

jun 2023.

QIAscreen[®] HPV PCR Test uputstvo za upotrebu (uputstvo)



Verzija 1



Za korišćenje u in vitro dijagnostici

Za korišćenje sa Rotor-Gene[®] Q MDx instrumentom



617005



Self-screen B.V., Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam, Holandija



1132289SR

Sadržaj

Namena.....	4
Sažetak i objašnjenje.....	5
Principi procedure	6
Obezbeđeni materijal	7
Potreban materijal koji se ne isporučuje.....	8
Potrošni materijal, reagensi i instrumenti za pripremu uzorka	8
Potrošni materijal za Rotor-Gene Q MDx instrument	8
Oprema	8
Oprema za ekstrakciju i real-time PCR	9
Upozorenja i mere opreza	10
Informacije o bezbednosti	10
Opšte mere opreza	10
Čuvanje i rukovanje reagensima	12
Čuvanje i rukovanje uzorcima	13
Priprema uzorka	15
Protokol: QIAscreen HPV PCR Test na Rotor-Gene Q MDx instrumentu	18
PCR na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete.....	21
Tumačenje rezultata	24
Ograničenja	26
Karakteristike učinka	28
Ograničenje detekcije (Limit of Detection, LoD)	28
Analitička specifičnost	29

Klinički učinak na cervikalnim uzorcima (strugotinama)	29
Reproduktivnost*	30
Performanse na samoprikupljenim (cerviko)vaginalnim uzorcima.....	30
Ometajuće supstance*	30
Reference	31
Vodič za rešavanje problema	33
Simboli.....	35
Kontakt informacije	37
Informacije za naručivanje	38
Istorija revizija dokumenta	40

Namena

QIAscreen HPV PCR Test je in vitro ispitivanje zasnovano na real-time PCR za kvalitativnu detekciju DNK humanog papiloma virusa (HPV) narednih 15 (verovatno) visokorizičnih HPV genotipa, tj., 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 i 68.

Uzorