sonucu negatifse ($< 1,0$), son bir sonuç oluşturmak üzere ikinci bir tekrar testin (üçüncü sonuç) tamamlanması gerekir. İkinci tekrar testin sonucu son sonuç kabul edilir ve bildirilecektir.
4. Bir numunenin RLU/Kesme Noktası oranı 1,0'a yakın ama daha düşükse ve yüksek risk HPV enfeksiyonundan şüpheleniliyorsa alternatif test yöntemleri ve/veya tekrarlanan bir numune kullanmayı düşünün.
5. Hem Düşük Risk HPV Probu hem Yüksek Risk HPV Probu için RLU/Kesme Noktası Değeri oranları $\geq 1,0$ olan STM Numuneleri her prob grubundan HPV tiplerinin 1'i veya birkaçı için "Pozitif" kabul edilir.
6. Sadece Kombine Prob Kokteyli ile RLU/Kesme Noktası Değeri oranları $\geq 1,0$ olan STM Numuneleri HPV tip 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'in 1 veya birkaçı için pozitif kabul edilir.
7. Hem Kombine Prob Kokteyli hem Düşük Risk HPV Probu ve Yüksek Risk HPV Probu için RLU/Kesme Noktası Değeri oranları $< 1,0$ olan test edilen 18 HPV tipi için "Negatif" veya "HPV DNA saptanmadı" kabul edilir. HPV DNA sekansları yoktur veya HPV DNA düzeyleri analiz saptama sınırının altındadır.

DÜŞÜK RİSK VE YÜKSEK RİSK HPV ENDİKASYONUNU DESTEKLEYEN VERİLER**Kolposkopiye Sevk Gereksinimini Belirlemek için ASC-US Pap Smear Sonuçlarıyla Hastaları Klinik Olarak Tarama**

A.B.D.'de 1996 yılında Kaiser Vakfı Araştırma Enstitüsü ve Kaiser Permanente Medical Group yönlendirmesi altında "Sınırdaki Pap Smearlı Kadınlarda Triaj için HPV DNA Testi Kullanılması" adlı bir çalışma yapılmıştır. Rutin Pap smearlar ve *digene* HC2 HPV DNA Testi için servikal numuneler birkaç Kaiser klinik tesisine giden kadınlardan elde edilmiştir. Başlangıç Pap smearlar ve Bethesda Sınıflandırmasına göre değerlendirilmiştir. Avrupa Topluluğunda servikal kanser tarama eşdeğer terminolojisi için European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer belgesine başvurun.⁴⁰ Pap smear sonuçları ASC-US (önemi belirlenmemiş atipik hücreler) olan kadınlar (15 yaş ve üstü) kolposkopi ve biyopsi için geri gelmişlerdir. Kolposkopiyle yönlendirilmiş histolojik numuneler patoloğlar tarafından incelenmiş ve bir başlangıç tanısı konmuştur. Her histolojik numune ayrıca bağımsız bir patoloğ tarafından gözden geçirilmiş ve başlangıç gözden geçirme ile bağımsız gözden geçirme arasındaki farklılıklar durumunda üçüncü bir patoloğ hakemlik yapmıştır.

HPV DNA başlangıç numunesinde yapılmış ve sadece Yüksek Risk HPV Probu kullanılmıştır. HPV DNA testi Yüksek Risk HPV Probu içinde bulunan 13 HPV tipinin 11'ine karşı problemler içeren ama HPV tip 59 ve 68'e karşı problemler içermeyen bir *digene* HC2 HPV DNA Testi prototipi ile yapılmıştır. Bu farklılığın iki analiz için ölçüde farklı performans profilleriyle sonuçlanması beklenmez.

HPV testi sonuçları ve histolojik tanımlar ASC-US Pap smear sonucu olan 885 kadından alınmıştır. Hastaların çoğunda testler hem STM hem PreservCyt Solüsyonunda toplanmış numunelerle yapılmıştır. *digene* HC2 HPV DNA Testinin STM ve PreservCyt vasatı için performans özelliklerinin benzerlikleri nedeniyle analiz performansı sadece PreservCyt Solüsyonu için sunulmuştur.

Tablo 3 ASC-US ile sevk edilen Pap smearla gelenler arasında *digene* HC2 HPV DNA Testinin HSIL veya üstü hastalığın kolposkopide bulunması açısından negatif prediktif değerinin %99 olduğunu göstermektedir.

Tablo 3
***digene* HC2 HPV DNA Testinin Fikir Birliği Histolojisi ile karşılaştırılması**
ASC-US Sevk Pap Popülasyonu
Kaiser Çalışması, PreservCyt Solüsyonu Numuneleri

| | Kolposkopi zamanında HSIL veya üstü | | | Toplam |
|-----------------|-------------------------------------|----|-----|--------|
| | | + | - | |
| Yüksek Risk HPV | + | 66 | 317 | 383 |
| | - | 5 | 497 | 502 |
| | Toplam | 71 | 814 | 885 |

Hassasiyet [TP/(TP+FN)] = %93,0 (66/71)
%95 GA = 84,3 - 97,7
Özgüllük [TN/(TN+FP)] = %61,1 (497/814)
%95 GA = 57,7 - 64,4
Hastalık Prevalansı = %8,0 (71/885)
Analiz Pozitif Prediktif Değeri = %17,2 (66/383)
Analiz Negatif Prediktif Değeri = %99,0 (497/502)

Tablo 4 Yüksek Risk HPV Probu sonuçları temelinde başlangıç ASC-US'nin HSIL veya üstü bulunması için çeşitli prevalanslar temelinde teorik pozitif ve negatif prediktif değerleri göstermektedir.

Tablo 4
Teorik Pozitif ve Negatif Prediktif Değer
High-Risk HPV Probe (Yüksek Risk HPV Probu)
ASC-US Pap Smear Sonuçları

| Teorik HSIL Prevalansı | Başlangıç ASC-US Pap Smear Sonucu | |
|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | Analiz Pozitif Prediktif Değeri | Analiz Negatif Prediktif Değeri |
| 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 |

Tablo 5 bu çalışmada bulunan çeşitli yaş grupları arasındaki değişiklikleri göstermektedir:

Tablo 5
Kaiser Çalışma Verileri
***digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi Performansı ile Fikir Birliği Histolojisinin Karşılaştırılması**
Sonuçlar (HSIL)
Yaşa Spesifik Özellikler

| | Yaş <30 | Yaş 30–39 | Yaş >39 |
|------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| n | 287 | 233 | 365 |
| Hastalık Prevalansı (%) | 12,2 | 11,2 | 2,7 |
| Hassasiyet (%) | 100,00 (35/35) | 88,46 (23/26) | 80,00 (8/10) |
| %95 Güven Aralığı | 90,0-100 | 69,9-97,6 | 44,4-97,5 |
| Özgüllük (%) | 31,4 (79/252) | 66,2 (137/207) | 79,15 (281/355) |
| %95 Güven Aralığı | 25,7-37,5 | 59,3-72,6 | 74,6-83,3 |
| Negatif Prediktif Değer (%) | 100 (79/79) | 97,86 (137/140) | 99,29 (281/283) |
| Pozitif Prediktif Değer (%) | 16,83 (35/208) | 24,73 (23/93) | 9,76 (8/82) |

LSIL veya HSIL Pap Smearlı Kadınlarda Yüksek Evre Hastalık Riskinin Belirlenmesi için Klinik Hassasiyet ve Özgüllük

Batı ve Güney A.B.D.'de birkaç büyük, yüksek servikal hastalık ve HPV prevalansı olan hastane ve tıbbi merkez kolposkopi kliniğinde (3 çalışma yeri) toplanan numunelerde *digene* HC2 HPV DNA Testi kullanılarak bir çok merkezli klinik çalışma yapılmıştır. HPV testi numunelerin toplandığı kolposkopi klinikleriyle ilişkili olmayan üç araştırma yerinde gerçekleştirilmiştir. Bu klinik çalışma için popülasyon yakın zamanlı bir Pap smear ile LSIL veya HSIL tanısı koyup takip kolposkopi için sevk edilen kadınlardan oluşmuştur. Kaydolan 702 hasta içinde 327'sinde Pap smear sonuçları ASC-US üzerinde olup yeterli bilgi bulunurken bunların 96'sında son hastalık durumu HSIL veya üstü olmuştur. Eksfoliasyon yapmış servikal hücre numuneleri *digene* HC2 DNA Collection Device ile alınıp STM içine yerleştirilmiş veya bir süpürge cihazı ile alınıp PreservCyt Solüsyonuna konmuştur. Numuneler kolposkopi zamanında toplanmıştır. Numuneler *digene* HC2 HPV DNA Testi ile test edilmiş ve sonuçlar her hasta için hastalık durumuyla karşılaştırılmıştır. Hastalık durumu histolojik değerlendirme sonuçlarını temel almıştır ama histoloji negatif olduğunda veya bir histoloji sonucu bulunmadığında hastalık durumu kolposkopik inceleme sırasında sitoloji ile belirlenmiştir (bakınız *Tablo 6*). *digene* HC2 HPV DNA Testi kolposkopi için numuneleri toplayan çalışma yerleriyle ilişkisi olmayan 3 büyük metropolitan tıbbi merkezde yapılmıştır. Sitoloji bir referans patoloji laboratuvarında yapılmış ve histoloji kolposkopi yapan kurumlarda gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları hastalık durumuyla karşılaştırılarak yüksek evre servikal neoplazi

saptamak için testin hassasiyeti, özgüllüğü ve negatif ve pozitif prediktif değeri değerlendirilmiştir. *digene* HC2 HPV DNA Testinin STM ve PreservCyt vasatı için performans özelliklerinin benzerlikleri nedeniyle analiz performansı sadece PreservCyt için sunulmuştur.

STM numuneleri ve PreservCyt Solüsyonu numuneleri için Yüksek Risk HPV Probu sonuçları arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Aşağıdaki tablo bu popülasyonda Yüksek Risk HPV Probu sonuçlarını göstermektedir:

Tablo 6
Hastanın Hastalık Durumu Algoritması

| Sitoloji Sonucu | Histoloji Sonucu | Hastalık Durumu |
|-----------------|----------------------|-----------------|
| NEG | NEG veya Yapılmamış* | NEG |
| LSIL | NEG | LSIL |
| HSIL | NEG | HSIL |
| Kanser | NEG | HSIL+ |
| NEG | LSIL | LSIL |
| LSIL | Yapılmamış* | LSIL |
| LSIL | LSIL | LSIL |
| HSIL | LSIL | LSIL |
| Kanser | LSIL | LSIL |
| NEG | HSIL | HSIL |
| LSIL | HSIL | HSIL |
| HSIL | HSIL | HSIL |
| HSIL | Yapılmamış* | HSIL |
| Kanser | HSIL | HSIL |
| NEG | Kanser | HSIL+ |
| LSIL | Kanser | HSIL+ |
| HSIL | Kanser | HSIL+ |
| Kanser | Yapılmamış* | HSIL+ |
| Kanser | Kanser | HSIL+ |

* Biyopsi ve/veya Endoservikal Küretaj (ECC) yapılmamış çünkü kolposkopide anormallik gözlenmemiş veya histoloji sonucu yok.

Tablo 7 ve 8, 96'sı yüksek evre servikal hastalıkla tanı konmuş kadınlardan olmak üzere 327 PreservCyt numunesinde belirlenmiş *digene* HC2 HPV DNA Testi performansını göstermektedir. Karşılaştırmalar anormal sevk Pap smear sonuçları olan tüm çalışma hastaları kullanılarak yapılmıştır. Karşılaştırmalar Yüksek Risk HPV Probu ile test edilen PreservCyt numuneleri için gösterilmiştir.

Tablo 7
Yüksek Risk HPV Probu Sonuçları

| Sevk Pap Smear Sonucu | Son Hastalık Durumu | | | | | | Toplam |
|---------------------------|---------------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | HSIL | | LSIL | | Negatif | | |
| | POZ | NEG | POZ | NEG | POZ | NEG | |
| Yüksek Risk HPV Sonuçları | | | | | | | |
| LSIL | 44 | 4 | 78 | 33 | 28 | 37 | 224 |
| HSIL | 45 | 3 | 29 | 14 | 5 | 7 | 103 |
| Toplam | 89 | 7 | 107 | 47 | 33 | 44 | 327 |
| | 96 | | 154 | | 77 | | |

Tablo 8 Yüksek Risk HPV Probu kullanan *digene* HC2 HPV DNA Testinin bir LSIL, HSIL veya eşdeğeri Pap smear tanısı temelinde kolposkopi için sevk edilen popülasyonda yüksek evre neoplazi bulunan kadınları tanımlamak için yaklaşık %93 genel hassasiyet gösterdiğini ortaya koymaktadır. Test ayrıca bu popülasyonda yaklaşık %93 negatif prediktif değer göstermiştir.

Tablo 8
Performans Özellikleri
Sevk Edilen Hastalar arasında *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi
Pap Smear LSIL veya Üstü ve Son Hastalık Durumu HSIL veya Üstü

| Yüksek Risk HPV Probu Sonucu | Sevk Pap LSIL veya HSIL → HSIL Hastalığı | | | Toplam |
|------------------------------|--|-----------|------------|------------|
| | | + | - | |
| + | | 89 | 140 | 229 |
| - | | 7 | 91 | 98 |
| Toplam | | 96 | 231 | 327 |

Hassasiyet $[TP/(TP+FN)] = \%92,7 (89/96)$

%95 GA = 85,6 - 97,0

Özgüllük $[TN/(TN+FP)] = \%39,4 (91/231)$

%95 GA = 33,1 - 46,0

Sevk LSIL'den son HSIL'ye Hastalık Prevalansı = %21,4

Sevk HSIL'den son HSIL'ye Hastalık Prevalansı = %46,6

Genel Pozitif Prediktif Değer = %38,9 (89/229)

Genel Negatif Prediktif Değer = %92,8 (91/98)

digene HC2 HPV DNA Testinin özgüllüğü biraz düşük görünse de neoplazi bulunmaması ve negatif HPV sonucu arasında katı bir korelasyon beklenmemektedir. HPV DNA daha yüksek evre hastalığa ilerlememiş kadınlarda bulunabilir. Hatta pozitif HPV sonuçları olan ve karşılık gelen hastalık durumu düşük evre neoplaziden daha düşük olan numunelerde HPV Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testi (sadece araştırma amaçlı kullanılan bir analiz) yapıldığında yaklaşık %75'i pozitif bulunmuştur.

Tablo 9 başlangıçta LSIL veya HSIL durumunun kolposkopide HSIL veya daha şiddetli hastalık bulunması açısından teorik Yüksek Risk HPV Probu pozitif ve negatif prediktif değerlerini göstermektedir.

Tablo 9
Teorik Pozitif ve Negatif Prediktif Değer
High-Risk HPV Probe (Yüksek Risk HPV Probu)
Başlangıç LSIL veya HSIL Pap Smear Sonuçları

| Teorik Prevalansı HSIL için | Başlangıç LSIL veya HSIL Pap Smear Sonucu | |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| | Analiz Pozitif Prediktif Değer | Analiz Negatif Prediktif Değer |
| 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 |

HIGH-RISK HPV PRİMER TARAMA ENDİKASYONUNU DESTEKLEYEN VERİLER

Hasta Yönetimi için Risk Değerlendirmesine Yardımcı Olarak Normal Pap Yayma Sonuçları olan Hastaları Tararken Klinik Performans

Amerika Birleşik Devletleri ve dış ülkelerde önde gelen tıbbi, akademik ve resmi kurumlarda yapılan sekiz bağımsız klinik çalışmanın sonuçları aşağıda tanımlanmıştır. Çalışmalar, çalışmanın yapıldığı ülkelerde kullanımda olan yerleşmiş Pap yöntemlerini kullanılmıştır. İki vaka dışında, tüm vakalarda Pap sonuçlarını yorumlamak için Bethesda Derecelendirme Sistemi kullanılmıştır. Ayrıca yüksek dereceli servikal hastalığa her çalışma için kolposkopinin yönlendirdiği biyopsi kullanımıyla tanı konmuştur. Bu çalışmalar daha yaşlı kadınlarda (genel olarak 30-35 yaş üstü) Pap smear ile karşılaştırıldığında *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinin klinik faydasını değerlendirmiştir. Bir çalışma dışında hepsi *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi kullanarak prospektif HPV testi de yapmıştır.

Çalışmalar aşağıda aksi belirtilmedikçe *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi kullanan çapraz kesit genel popülasyon tarama çalışmalarıdır. Belirtildiği gibi 8 tarama çalışmasının 2'si Amerika Birleşik Devletleri; 2'si Avrupa'da, 2'si Latin Amerika'da 1'i Afrika'da ve 1'i Asya'da yapılmıştır.

digene HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinin altı çapraz kesit çalışmasında gözlenen performansı yaşı 30 ve üzerinde olan ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN 3 veya üstü olarak tanımlanan) histolojik olarak doğrulanmış yüksek evre servikal neoplazi tanısı konmuş kadınlar için Tablo 10 ve 11'de özetlenmiştir.

Tablo 10
***digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi Performans Tahminleri**
Hassasiyet ve Özgüllük

| Popülasyon | n | Hassasiyet (%) | | | Özgüllük (%) | | |
|------------------------------|------|------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | Sadece PAP | Sadece HPV | HPV + PAP | Sadece PAP | Sadece HPV | HPV + PAP |
| Batı Avrupa 1 | 7592 | 51,6 (14/27) | 96,3 (26/27) | 100 (27/27) | 98,5 (7453/7565) | 96,2 (275/7565) | 95,1 (7193/7565) |
| | | %95 GA | 32,0-71,3 | 81,0-99,9 | 87,2-100 | 98,2- 98,8 | 95,7-96,6 |
| Latin Amerika 1 | 6115 | 58,4 (45/77) | 94,8 (73/77) | 97,4 (75/77) | 98,7 (5962/6038) | 93,9 (5669/6038) | 93,4 (5637/6038) |
| | | %95 GA | 46,68-69,6 | 87,2-98,6 | 90,9-99,7 | 98,4-99,0 | 93,3-94,5 |
| Latin Amerika 2 [†] | 6176 | 77,9 (53/68) | 89,7 (61/68) | 94,1 (64/68) | 94,1 (5745/6108) | 94,0 (5742/6108) | 89,9 (5490/6108) |
| | | %95 GA | 66,2-87,1 | 79,9-95,8 | 85,6-98,4 | 93,4-94,6 | 93,4-94,6 |
| Afrika | 2925 | 84,1 (90/107) | 89,7 (96/107) | 92,5 (99/107) | 86,4 (2436/2818) | 80,0 (2253/2818) | 76,4 (2152/2818) |
| | | %95 GA | 75,8-90,5 | 82,4-94,8 | 85,8-96,7 | 85,1-87,7 | 78,4-81,4 |
| Asya | 1936 | 97,6 (41/42) | 100 (42/42) | 100 (42/42) | 76,3 (1445/1894) | 83,0 (1572/1894) | 68,0 (1287/1894) |
| | | %95 GA | 87,4-99,9 | 91,6-100,0 | 91,6-100,0 | 74,3-78,2 | 81,2-85,0 |
| A.B.D. 1 | 1040 | 50,0 (1/2) | 100 (2/2) | 100 (2/2) | 97,6 (1013/1038) | 96,2 (999/1038) | 95,5 (991/1038) |
| | | %95 GA | 1,26-98,7 | 15,8-100,0 | 15,8-100,0 | 96,5-98,4 | 94,9-97,3 |

[†] HC2 verileri mevcut olduğunda kullanılmıştır, aksi halde HCS verileri kullanılmıştır; veriler kombine edilmiştir.

Tablo 11
***digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi Performans Tahminleri**
Pozitif ve Negatif Prediktif Değer

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

†HC2 verileri mevcut olduğunda kullanılmıştır, aksi halde HCS verileri kullanılmıştır; veriler kombine edilmiştir

Tüm çalışmalarda tek başına Pap kullanılmasına göre *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi ile hassasiyette sıklıkla çok anlamlı bir artış vardır. Hassasiyet ile olduğu gibi tüm vakalarda HPV için Negatif Prediktif Değer (NPV) tek başına Pap değerini geçmekte ve %100'e yaklaşmaktadır. Bu NPV, HPV enfeksiyonu bulunmayan sitolojik olarak normal kadınlarda yüksek evre servikal hastalık veya kanser bulunmaması olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

digene HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinin özgüllüğü tek başına Pap'tan düşük olsa da olasılık oranı analizi gözlenen özgüllük azalmasının, testi servikal hastalık bulunması veya geliştirme açısından riski olmayan veya çok düşük olan kadınları tanımlamak için kullanmanın klinik faydasını etkilemeye yetecek kadar anlamlı olmadığını göstermiştir. Yine de doktorun tüm klinik ve risk bilgisi ve mevcut hasta geçmişine göre bir hastayı kolposkopiye sevk etme kararı verebilmesi önemlidir. Önemli değişkenler arasında HPV enfeksiyonu ve/veya anormal Pap smear öyküsü, ilk cinsel ilişki yaşı, cinsel partner sayısı ve eşzamanlı cinsel yoldan bulaşan hastalıklar vardır.^{27,28}

Yüksek evre hastalık prevalansı performansın belirlendiği çalışmalar arasında anlamlı ölçüde farklılık göstermese de bir popülasyondaki HPV enfeksiyonu prevalansı performansı etkileyebilir ve tipik olarak hasta popülasyonuna göre değişir. Ayrıca, HPV enfeksiyonu prevalansının yaşla dramatik olarak azaldığı gösterilmiştir.^{28, 30-37, 41} Düşük prevalansın bulunduğu popülasyonlar veya enfeksiyon riskinin çok düşük olduğu bireyler test edilirken pozitif prediktif değerler azalır.

İki çalışmanın sonuçları kullanılarak longitudinal analizler yapılmıştır; bunlardan biri Amerika Birleşik Devletleri'nde Oregon'da Portland'da Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute (NCI)) ve diğeri Fransa'da Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims kuruluşunda yapılmıştır. Bu longitudinal analizler Pap negatif/HPV negatif hastaların HPV durumu bilinmeyen, geleneksel olarak tanımlanmış düşük riskli kadınlar ve Pap negatif/HPV pozitif hastalara göre servikal hastalık bulunması riskinin daha düşük olduğunu göstermek üzere yapılmıştır.

Bu longitudinal analizlerinin sonuçları aşağıda Tablo 12 ve 13'te sunulmuştur.

Tablo 12
Sonuçların Özeti: NCI ve Fransa Çalışmaları
Yüksek Evre Hastalık Relatif Riski

| Çalışma Grubu | Yaş | Düşük Risk Sınıflandırması | n | CIN 3+ Vakalar | Oran (100 Hasta Yılı için) | Relatif Risk (%95 GA) |
|---------------|------------|----------------------------|--------|----------------|----------------------------|-------------------------|
| NCI | 30 ve üstü | Pap Normal, HPV Negatif | 12.054 | 28 | 0,043 | 0,897 (0,596, 1,348) |
| | | Daha sonra Normal Pap'lar* | 9.429 | 19 | 0,048 | 1,000 |
| | Hepsi | Pap Normal, HPV Negatif | 17.594 | 48 | 0,056 | 0,678 (0,514, 0,894) |
| | | Daha sonra Normal Pap'lar* | 13.392 | 44 | 0,082 | 1,000 |
| Fransa | 30 ve üstü | Pap Normal, HPV Negatif | 1.690 | 3 | 0,084 | 0,849 (0,307, 2,35) |
| | | Daha sonra Normal Pap'lar* | 2.026 | 4 | 0,099 | 1,000 |
| | Hepsi | Pap Normal, HPV Negatif | 2.180 | 3 | 0,066 | 0,491 (0,221, 1,09) |
| | | Daha sonra Normal Pap'lar* | 2.650 | 7 | 0,136 | 1,000 |

*Yaklaşık 2 yılda üç normal yıllık Pap

Tablo 13
Sonuçların Özeti: NCI ve Fransa Çalışmaları
Hastalık Oranları Başlangıçta HPV Durumuna Göre Katmanlandırılmış

| Çalışma Grubu | Yaş | Başlangıç Durumu | n | CIN 3+ Vakalar | Oran (100 Hasta Yılı için) | Relatif Risk (%95 GA) |
|---------------|------------|-------------------------|--------|----------------|----------------------------|------------------------|
| NCI | 30 ve üstü | Pap Normal, HPV pozitif | 1.078 | 24 | 0,451 | 10,50 (6,13, 18,0) |
| | | Pap Normal, HPV negatif | 12.054 | 28 | 0,043 | 1,00 |
| | Hepsi | Pap Normal, HPV pozitif | 2.561 | 63 | 0,096 | 10,64 (7,33 – 15,5) |
| | | Pap Normal, HPV negatif | 17.594 | 48 | 0,056 | 1,00 |
| Fransa | 30 ve üstü | Pap Normal, HPV pozitif | 419 | 14 | 2,346 | 27,3 (8,41, 88,3) |
| | | Pap Normal, HPV negatif | 1696 | 3 | 0,084 | 1,00 |
| | Hepsi | Pap Normal, HPV pozitif | 619 | 22 | 2,520 | 37,0 (11,8, 116) |
| | | Pap Normal, HPV negatif | 2180 | 3 | 0,066 | 1,00 |

HPV testi sonucunun klinik faydası HPV negatif kadınlara göre HPV pozitif kadınlarda artmış servikal hastalık riskiyle ayrıca gösterilmiştir.

ANALİTİK HASSASİYET

Klinik olmayan bir klonlanmış HPV plazmid DNA paneli 18 HPV tipinin her birinin *digene* HC2 HPV DNA Test Testiyle saptanabilip saptanamayacağını ve analizin HPV tiplerinin her biri için analitik hassasiyetini belirlemek için yapılmıştır. 18 HPV DNA tipinin (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) her HPV hedef konsantrasyonu (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml ve 0,2 pg/ml) Düşük Risk HPV Probu veya Yüksek Risk HPV Probu ile uygun olduğu şekilde üçlü olarak çalışılmıştır. Her HPV tipinin her konsantrasyonu için RLU'daki ortalama sinyal hesaplanmış ve analizin uygun tarafı için Pozitif Kalibratör ile karşılaştırılmıştır.

Her HPV tipinin STM içinde saptanabilir limiti Tablo 14'te gösterilmiştir. Saptanabilir limitler test edilen HPV tipine bağlı olarak 0,62 pg/ml ile 1,39 pg/ml arasında değişmiştir. Tüm HPV tipleri 1 ml STM numunesi başına 1,09 pg HPV DNA tahmini seviyesinde saptanabilmiştir. 18 HPV DNA tipinin ortalama saptanabilir limiti 0,05 standart sapmayla 1,09 pg/ml olmuştur.

Tablo 14
***digene* HC2 HPV DNA Testinin**
STM'de Her HPV DNA Tipi için Saptanabilir Hassasiyet Limitlerinin Özeti

| HPV DNA Tip | Saptanabilir HPV DNA Konsantrasyonu (pg/ml) | Standart Sapma | %95 Güven Aralığı |
|------------------------------|---|----------------|-------------------|
| 6 | 1,33 | 0,03 | 1,22-1,46 |
| 11 | 1,13 | 0,05 | 1,00-1,29 |
| 16 | 1,09 | 0,06 | 0,94-1,29 |
| 18 | 1,05 | 0,05 | 0,88-1,29 |
| 31 | 1,01 | 0,05 | 0,91-1,15 |
| 33 | 1,35 | 0,02 | 1,26-1,45 |
| 35 | 1,11 | 0,05 | 0,95-1,31 |
| 39 | 1,39 | 0,09 | 1,16-1,71 |
| 42 | 1,20 | 0,05 | 1,02-1,44 |
| 43 | 0,85 | 0,03 | 0,86-1,07 |
| 44 | 1,17 | 0,04 | 1,02-1,36 |
| 45 | 1,14 | 0,04 | 0,99-1,35 |
| 51 | 0,78 | 0,10 | 0,70-0,88 |
| 52 | 1,37 | 0,06 | 1,21-1,58 |
| 56 | 0,62 | 0,04 | 0,58-0,67 |
| 58 | 0,82 | 0,04 | 0,73-0,94 |
| 59 | 1,10 | 0,06 | 1,00-1,21 |
| 68 | 1,19 | 0,04 | 1,03-1,39 |
| Ortalama (tüm tipler) | 1,09 | 0,05 | 0,97-1,27 |

KOMBİNE PROB KOKTEYLİ (CPC) PERFORMANSI

Yukarıda tanımlanan klinik olmayan HPV plazmid DNA panelinin aynısı bu kullanma talimatında tanımlandığı gibi Kombine Prob Kokteyli (CPC) protokolü sonrasında *digene* HC2 HPV DNA Testi içindeki 18 HPV tipinin her birinin analitik hassasiyetini belirlemek için yapılmıştır. CPC protokolünün analitik hassasiyeti 0,58 pg/ml ile 1,39 pg/ml arasında değişmiş ve tüm HPV tipleri 1 ml numune başına 0,95 pg/ml HPV DNA hedefi tahmini seviyesiyle saptanabilir olmuştur. 18 HPV tipi için ortalama saptanabilir limiti 0,07 standart sapmayla 0,95 pg/ml olmuştur. Bu hassasiyet *digene* HC2 HPV DNA Testinin İkili Prob yöntemi için bulunan analitik hassasiyetine eşdeğerdir.

STM VE PRESERVCYT SOLÜSYON NUMUNELERİNİN EŞDEĞER OLMASI

STM ve PreservCyt Solüsyonu numunelerinin eşdeğer olma durumu STM içine ve PreservCyt Solüsyonunda negatif bir hücre havuzuna eklenen entegre HPV 18 genomları içeren yaklaşık 10^6 pozitif HeLa hücresinden HPV 18 DNA'sının eşit şekilde geri alınmasıyla incelenmiştir. Her numune tipi bu kullanma talimatında tanımlanan ilgili işleme/denatürasyon işlemlerine göre işlenmiş ve *digene* HC2 HPV DNA Testiyle Yüksek Risk HPV Probu kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar insan karsinom hücrelerinden HPV 18 DNA'sının geri alınmasının iki ortam için eşdeğer olduğunu ve PreservCyt Solüsyonu hazırlama işleminin *digene* HC2 HPV DNA Testinin analitik hassasiyetini etkilemediğini göstermiştir.

BİR KLİNİK POPÜLASYONDA SUREPATH NUMUNE SONUÇLARININ STM NUMUNELERİYLE KORELASYONU

Amerika Birleşik Devletleri'nde 6 toplama merkezi ve 3 test etme yeri kullanılarak iki fazlı bir klinik değerlendirme yapılmıştır. Bir cinsel hastalık kliniği, obstetri/jinekoloji kliniği, kolposkopi kliniği, hastane veya aile planlama merkezine başvuran hastalar önceden belirlenmiş çalışmaya alma ve almama kriterlerine göre kaydolmaya uygun olmuştur. SurePath numuneleriyle kullanılmak üzere uygun bir *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA analizi kesme noktasını belirlemesi amaçlanmış fizibilite fazında yaklaşık 400 hasta kaydolmuştur. Seçilen analiz kesme noktası değerini doğrulamak için yaklaşık 1500 hastanın kaydolduğu klinik doğrulama fazı fizibilitenin bir ara analizi SurePath numuneleri kullanılarak 1,0 RLU/CO şeklindeki bir analiz kesme noktası değerinin STM numunesi sonuçlarıyla kabul edilebilir bir anlaşma gösterdiğini ortaya koyduktan sonra başlamıştır.

Her iki değerlendirme fazında her izin veren kadın katılımcıdan eşleşmiş SurePath ve STM servikal numuneler alınmıştır. SurePath numunesi sonra lam hazırlanması için bir sitoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Sitolojik hazırlama sonrasında, kalan SurePath Numunesi ve karşılık gelen STM numunesi 1,0 RLU/CO şeklinde bir analiz kesme noktası değeri kullanılarak *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testiyle test edilmiştir.

Tablo 15 toplam kayıt olmuş popülasyondan elde edilmiş ve veri analizi için uygun son sonuçlarla gözlenen eşleşmiş STM numunesiyle SurePath sonuç korelasyonunu vermektedir.

Tablo 15
STM ile SurePath Sonuç Anlaşması
(tüm yaşlar ve sitolojik sınıflandırma)
(n = 1490)

| Pozitif Anlaşma % %95 GA (n/N) | | Negatif Anlaşma % %95 GA (n/N) | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| Hepsi Pozitif | Yüksek Pozitif Alt Set (RLU/CO \geq 2,5) | Hepsi Negatif | Düşük Negatif Alt Set RLU/CO (<0,80) |
| 93,5 90,7, 95,6 (401/429) | 96,4 94,1, 98,0 (378/392) | 95,3 93,8, 96,5 (1011/1061) | 96,0 94,6, 97,1 (1002/1044) |

Bu sonuçlar SurePath numuneleri kullanılarak relatif analiz hassasiyeti ve özgüllüğünün hem pozitif hem negatif anlaşma için %95 güven aralığının alt sınırıyla görüldüğü şekilde STM numune tipiyle elde edilenlerle yüksek korelasyon göstereceğini öngörmektedir.

TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK

HPV pozitif ve HPV negatif klinik numuneler ve HPV DNA hedefleri numunesi kullanılarak *digene* HC2 HPV DNA Testinin günler arasında, çalışma yerleri arasında ve genel tekrar üretilebilirliğini belirlemek üzere bir çok merkezli tekrar üretilebilirlik çalışması yapılmıştır.

Harici laboratuvarlar testleri eşdeğer tekrar üretilebilirlik paneliyle 3 farklı günde aynı *digene* HC2 HPV DNA Test kiti lotunu kullanarak yapmıştır. Tekrar üretilebilirlik paneli şu numuneleri içermiştir: 12 denatüre klinik STM numunesi havuzu; 3 denatüre olmamış klinik PreservCyt Solüsyonu numunesi havuzu; Negatif Kalibratör; ve Pozitif Düşük Risk ve Yüksek Risk Kalibratörler, 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml ve 10 pg/ml konsantrasyonlarında. Tüm panel üyeleri her gün hem Yüksek Risk HPV Probu hem CPC yöntemi kullanılarak üçlü olarak test edilmiştir. Sonuçlar Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16
***digene* HC2 HPV DNA Testi**
Çok Merkezli Tekrar Üretilebilirlik Genel İstatistiksel Özeti

| İstatistiksel Ölçüt | YÜKSEK RİSK HPV PROBU | Kombine Prob Kokteyli (CPC) | Kombine Sonuçlar Yüksek Risk HPV Probu ve CPC^a |
|--|------------------------------|------------------------------------|--|
| Gözlenen pozitif sonuçlu beklenen pozitiflerin oranı | %100 (99,0-100,0) | %99,8 (98,92-100,0) | %99,9 (99,38-100,0) |
| Gözlenen negatif sonuçlu beklenen negatiflerin oranı | %99,0 (97,49-99,73) | %98,9 (96,79-99,77) | %99,0 (97,88-99,58) |
| Anlaşma | %99,5 (98,70-99,86) | %99,5 (98,70-99,86) | %99,5 (99,0-99,78) |
| Kappa | 0,990 | 0,989 | 0,990 |

^aParantezler içindeki rakamlar %95 güven aralıklarına işaret etmektedir. Genel veriler tüm çalışma yerlerinde tüm çalışmaların bir kombinasyonudur.

Bu durum STM içinde toplanan klinik numunelerle *digene* HC2 HPV DNA Testinin tekrar üretilebilirliğinin çok iyi olduğuna işaret etmektedir.

ÇAPRAZ REAKTİVİTE

ÇAPRAZ REAKTİVİTE PANELİ

Dişi anogenital kanalında sıklıkla bulunan çeşitli bakteriler, virüsler ve plazmidler ve ayrıca klonların mevcut olduğu kütaneotropik HPV tiplerinin bir koleksiyonu *digene* HC2 HPV DNA Testinde kullanılan HPV problemleriyle çapraz reaktivite oluşup oluşmayacağını belirlemek üzere incelenmiştir. Tüm mikroorganizmalar 1×10^5 ve 1×10^7 organizma/ml konsantrasyonlarında incelenmiştir. Virüsler ve plazmidlerin saflaştırılmış DNA'ları 4 ng/ml konsantrasyonunda incelenmiştir.

Aşağıda test edilen bakterilerin bir listesi vardır. Tüm bakteriler *digene* HC2 HPV DNA Testiyle negatif sonuç vermiştir.

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

Hem plazmidleri büyütme için kullanılan *E. coli* suşu (HB101) hem de bir klinik *E. coli* izolatu incelenmiştir.

Aşağıda test edilen viral veya plazmid DNA veya insan serumlarının bir listesi vardır:

| | |
|---|-----------------------------|
| Adenovirüs 2 | İnsan Papillomavirüs tip 1 |
| Sitomegalovirüs | İnsan Papillomavirüs tip 2 |
| Epstein-Barr Virüsü | İnsan Papillomavirüs tip 3 |
| Hepatit B yüzey antijeni pozitif serum | İnsan Papillomavirüs tip 4 |
| Herpes Simplex I | İnsan Papillomavirüs tip 5 |
| Herpes Simplex II | İnsan Papillomavirüs tip 8 |
| İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV, RT DNA) | İnsan Papillomavirüs tip 13 |
| Simian Virüs tip 40 (SV40) | İnsan Papillomavirüs tip 30 |
| | pBR322 |

digene HC2 HPV DNA Testinde çapraz reaktivite gösteren virüsler veya plazmidler sadece HPV 13 ve plazmid pBR322 olmuştur. HPV 13 DNA sadece Düşük Risk HPV Probu ile reaksiyon göstermiştir. HPV 13 belirli etnik grupların dudak lezyonlarında sıklıkla bulunur ama anogenital kanalda bulunmamıştır.²⁹ Bu nedenle HPV 13 ve *digene* HC2 HPV DNA Test Düşük Risk HPV Probu arasında gözlenen çapraz reaktivitenin anogenital numuneler için klinik olarak kafa karıştırıcı bir sonuca yol açması beklenmez. pBR322 ve *digene* HC2 HPV DNA Testi Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Problemleri arasındaki çapraz reaktivite beklenmedik değildir çünkü HPV inserti izole edilirken tüm vektör pBR322 DNA'sının çıkarılması zordur. pBR322 homolog sekanslarının varlığı insan genital numunelerinde bildirilmiştir ve yüksek bakteriyel plazmid seviyeleri varlığında yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir. Ancak *digene* HC2 HPV DNA Testi ile Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Problemleriyle pozitif sonuç veren 298 klinik numune bir pBR322 probu ile test edildiğinde pozitif sonuçların hiçbirinin pBR322'ye bağlı olmadığını göstermiştir. Böylece bir

digene HC2 HPV DNA Testi yalancı pozitif sonucunun klinik numunelerde homolog pBR322 sekanslarına bağlı olması olasılığı düşük görülmektedir.

ÇAPRAZ HİBRİDİZASYON

18 HPV tipinin her biri 4 ng/ml HPV DNA konsantrasyonlarında Düşük Risk ve Yüksek Risk HPV Problemleriyle test edilmiştir. HPV hedeflerinin hepsinin uygun prob grubuyla pozitif olması beklenirken hiçbirinin karşı prob grubuyla pozitif olması beklenmemiştir. Bu çalışma HPV tip 6 ve 42 (düşük risk HPV tipleri) ve yüksek risk prob grubu (Yüksek Risk HPV Probu) arasında az miktarda çapraz hibridizasyon olduğunu göstermiştir. Yüksek seviyelerde (4 ng/ml veya üstü) HPV 6 veya HPV 42 DNA'sı bulunan numuneler her iki prob grubu ile pozitif olabilir. Bunun klinik önemi HPV 6 veya HPV 42 DNA'sının 4 ng/ml veya üzerinde bulunduğu hastaların kolposkopiye sevk edilebileceğidir.

Ayrıca Yüksek Risk HPV Probenun HPV tipleri 40, 53 ve 66 ile çapraz reaksiyon gösterdiği gösterilmiştir. Bu tipler nadirdir ve bu tiplerle enfeksiyon ile yüksek evre hastalık gelişmesi arasındaki tam korelasyonu belirlemek için bulgular yeterli değildir³⁸. Bu HPV DNA tiplerinin yüksek seviyelerini içeren numuneleri olan hastalar yanlışlıkla kolposkopiye sevk edilebilir. Literatürde ayrıca bu testte kullanılan benzer kompleks problemlerin HPV tip 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 veya MM9 ile çapraz hibridizasyon nedeniyle çapraz pozitif sonuçlar verebileceği bildirilmiştir.³⁹ Bu HPV tiplerinin birkaçı nadir veya yüksek evre hastalıkla sık görülmeyen nadir veya yeni tipler olsa da bu HPV DNA tiplerinin yüksek seviyelerini içeren numuneleri bulunan hastalar yanlışlıkla kolposkopiye sevk edilebilir.

KAN VE DİĞER MADDELERİN STM NUMUNELERİNE ETKİSİ

Kan ve diğer olası enterferans yapan tanımlanmış veya tanımlanmamış maddelerin etkisi *digene* HC2 HPV DNA Testiyle değerlendirilmiştir. Tam kan, vajinal yıkama sıvısı, anti-fungal krem ve kontraseptif jöle (servikal numunelerde sıklıkla bulunabilen ajanlar) STM negatif ve pozitif numunelere (klinik numune havuzları ve klinik olmayan numuneler) servikal numunelerde bulunabilecek konsantrasyonlarda eklenmiştir. Bu dört ajanın herhangi biriyle herhangi bir konsantrasyonda yalancı pozitif sonuçlar gözlenmemiştir. Ancak HPV DNA seviyeleri analiz için pozitif kesme noktasına (1 pg/ml) yakın olan klinik numunelerle yüksek seviyelerde anti-fungal krem veya kontraseptif jöle mevcutsa yalancı negatif bir sonuç bildirilebilir. Ancak yine de bir klinik numunenin tamamen bu maddelerden herhangi birinden oluşma olasılığı çok düşüktür çünkü Pap smear ve HPV testi için numune almadan önce serviks rutin olarak temizlenir.

KAN VE DİĞER MADDELERİN PRESERVCYT SOLÜSYONU NUMUNELERİNE ETKİSİ

PreservCyt numunelerinde bulunabilecek kan ve diğer olası enterferans yapan tanımlanmış veya tanımlanmamış maddelerin etkisi *digene* HC2 HPV DNA Testiyle değerlendirilmiştir. Tam kan, vajinal yıkama sıvısı, anti-fungal krem ve kontraseptif jöle (servikal numunelerde sıklıkla bulunabilen ajanlar) PreservCyt negatif ve pozitif klinik numune havuzları servikal numunelerde bulunabilecek konsantrasyonlarda eklenmiştir. Bu 4 ajanın herhangi biriyle herhangi bir konsantrasyonda yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçlar gözlenmemiştir. Ayrıca bazı klinik numunelerde bulunan maddeler *digene* HC2 HPV DNA Testi tarafından HPV DNA saptanmasını inhibe etmez.

STM İÇİNDE TOPLANAN KLİNİK NUMUNELERDE *digene* HC2 HPV DNA TESTİNİN TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ

digene HC2 HPV DNA Testinin STM içinde toplanan klinik numunelerle tekrar üretilebilirliği STM içinde toplanan önceden denatüre edilmiş ve test edilmiş servikal fırça numunelerini kombine ederek hazırlanmış 20 klinik havuzda (10 pozitif ve 10 negatif) kullanılarak bir çalışmada belirlenmiştir. Numuneler numune başına toplam 20 replikat olacak şekilde 5 günün her birinde 4 replikat olarak çalışılmıştır. Testler Kombine Prob Kokteyli yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Ortalamalar, standart sapma ve ortalama etrafında %95 güven aralıkları (GA'lar) her numune için gün içinde ve 5 gün üzerinden hesaplanmıştır ve Tablo 17'de gösterilmektedir.

Tablo 17
Ortalama RLU/CO, Güven Aralıkları ve Yüzde Pozitif ile
(Ortalama RLU/CO'ya göre Azalan Sıra)

| No. | Numune KİMLİĞİ | Ortalama RLU/CO | CI | % Pozitif |
|-----|----------------|-----------------|-----------|-------------|
| 1 | 10 | 3,18 | 3,02-3,35 | 100 (20/20) |
| 2 | 20 | 1,43 | 1,36-1,50 | 100 (20/20) |
| 3 | 11 | 1,25 | 1,20-1,28 | 100 (20/20) |
| 4 | 12 | 1,21 | 1,15-1,27 | 100 (20/20) |
| 5 | 15 | 1,20 | 1,14-1,25 | 100 (20/20) |
| 6 | 13 | 1,07 | 1,01-1,11 | 80 (16/20) |
| 7 | 16 | 1,06 | 1,01-1,09 | 75 (15/20) |
| 8 | 17 | 1,04 | 1,00-1,06 | 80 (16/20) |
| 9 | 14 | 0,98 | 0,92-1,02 | 45 (9/20) |
| 10 | 18 | 0,92 | 0,87-0,96 | 20 (4/20) |
| 11 | 19 | 0,72 | 0,68-0,75 | 0 (0/20) |
| 12 | 7 | 0,40 | 0,33-0,46 | 0 (0/20) |
| 13 | 4 | 0,38 | 0,35-0,39 | 0 (0/20) |
| 14 | 9 | 0,37 | 0,32-0,41 | 0 (0/20) |
| 15 | 1 | 0,35 | 0,32-0,36 | 0 (0/20) |
| 16 | 2 | 0,35 | 0,31-0,37 | 0 (0/20) |
| 17 | 8 | 0,32 | 0,29-0,34 | 0 (0/20) |
| 18 | 3 | 0,30 | 0,27-0,31 | 0 (0/20) |
| 19 | 6 | 0,27 | 0,24-0,30 | 0 (0/20) |
| 20 | 5 | 0,26 | 0,23-0,28 | 0 (0/20) |

Ortalama RLU/CO kesme noktasının %20 veya daha fazla üzerinde olan 5 numune için (No.1-5), 100 replikatın 100'ü (%100,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri analiz kesme noktasının %20 üzerinde veya altında olan 5 numune için (No. 6-10) replikatın 100'de 60'ı (%60) pozitif bulunmuştur ve 100'de 40'ı (%40) negatiftir. Ortalama RLU/CO analiz kesme noktasının %20'sinden fazla altında olan 10 numune için (200 replikatın 200'ü (%100) negatif bulunmuştur.

Yani, ortalama RLU/CO değeri kesme noktasının %20 veya üzerinde olan numuneler %100 pozitif bulunmuşken ortalama RLU/CO değeri kesme noktasının %20 veya daha fazla altında olan numuneler %100 negatif bulunmuştur ve kesme noktasından %20 veya daha fazla uzak olan numunelerin tutarlı sonuçlar vermesinin beklenebileceğine işaret eder. Kesme noktasına yakın olan numuneler yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler STM numunelerinin *digene* HC2 HPV DNA Testiyle tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

PRESERVCYT SOLÜSYONU İÇİNDE TOPLANAN KLİNİK NUMUNELERDE *digene* HC2 HPV DNA TESTİNİN TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ

digene HC2 HPV DNA Testinin PreservCyt Solüsyonunda toplanan klinik numunelerle tekrar üretilebilirliği çeşitli HPV DNA konsantrasyonlarının bulunduğu 24 özel hazırlanmış numuneyle bir çalışmada belirlenmiştir. Numuneler HPV 16 plazmidi içeren bakteriler ile veya olmadan PreservCyt Solüsyonu ve akyuvarlardan oluşmuştur.

Numuneler numune başına toplam 20 replikat olacak şekilde 5 günün her birinde 4 replikat olarak test edilmiştir. Çalışmanın 5 gününün her birinde her numunedan 8 ml'lik bir bölüntü *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına göre sadece Yüksek Risk HPV Probu kullanılarak işlenmiş ve test edilmiştir. Ortalamalar, standart sapmalar ve %95 güven aralıkları (GA'lar) her numune için her gün içinde ve tüm 5 gün ve replikatlar için hesaplanmıştır. Ortalama RLU/CO, ortalama etrafındaki güven aralığı ve pozitif replikatların yüzdesi Tablo 18'de her numune için ortalama RLU/CO temelinde azalan sırayla gösterilmiştir.

Tablo 18
Ortalama RLU/CO, Güven Aralıkları ve Yüzde Pozitif ile
(Ortalama RLU/CO'ya göre Azalan Sıra)

| No. | Numune # | Ortalama RLU/CO | CI | % Pozitif |
|-----|----------|-----------------|-----------|-------------|
| 1 | 21 | 3,51 | 3,19-3,83 | 100 (20/20) |
| 2 | 12 | 1,58 | 1,48-1,69 | 100 (20/20) |
| 3 | 13 | 1,42 | 1,32-1,52 | 100 (20/20) |
| 4 | 17 | 1,38 | 1,23-1,53 | 100 (20/20) |
| 5 | 18 | 1,36 | 1,23-1,48 | 90 (18/20) |
| 6 | 15 | 1,32 | 1,16-1,49 | 95 (19/20) |
| 7 | 23 | 1,17 | 1,06-1,27 | 85 (17/20) |
| 8 | 16 | 1,14 | 1,07-1,20 | 75 (15/20) |
| 9 | 20 | 1,10 | 0,96-1,21 | 75 (15/20) |
| 10 | 19 | 1,06 | 0,95-1,17 | 85 (17/20) |
| 11 | 22 | 1,05 | 0,99-1,10 | 45 (9/19) |
| 12 | 11 | 1,04 | 0,96-1,11 | 70 (14/20) |
| 13 | 14 | 0,94 | 0,86-1,01 | 65 (13/20) |
| 14 | 24 | 0,77 | 0,73-0,81 | 25 (5/20) |
| 15 | 3 | 0,28 | 0,25-0,30 | 0 (0/20) |
| 16 | 1 | 0,27 | 0,24-0,30 | 0 (0/20) |
| 17 | 7 | 0,27 | 0,25-0,30 | 0 (0/20) |
| 18 | 2 | 0,27 | 0,25-0,28 | 0 (0/20) |
| 19 | 5 | 0,26 | 0,24-0,28 | 0 (0/20) |
| 20 | 4 | 0,24 | 0,22-0,25 | 0 (0/20) |
| 21 | 9 | 0,23 | 0,21-0,25 | 0 (0/20) |
| 22 | 8 | 0,22 | 0,18-0,27 | 0 (0/20) |
| 23 | 10 | 0,22 | 0,20-0,25 | 0 (0/20) |
| 24 | 6 | 0,19 | 0,17-0,21 | 0 (0/20) |

Ortalama RLU/CO kesme noktasının %20 veya daha fazla üzerinde olan 6 numune için (No.1-6) 120 replikatın 114'ü (%95,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/ analiz kesme noktasının %20 üzerinde veya altında olan 7 numune (No 7-13) için replikatların 139'da 88'i (%63,3) pozitif ve 139'de 51'i (%36,7) negatif bulunmuştur. Kesme noktasının %10 üzerinde veya altında olan 4 numune için (No 10-13) 79 replikatların 41'i (%51,9) pozitif ve 38'i (%48,1) negatif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO analiz kesme noktasının %20'sinden fazla altında olan 11 numune için (220 replikatın 220'ü (%100) negatif bulunmuştur.

Yani, ortalama RLU/CO değeri kesme noktasının %20 veya üzerinde olan numuneler %95'ten fazla pozitif bulunmuşken ortalama RLU/CO değeri kesme noktasının %20 veya daha fazla altında olan numuneler %100 negatif bulunmuştur ve kesme noktasından %20 veya daha fazla uzak olan numunelerin tutarlı sonuçlar vermesinin beklenebileceğine işaret eder. Kesme noktasına yakın olan numuneler yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler PreservCyt Solüsyon numunelerinin *digene* HC2 HPV DNA Testiyle tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

SUREPATH KORUYUCU SIVISINDA TOPLANAN NUMUNELER İLE *digene* HC2 YÜKSEK RİSK HPV DNA TESTİNİN TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ

Analiz kesme noktası olarak 1,0 RLU/CO kullanıldığında bilinen pozitif/negatif HPV durumlu aynı numune setiyle farklı günlerde ve farklı çalışmalarda benzer bir diagnostik sonuç elde etmek açısından 3 farklı laboratuvarın kapasitesini belirlemek üzere tekrar üretilebilirlik değerlendirmeleri yapılmıştır. Tekrar üretilebilirlik numune paneli 5 HPV pozitif numune, 2 HPV DNA konsantrasyonları analiz kesme noktasına yakın numune ve 5 negatif HPV numunesinden oluşmuştur.

Panel üyeleri istenen hedef RLU/CO değerlerini elde etmek üzere bilinen negatif ve pozitif HPV durumu olan benzersiz SurePath hasta numunelerini kombine ederek hazırlanmıştır. Her panel üyesi üç katılımcı laboratuvarın her birinde beş günlük bir dönem boyunca günde iki kez olmak üzere ikili olarak test edilmiştir.

Tablo 19
Tekrar Üretilirlik Çalışması SurePath Numuneleri
Panel Üyesi Başına Kalitatif Sonuçlar

| Panel Üyesi | Ortalama RLU/CO | Beklenen Sonuç | HPV Pozitif n (%) | HPV Negatif n (%) |
|-------------|-----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 0,20 | negatif | 0 (0) | 60 (100) |
| 2 | 0,21 | negatif | 0 (0) | 60 (100) |
| 3 | 0,22 | negatif | 0 (0) | 60 (100) |
| 4 | 0,28 | negatif | 2 (3,3) | 58 (96,7) |
| 5 | 0,36 | negatif | 2 (3,3) | 58 (96,7) |
| 6 | 0,83 | negatif | 13 (21,7) | 47 (78,3) |
| 7 | 1,17 | pozitif | 26 (43,3) | 34 (56,7) |
| 8 | 19,47 | pozitif | 60 (100) | 0 (0) |
| 9 | 25,65 | pozitif | 60 (100) | 0 (0) |
| 10 | 81,52 | pozitif | 60 (100) | 0 (0) |
| 11 | 154,18 | pozitif | 60 (100) | 0 (0) |
| 12 | 765,29 | pozitif | 60 (100) | 0 (0) |

ANALİZ İŞLEME İÇİN RAPID CAPTURE SYSTEM KULLANILIRKEN SUREPATH SONUCU TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİĞİ

SurePath numune sonuçlarının analiz işleme için Rapid Capture System kullanılırken tekrar üretilebilirliği manuel tahlil işleme ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Aynı işlenmiş numunenin ayrı bölüntülerinde iki karşılaştırma testi yapılmıştır.

Tablo 20
Numune İçi SurePath Sonuçlarının RCS ile Anlaşması
(RCS ve manuel analiz)

| Pozitif Anlaşma % %95 GA (n/N) | | Negatif Anlaşma % %95 GA (n/N) | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Hepsi Pozitif | Yüksek Pozitif Alt Set (RLU/CO ≥ 2,5) | Hepsi Negatif | Düşük Negatif Alt Set (RLU/CO <0,80) |
| 99,0 417/421 97,6, 99,7 | 100 375/375 99,0, 100 | 97,7 1057/1079 96,9, 98,7 | 98,7 1050/1064 97,8, 99,28 |

İŞLEMİN SINIRLAMALARI

In Vitro Diagnostik Kullanım için

Yüksek hacim örnek çıktılı test için o sistemin kullanımına spesifik ek İşlem Sınırlamaları için *Rapid Capture System Kullanıcı El Kitabı (Rapid Capture System User Manual)* belgesine bakınız.

- İnsan papillomavirüs tipleri 6, 11,16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 için *digene* HC2 HPV DNA Testinin cinsel istismar şüphesinin değerlendirilmesinde kullanılması önerilmez.
- Bir popülasyonda HPV enfeksiyonu prevalansı performansı etkileyebilir. Düşük prevalanslı popülasyonlar veya enfeksiyon riski olmayan bireyler test edilirken pozitif prediktif değerler azalır.
- Negatif bir sonuç HPV enfeksiyonu olasılığını ortadan kaldırmaz çünkü çok düşük enfeksiyon seviyeleri veya örnekleme hatası yalancı negatif bir sonuca neden olabilir.
- *digene* HC2 HPV DNA Testi 2 grup HPV tipi arasında ayırım yapar: HPV 6/11/42/43/44 ve 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Bu gruplar içinde viral tipler arasında ayırım yapmaz.
- *digene* HC2 HPV DNA Testi sadece *digene* HC2 DNA Collection Device veya STM içinde toplanan biyopsiler veya süpürge tipi toplama cihazı veya fırça/spatül kombinasyonu ile toplanıp PreservCyt Solüsyonuna yerleştirilen servikal numuneler veya SurePath Koruyucu Sıvısında toplanan servikal numunelerle kullanılabilir. Biyopsi numuneleri ancak hemen STM'ye yerleştirilir ve tahlile kadar -20°C'de saklanırsa incelenebilir.
- *digene* HC2 DNA Collection Device hamile kadınlardan numune alınması için kullanılmamalıdır.
- HPV enfeksiyonu yüksek evre servikal hastalık varlığı için kesin bir gösterge değildir ve tüm vakalarda yüksek evre hastalık veya kanser gelişeceğine de işaret etmez.
- HPV tipleri 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 56, MM4, MM7, MM8 ve MM9 ve Yüksek Risk HPV Probu arasında az miktarda çapraz hibridizasyon vardır. Bu HPV tiplerinin yüksek seviyelerini içeren numuneleri olan hastalar yanlışlıkla kolposkopiye sevk edilebilir³⁸.
- *digene* HC2 HPV DNA Testi 39, 58, 59 ve 68 dahil düşük risk ve yüksek risk HPV tipleriyle saptamak üzere tasarlanmıştır. QIAGEN tarafından klonlanmış HPV plazmid DNA'sı kullanılarak yapılan analitik çalışmalar bu analizin 0,62 pg/ml ile 1,39 pg/ml arasındaki seviyelerde bu tipleri saptadığını göstermiştir. Bu durum *digene* HC2 HPV DNA Testi tarafından hedeflenen diğer HPV tiplerinin saptama özelliklerine eşdeğerdir. QIAGEN bu HPV tiplerinin saptanmasını sadece sınırlı sayıda klinik numunede doğrulayabilmiştir. Bu tiplerin genel popülasyonda düşük prevalansı nedeniyle (Bosch et. Al³⁶ tarafından gösterildiği şekilde), *digene* HC2 HPV DNA Testinin HPV tipleri 39, 58, 59 ve 68'in saptanması bakımından performans özellikleri istatistiksel olarak doğrulanmamıştır.
- Bir numune HPV testi için alınırken yüksek konsantrasyonlarda anti-fungal krem, kontraseptif jöle ve vajinal yıkama sıvısı bulunursa bu numuneler analiz kesme noktasına yakın RLU/CO değerleri veren HPV DNA seviyeleri içerirlerse bir yalancı negatif sonuç elde etmek olasılığı vardır.
- *digene* HC2 HPV DNA Testi probu ile plazmid pBR322 arasında çapraz reaktivite mümkündür. pBR322 homolog sekanslarının varlığı insan genital numunelerinde bildirilmiştir ve yüksek bakteriyel plazmid seviyeleri varlığında yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir.

REFERANSLAR

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829-2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374-384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899-901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chliff, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.

37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79-88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252-255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.;and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, p. 651-655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333-341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
43. Schulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.

SORUN GİDERME KILAVUZU

| Gözlem | Olası Nedenler | Çözümler |
|---|--|--|
| Denatürasyon sırasında renk değişikliği hatalı veya hiç gözlenmiyor. | <p>Denatürasyon Reaktif uygun şekilde hazırlanmamış veya</p> <p>Denatürasyon Reaktif eklenmemiş</p> <p>Numuneler renk değişikliğini maskeleyen kan veya başka materyaller içeriyor.</p> <p>Numune pH'ı olağandışı asidik olabilir.</p> | <p>Denatürasyon Reaktifinin Gösterge Boyayı içerdiğinden ve koyu mor renkte olduğundan emin olun.</p> <p>Numune hacmini ölçerek (1,5 ml beklenir) Denatürasyon Reaktifinin numuneye eklendiğini doğrulayın. Eğer hacim Denatürasyon Reaktifinin eklenmediğine işaret ederse uygun eklemeyi yapın, karıştırın ve bu sefer uygun renk değişikliği gözlenirse analize devam edin.</p> <p>Tarif edilen tam renk değişikliği bu tür numunelerde beklenmez; <i>digene</i> HC2 HPV DNA Testi sonuçlarının olumsuz etkilenmemesi gerekir.</p> <p>Diğer nedenlerden hiçbiri geçerli değilse, numune olağandışı asidik olabilir ve beklenen renk değişikliği oluşmayacaktır. Servikse asetik asit uygulamadan önce yeni bir numune alın çünkü uygun olmayan numune pH'ı test sonuçlarını olumsuz etkiler.</p> |
| Kalite Kontroller yanlış sonuçlar verir | <p>Test için yanlış yazılım protokolü seçilmiş (örn. ikili yöntem için CPC protokolü kullanılmış)</p> <p>QC1-LR ve QC2- HR ters yerleştirilmiş</p> <p>LRC ve QC1-LR ve/veya HRC ve QC1-HR ters yerleştirilmiş.</p> | <p>Yazılım protokolü yapılmakta olan test için yanlışsa, plaka Saptama Reaktifi 2 eklendikten sonra 30 dakika içinde doğru protokolle tekrar okunmalıdır.</p> <p>Numuneleri tekrar test edin.</p> <p>Numuneleri Tekrar Test Edin.</p> |
| Hibridizasyon sırasında hatalı renk değişikliği gözlenmiş. | <p>Prob Karışımının denatüre Kalibratörler, Kontroller ve/veya numunelerle yetersiz karıştırılması veya Prob Karışımı eklenmemiş veya hatalı hacimde Reaktif eklenmiş.</p> <p>Numuneler renk değişikliğini maskeleyen kan veya başka materyaller içeriyor.</p> <p>Numune <1000 µl STM değerine sahip.</p> | <p>Hibridizasyon mikrop plakasını veya mikrotüp askısını 2 dakika daha sallayın. Halen mor kalan kuyular varsa uygun Prob Karışımına 25 µl daha ekleyin ve iyi karıştırın. Prob eklenip tekrar karıştırıldığında uygun renk değişimi olmazsa ve numune kan veya başka materyaller içermediyse numuneyi tekrar test edin.</p> <p>Tarif edilen tam renk değişikliği bu tür numunelerde beklenmez; <i>digene</i> HC2 HPV DNA Testi sonuçlarının olumsuz etkilenmemesi gerekir.</p> <p>Orijinal numunenin hacmini kontrol edin. Hacim 1350 µl ± 20 µl olmalıdır (Düşük ve Yüksek Risk HPV Probları için 75 µl bölüntü alındıktan sonra). Hacim <1350 µl ise, orijinal numune <1000 µl STM içermiştir. Yeni bir numune alın.</p> |

| Gözlem | Olası Nedenler | Çözümler |
|--|---|--|
| Analiz, doğrulama kriterlerinde başarısız olur. Kalibratör, Kalite Kontroller veya numunelerde sinyal gözlenmiyor. | <p>Prob Seyrelticiye Prob eklenmemiş.</p> <p>Hazırlama sırasında prob, RNaz ile kontamine olmuş.</p> <p>Prob ve Prob Seyrelticiin Yetersiz karıştırılması.</p> <p>Seyreltilmiş Prob ve denatüre numunenin yetersiz karıştırılması.</p> <p>Hibridizasyon adımında yanlış süre veya sıcaklık.</p> <p>Yakalama adımında yetersiz karıştırma.</p> <p>Birbirleri Yerine Geçmiş Problar/Prob Karışımları/Hibridizasyon Tüpleri.</p> <p>Doğru Saptama Reaktif 1 miktarının eklenmemesi veya belirtilen süre boyunca inkübasyon yapılmaması.</p> <p>Doğru Saptama Reaktif 2 miktarının eklenmemesi veya belirtilen süre boyunca inkübasyon yapılmaması.</p> <p>Luminometre arızası veya hatalı programlama.</p> | <p>Prob Karışımlarını bu kullanma talimatında tanımlandığı şekilde hazırlayın. Tüpleri dikkatle etiketleyin.</p> <p>Probu pipetlerken aerosol bariyeri pipet uçları kullanın ve eldiven takın. Sadece temiz, yeni tek kullanımlık reaktif rezervuarları kullanın.</p> <p>Probu Prob Seyrelticiye ekledikten sonra en az 5 saniye yüksek hızda vorteksleyerek iyice karıştırın. Görünür bir vorteks oluşmalıdır.</p> <p>Prob Karışımı ve numuneyi her Hibridizasyon Mikroplakası kuyusu veya Mikrotüpüne ekledikten sonra Rotary Shaker I üzerinde 3 ± 2 dakika 1100 ± 100 devir/dk hızında sallayın. Her tüp/mikroplaka kuyusunda mordan sarıya renk değişimini kontrol edin.</p> <p>$65 \pm 2^\circ\text{C}$'de 60 ± 5 dakika hibridize edin. Microplate Heater I veya su banyosunun sıcaklığını kontrol edin. Microplate Heater I veya su banyosunun numuneleri doğru sıcaklığa ısıtmak üzere ayarlandığından ve kullanımdan önce 60 dakika ön ısıtıldığından emin olun. Su seviyesinin numuneleri doğru sıcaklığa ısıtmaya yeterli olduğundan emin olun. Su banyoları düzenli olarak kalibre edilmelidir.</p> <p>Bir Rotary Shaker I üzerinde bu kullanma talimatında belirtildiği gibi $20-25^\circ\text{C}$'de 60 ± 5 dakika sallayın. Rotary Shaker I hızını <i>Rotary Shaker I Kullanım Kılavuzu (Rotary Shaker I User Manual)</i> içinde Shaker Speed Calibration (Shaker Hız Kalibrasyonu) kısmında ana hatları verildiği şekilde doğrulayın.</p> <p>Prob Karışımlarını dikkatle hazırlayın ve Prob Karışımı tüplerini buna göre etiketleyin. Doğru Hibridizasyon Tüpleri setine doğru Probu eklediğinizden emin olun. Prob Karışımı tüplerini, Hibridizasyon Tüplerine ve/veya askıları değiştirme olasılığını en aza indirmek üzere etiketleyin.</p> <p>Her kuyuya 8 kanallı bir pipetör kullanarak $75 \mu\text{l}$ Saptama Reaktif 1 pipetleyin. $20-25^\circ\text{C}$'de 30-45 dakika inkübe edin.</p> <p>Her kuyuya 8 kanallı bir pipetör kullanarak $75 \mu\text{l}$ Saptama Reaktif 2 pipetleyin. $20-25^\circ\text{C}$'de 15-30 dakika inkübe edin.</p> <p>Ek talimat için uygun Kullanıcı El Kitabına başvurun veya yerel QIAGEN Temsilcinizi arayın.</p> |

| Gözlem | Olası Nedenler | Çözümler |
|--|--|---|
| <p>Kalibratör, Kalite Kontroller ve/veya numunelerde artmış RLU değerleri (birçok kuyuda veya tüm kuyularda ≥ 200 RLU). Analiz, doğrulama kriterlerinde başarısız olabilir.</p> | <p>Denatürasyon Reaktif eklenmemiş veya hatalı reaktif hacmi eklenmiş veya Denatürasyon Reaktifinin numuneler veya Kalibratörlerle yetersiz karıştırılması.</p> <p>Luminometrede ışık kaçağı. Kapı mühürlenmemiş. Kapı etrafındaki mühür bozulmuş.</p> <p>Saptama Reaktif 2 veya Yakalama Mikroplakası kuyularının Saptama Reaktif 1 veya ekzojen alkale fosfatazla kontaminasyonu.</p> <p>Kontamine Yıkama Tamponu.</p> <p>Kontamine Automated Plate Washer.</p> <p>Yakalama Mikroplakası kuyularının Saptama Reaktif 1 inkübasyonundan sonra yetersiz yıkanması.</p> <p>Mikroplaka kuyularının Saptama Reaktif 1 kontaminasyonu.</p> <p>Hibridizasyon solüsyonunun Kimtowels Wipers veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havluların aynı bölgesine dokunarak kurutulması.</p> <p>Hatalı kağıt havluların kullanılması.</p> | <p>Tekrarlama pipetörünün doğru iletim yaptığını Denatürasyon Reaktifini ekmeden önce doğrulayın. Kalibre edilmiş pipetörler şarttır. Her tüpe yarım hacim Denatürasyon Reaktif ekleyin ve iyice karıştırın. Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkadığından emin olun. Kalibratörler, Kalite Kontroller ve numuneler Denatürasyon Reaktif eklendikten sonra mor renge dönüşmelidir.</p> <p>Luminometrenin arka alan okumasını boş bir mikroplaka okuyarak kontrol edin. 50 RLU üzerindeki bir ölçüm bir ışık kaçağı bulunduğuna işaret eder. Ek talimat için uygun Kullanıcı El Kitabına başvurun veya yerel QIAGEN Temsilcinizi arayın.</p> <p>Bu Sorun Giderme Kısımında Kontaminasyon Kontrolüne başvurun.</p> <p>Bu Sorun Giderme Kısımında Kontaminasyon Kontrolüne başvurun.</p> <p>Bu Sorun Giderme Kısımında Kontaminasyon Kontrolüne başvurun.</p> <p>Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde kuyuları taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın. Yıkadıktan sonra kuyularda görünür kalan pembe sıvı olmamalıdır. Testlerde kontaminasyon veya arızalar için <i>Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına (Automated Plate Washer User Manual)</i> başvurun.</p> <p>Tüm çalışma yüzeylerinin temiz ve kuru olduğundan emin olun. Saptama Reaktif 1 kullanılırken dikkatli olun. Aerosollerden kaçınin.</p> <p>Kimtowels Wipers veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havluların daha önce kullanılmış aynı bölgesine dokunarak kurutmayın.</p> <p>Dokunarak sıvıyı gidermek için Kimtowels Wipers veya eşdeğeri tiftiksiz kağıt havlular kullanın.</p> |
| <p>Düşük PC/NC oranları veya oranın <2,0 olduğu yüksek sayıda (>%20) düşük pozitif numune. Analiz, doğrulama kriterlerinde başarısız olabilir.</p> | <p>Yetersiz numune hazırlama.</p> <p>Prob yeterince karıştırılmamış veya analizlere yetersiz Prob eklenmiş.</p> <p>Her Hibridizasyon Mikrotüpüne yetersiz seyreltilmiş Prob hacmi eklenmiş</p> <p>Saptama Reaktif 1 aktivitesi kaybı.</p> <p>Yetersiz yakalama.</p> <p>Yetersiz yıkama.</p> <p>Kontamine Yıkama Tamponu.</p> | <p>Uygun Denatürasyon Reaktif hacmini ekleyin ve vortekslemeyle iyice karıştırın. Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkadığından emin olun. PreservCyt Solüsyonu numuneleri için denatürasyon inkübasyonundan önce uygun karıştırma ve hücre peleti tekrar süspansiyonunun tamamlandığından emin olun. Protokol ayrıntıları için <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına başvurun. Saydamdan koyu mora belirgin bir renk değişikliği gözlenmelidir. $65 \pm 2^\circ\text{C}$'de 45 ± 5 dakika inkübe edin.</p> <p>Prob Karışımlarını tanımlandığı şekilde hazırlayın. Vortekslemeyle, görünür bir vorteks oluştuğundan emin olarak iyice karıştırın. Prob Karışımları doğru iletimden emin olunması için tüplere bir pozitif displasman pipetörü veya çoklu kanallı bir pipetörle eklenmelidir.</p> <p>8 kanallı pipetörün doğru iletim yaptığını hibridizasyon mikroplakası veya mikrotüplerine Prob Karışımını ekmeden önce doğrulayın. Denatüre Kalibratörler, Kalite Kontroller ve klinik numuneleri içeren her mikroplaka kuyusu veya mikrotüpe 25 μl Prob Karışımı ekleyin. 8 kanallı pipetörün doğru iletim yaptığını Hibridizasyon Mikroplakası kuyularına Prob Karışımını ekmeden önce doğrulayın. Renk değişimi Prob Karışımı ekleyip iyice karıştırmadan sonra koyu mordan sarıya olmalıdır. PreservCyt Solüsyonu numuneleri sarı yerine pembeye dönmelidir.</p> <p>Saptama Reaktif 1'i $2-8^\circ\text{C}$'de saklayın. Kit dış kutu etiketindeki son kullanma tarihinden önce kullanın.</p> <p>Yakalama adımı 1.100 ± 100 devir/dk olarak ayarlanmış bir Rotary Shaker I kullanılarak yapılmalıdır. Shaker hızını kalibrasyonla doğrulayın.</p> <p>Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde kuyuları taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın.</p> <p>Bu Sorun Giderme Kısımında Kontaminasyon Kontrolüne başvurun.</p> |

| Gözlem | Olası Nedenler | Çözümler |
|---|---|--|
| RLU değerleri yaklaşık aynı olan bir dizi pozitif numune. | <p>Analiz manipülasyonu sırasında Yakalama Mikroplakası kuyularının kontaminasyonu.</p> <p>Saptama Reaktif 2 kontaminasyonu.</p> <p>Automated Plate Washer arızası.</p> | <p>Tüm inkübasyonlar sırasında yakalama mikroplakasını örtün. Analizi yaparken tüplerin aerosol kontaminasyonuna maruz kalmasından kaçının. Kullanım sırasında pudrasız eldivenler takın.</p> <p>Yakalama Mikroplakası kuyularına Saptama Reaktif 2 pipetlerken stoğu kontamine etmediğinizden emin olun. Saptama Reaktif 2'nin Saptama Reaktif 1'den aerosoller veya laboratuvar tozu, vs. ile kontaminasyonundan kaçının.</p> <p>Kontaminasyon veya arıza testleri talimatı için Sorun Giderme kısmında Kontaminasyon Kontrolüne başvurun veya <i>Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına (Automated Plate Washer User Manual)</i> bakın.</p> |
| Replikatlar arasında geniş %CV. | <p>Hatalı pipetleme.</p> <p>Yetersiz karıştırma.</p> <p>Sıvının Hibridizasyon Mikrotüplerinden Yakalama Mikroplaka Kuyularına tam olmayan transferi.</p> <p>Uygun olmayan yıkama koşulları.</p> <p>Mikroplaka kuyularının Saptama Reaktif 1 kontaminasyonu.</p> | <p>Tekrar üretilebilir hacimlerin iletildiğinden emin olmak için pipetörü kontrol edin. Pipetörleri rutin olarak kalibre edin.</p> <p>Tüm adımlarda iyice karıştırın. Denatürasyon inkübasyonundan önce ve Prob Karışımı eklenmesinden sonra vorteksleyin. Görünür bir vorteks oluştuğundan emin olun.</p> <p>Hibridizasyon Mikroplakası kuyuları veya mikrotüplerinden Yakalama Mikroplakası kuyularına transfer adımı sırasında tekrar üretilebilir hacimlerin aktarıldığından emin olun.</p> <p>Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer ve uygun Automated Plate Washer protokollerini kullanarak yıkayın.</p> <p>Tüm çalışma yüzeylerinin temiz ve kuru olduğundan emin olun. Saptama Reaktif 1 kullanılırken dikkatli olun. Aerosollerden kaçının.</p> |
| Bilinen negatif numunelerden elde edilen yalancı pozitif sonuçlar. | <p>Saptama Reaktif 2 kontaminasyonu.</p> <p>Mikroplaka kuyularının Saptama Reaktif 1 kontaminasyonu.</p> <p>Birkaç sıra boyunca Kimtowels Wipers veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havluların aynı bölgesine dokunarak kurutulması.</p> <p>Yetersiz numune hazırlama.</p> <p>Uygun olmayan yıkama koşulları.</p> <p>Denatüre numunenin HPV probu hibridizasyon mikrotüpü veya hibridizasyonu için kullanılan mikrotüpe veya mikroplaka kuyusuna aktarılması sırasında denatüre pipet ucunun denatüre olmamış materyallerle kontaminasyonu.</p> | <p>Saptama Reaktif 2'yi numuneler arasında bölerken numunelerde çapraz kontaminasyon oluşturmadığınızdan emin olun. Bir kitin sadece bir parçasını kullanıyorsanız, o analiz için gerekli hacmi pipetörü doldurmadan önce temiz, tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına bölüntüleyin.</p> <p>Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın. Yıkadıktan sonra mikroplaka kuyularında görünür kalan pembe sıvı olmamalıdır.</p> <p>Daha önce kullanılan bir bölgeye dokunarak suyu gidermeyin yoksa kontaminasyon oluşabilir.</p> <p>Uygun Denatürasyon Reaktif hacmini ekleyin ve vortekslemeyle iyice karıştırın. Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için manuel yöntem veya MST Vortexer 2 yöntemiyle (manuel vorteksleyici yöntemi için tüpü bir kez ters çevirin) sıvının tüp iç yüzeyini yıkadığından emin olun. PreservCyt Solüsyonu numuneleri için denatürasyon inkübasyonundan önce uygun karıştırma ve hücre peleti tekrar süspansiyonunun tamamlandığından emin olun. Protokol ayrıntıları için <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına başvurun. Tüm numuneler için koyu mora belirgin bir renk değişikliği gözlenmelidir. 65 ± 2°C'de 45 ± 5 dakika inkübe edin. SurePath numuneleri için numunelerin 65 ± 2°C'de 90 ± 5 dakika inkübe edildiğinden emin olun.</p> <p>Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde kuyuları taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer ve uygun Automated Plate Washer protokollerini kullanarak yıkayın.</p> <p>Numune işleme işleminin denatürasyon adımı bu kullanma talimatında belirttiği şekilde yapılmalıdır. Uygun olmayan numune vorteksleme, tüp inversiyonu ve ajitasyon servikal numunelere endojen spesifik olmayan RNA:DNA hibridlerinin tam olmayan denatürasyonu ile sonuçlanabilir. Özellikle PreservCyt Solüsyonu veya SurePath Koruyucu Sıvısı numuneleri kullanırken bu hibridlerin numune denatürasyon tüpü duvarlarının iç kısmında bulunması olasıdır. Bu denatüre olmamış hücre materyalinin olası bulaşmasını önlemek için mikropipet ucunun denatüre numunenin HPV probu hibridizasyonu için kullanılan mikrotüp veya mikroplaka kuyusuna aktarılması sırasında numune denatürasyon tüpünün kenarlarına dokunmasına izin vermeyin.</p> |

| Gözlem | Olası Nedenler | Çözümler |
|---|--|--|
| Artmış Negatif Kalibratör RLU değerleri (>200 RLU). Analizin kalan kısmı beklenen performansı gösterir. | <p>Saptama Reaktif 2 20–25°C üzerinde bir sıcaklıkta inkübe edilmiştir.</p> <p>Saptama Reaktif 2, 30 dakikanın üzerinde inkübe edilmiştir.</p> <p>Saptama Reaktif 2 veya Yıkama Tamponu alkali fosfataz veya Saptama Reaktif 1 ile kontamine olmuştur.</p> | <p>Testi tekrar çalışın ve yakalama ve saptama adımlarının 20–25°C'de inkübe edildiğinden emin olun.</p> <p>Plakayı 20–25°C'de 15 dakika inkübasyondan sonra (ve en fazla 30 dakika inkübasyondan sonra) okuyun.</p> <p>Bu Sorun Giderme Kısmında Kontaminasyon Kontrolüne başvurun.</p> |
| Analiz, doğrulama kriterlerinde başarısız olur. Artmış PC/NC Oranı | HRC ve QC2-HR ve/veya LRC ve QC1-LR ters yerleştirilmiş | Numuneleri Tekrar Test Edin. Bu reaktiflerin yerleştirilmesini ters yapmamak için Kalibratör ve Kalite Kontrol flakonlarındaki etiketleri dikkatle okuyun. |

KONTAMİNASYON KONTROLÜ

| Değerlendirilen Reaktif | Kontaminasyon Kontrolü İşlemi | Sonuçların Yorumlanması |
|---|--|--|
| Not: Saptama Reaktif 2 pipetlerken kontaminasyondan kaçınmak için dikkatli olun. Eldiven kullanın ve pipet uçlarını herhangi bir çalışma yüzeyine dokundurmadan kaçının. | | |
| Saptama Reaktif 2 | <ul style="list-style-type: none"> Bölüntülenmiş, kalan veya orijinal Saptama Reaktif 2 flakonundan 75 µl miktarını boş bir Yakalama Mikroplakası kuyusuna pipetleyin. 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçının. Luminometrede Mikroplaka kuyularını okuyun. <p>Not: Performansın optimum değerlendirilmesi için Saptama Reaktif 2'yi 3 kopya halinde test edin.</p> | <ul style="list-style-type: none"> Saptama Reaktif 2 Kontrolü < 50 RLU olmalıdır. Saptama Reaktif 2 değerleri < 50 RLU ise Saptama Reaktif 2 analizi tekrarlamak için kullanılabilir. Kontamineyse (>50 RLU), yeni bir kit alın ve analizi tekrarlayın. |
| Yıkama Tamponu Aygıtı ve/veya Su Kaynağı | <ul style="list-style-type: none"> 4 ayrı Yakalama Mikroplakası kuyusuna 75 µl Saptama Reaktif 2 pipetleyin. Kuyuları 1–4 olarak işaretleyin. Kuyu 1, Saptama Reaktif 2 kontrolü görevi yapar. Yıkama şişesinden kuyu 2'ye 10 µl yıkama tamponu pipetleyin. Yıkama tamponunun yıkayıcı tüpü içinden akmasını bekleyin. Tüpten 10 µl yıkama tamponunu kuyu 3'e pipetleyin. Yıkama tamponunu hazırlamak için kullanılan sudan bir bölüntü alın. 10 µl suyu kuyu 4'e pipetleyin. 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçının. Luminometrede Mikroplaka kuyularını okuyun. | <ul style="list-style-type: none"> Saptama Reaktif 2 Kontrolü (kuyu 1) < 50 RLU olmalıdır. Kuyu 2, 3 ve 4'ten RLU değerini Saptama Reaktif 2 kontrol RLU değeriyle (kuyu 1) karşılaştırın. Kuyu 2, 3 ve 4 için ayrı RLU değerleri Saptama Reaktif 2 kontrol RLU değerini 50 RLU geçmemelidir (kuyu 1). Saptama Reaktif 2 kontrolünü 50 RLU geçen değerler kontaminasyona işaret eder. Yıkama Aygıtını temizleme ve bakımını yapma için bakınız Reaktif Hazırlama ve Saklama. |
| Automated Plate Washer | <ul style="list-style-type: none"> 5 ayrı Yakalama Mikroplakası kuyusuna 75 µl Saptama Reaktif 2 pipetleyin. Kuyuları 1-5 olarak etiketleyin. Kuyu 1, Saptama Reaktif 2 kontrolü görevi yapar. <i>Wash (Yıkama)</i> etiketli plaka yıkayıcı şişesinden kuyu 2'ye 10 µl yıkama tamponu pipetleyin. <i>Rinse (Durulama)</i> etiketli plakaya yıkayıcı şişesinden kuyu 3'e 10 µl durulama sıvısı pipetleyin. Plaka Yıkayıcı tuş takımında Prime (Sıvı Geçir) tuşuna basıp yıkama tamponunun hatlardan akmasını bekleyin. Oluştan 10 µl yıkama tamponunu kuyu 4'e pipetleyin. Plaka Yıkayıcı tuş takımında Rinse (Durula) tuşuna basıp durulama sıvısının hatlardan akmasını bekleyin. Oluştan 10 µl yıkama tamponunu kuyu 5'e pipetleyin. Örtün ve 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçının. Luminometrede Mikroplaka kuyularını okuyun. | <ul style="list-style-type: none"> Saptama Reaktif 2 Kontrolü (kuyu 1) < 50 RLU olmalıdır. Kuyu 2, 3, 4 ve 5'ten RLU değerini Saptama Reaktif 2 kontrol RLU değeriyle (kuyu 1) karşılaştırın. Kuyu 2, 3, 4 ve 5 için ayrı RLU değerleri Saptama Reaktif 2 kontrol RLU değerini 50 RLU geçmemelidir (kuyu 1). Plaka Yıkayıcıdan, DR2 kontrolden 50 RLU üzerinde değerler kontaminasyona işaret eder. Bakınız <i>Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına (Automated Plate Washer User Manual)</i> Dekontaminasyon İşlemi. |

Yerel QIAGEN temsilcinizle irtibat kurmak için bu ürünle sağlanan İrtibat Bilgi sayfasını kullanın.

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

Bu belgede kullanılan tescilli isimler, ticari markalar vs. bu şekilde işaretlenmemiş olsalar bile kanunen koruma altında olmadıkları düşünülmemelidir.

Bu ürün ve kullanım yöntemi aşağıdaki patentlerden biri veya birkaçının kapsamı altındadır:

A.B.D. HPV Patent Numaraları

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

A.B.D. Hybrid Capture Patent Numarası

6,228,578B1

digene HC2 HPV DNA Testi Özeti

ÖNEMLİ: Bu özeti kullanmadan önce ayrıntılı işleme tamamen aşına olmak önemlidir.

| | İşlem | |
|---|---|--|
| DENATÜRASYON (PreservCyt Solüsyonları numuneleri için bakınız digene HC2 Sample Conversion Kit kullanma talimatı) | Manuel Vorteks Yöntemi Hibridizasyon mikrotüplerini etiketleyin. Denatürasyon Reaktifini hazırlayın. ↓ Denatürasyon Reaktifini kalibratörler, kalite kontroller ve numunelere pipetleyin (hacim, numune hacminin yarısına eşdeğerdir). Her numune, kalibratör ve kalite kontrolü yüksek hızda ayrı ayrı 5 saniye vorteksleyin (ayrıntılar için bu kullanma talimatına bakınız). Tüm tüplerin mor rengi olduğunu kontrol edin. ↓ 65 ± 2°C'de 45 ± 5 dakika inkübe edin. ↓ HPV Prob Karışımı hazırlayın. ↓ ↓ ↓ | Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 Yöntemi Hibridizasyon Plakasını etiketleyin. Denatürasyon Reaktifini hazırlayın. ↓ Denatürasyon Reaktifini kalibratörler, kalite kontroller ve numunelere pipetleyin (hacim, numune hacminin yarısına eşdeğerdir). Tüm tüplerin mor rengi olduğunu kontrol edin. ↓ Askıyı film ve kapakla örtün. ↓ 10 saniye boyunca vorteksleyin. ↓ 65 ± 2°C'de 45 ± 5 dakika inkübe edin. ↓ HPV Prob Karışımı hazırlayın ↓ |
| HİBRİDİZASYON Kombine Prob Kokteyli Yöntemi İkili Prob Yöntemi | Su Banyosu Yöntemi Denatüre edilmiş numuneyi iyice karıştırın ve tüplere 75 µl pipetleyin. ↓ 20-25°C'de 10 dakika inkübe edin ↓ Hibridizasyon mikrotüplerine 25 µl Kombine Prob Kokteyli pipetleyin. ↓ VEYA Denatüre edilmiş numuneyi iyice karıştırın ve 75 µl'yi "LR" tüplerine pipetleyin. Denatüre edilmiş numuneyi iyice karıştırın ve 75 µl'yi "HR" tüplerine pipetleyin. ↓ 20-25°C'de 10 dakika inkübe edin ↓ "LR" tüplerine 25 µl Düşük Risk HPV Prob Karışımı pipetleyin. "HR" tüplerine 25 µl Yüksek Risk HPV Prob Karışımı pipetleyin. ↓ Mikrotüpleri bir plaka mühürleyici ile örtün ve Rotary Shaker I üzerinde 1100 ±100 devir/dk hızında 3 ± 2 dakika sallayın. Tüm tüplerin sarı renkli olduğunu kontrol edin. ↓ 65 ± 2°C'de 60 ± 5 dakika inkübe edin. Yakalama mikroplakasını hazırlayın. ↓ ↓ ↓ | Microplate Heater I Yöntemi Denatüre edilmiş numuneyi iyice karıştırın ve mikroplaka kuyularına 75 µl pipetleyin. ↓ 20-25°C'de 10 dakika inkübe edin ↓ Hibridizasyon mikroplakası kuyularına 25 µl Kombine Prob Kokteyli pipetleyin. ↓ VEYA Denatüre edilmiş numuneyi iyice karıştırın ve "LR" mikroplaka kuyularına 75 µl ve "HR" mikroplaka kuyularına 75 µl pipetleyin. ↓ 20-25°C'de 10 dakika inkübe edin ↓ 25 µl Düşük Risk HPV Prob Karışımı "LR" mikroplaka kuyularına pipetleyin. 25 µl Yüksek Risk HPV Prob Karışımı "HR" mikroplaka kuyularına pipetleyin. ↓ Mikroplakayı bir plaka kapağıyla örtün ve Rotary Shaker I üzerinde 1100 ± 100 devir/dk hızında 3 ± 2 dakika sallayın. Tüm tüplerin sarı renkli olduğunu kontrol edin. ↓ 65 ± 2°C'de 60 ± 5 dakika inkübe edin. Yakalama mikroplakasını hazırlayın. ↓ |
| HİBRİD YAKALAMA | Her Hibridizasyon Plakası Kuyusu veya mikrotüpünden içeriği 8 kanallı bir pipetör kullanarak yakalama mikroplakasında karşılık gelen kuyuya aktarın. Bir plaka kapağı veya plaka mühürleyici ile örtün. 1100 ±100 devir/dk hızında 20-25°C'de 60 ± 5 dakika sallayın. Yıkama Tamponu Hazırlayın. ↓ Yakalama mikroplakasında dekantasyon yapın ve dokunarak kurutun (ayrıntılar için bu kullanma talimatına bakınız). ↓ | |
| HİBRİD SAPTAMA | Her yakalama mikroplakası kuyusuna 75 µl Saptama Reaktifini 1 pipetleyin. Yakalama mikroplakasını plaka kapağı, Parafilm veya eşdeğeri ile örtün. 20-25°C'de 30 - 45 dakika inkübe edin. Plakayı istenen yöntemi kullanarak yıkayın. ↓ | |
| YIKAMA | Manuel Yıkama Yöntemi Yakalama mikroplakasında dekantasyon yapın ve dokunarak kurutun (ayrıntılar için bu kullanma talimatına bakınız). ↓ 6 kez yıkayın. ↓ Tiftiksiz kağıt havlularda dokunarak kurutun ↓ | Automated Plate Washer Yöntemi Plakayı yıkayıcıya yerleştirin ve başlamak için "START/STOP" (BAŞLAT/DURDUR) kısmına basın. ↓ Sonraki adıma gidin. ↓ ↓ ↓ |
| SİNYAL AMPLİFİKASYONU ÖLÇÜM | Her yakalama mikroplakası kuyusuna 75 µl Saptama Reaktifini 2 pipetleyin. 20-25°C'de 15 - 30 dakika inkübe edin. ↓ Yakalama mikroplakasını DML Aletinde ölçün. ↓ Analizi doğrulayın ve numune sonuçlarını yorumlayın. | |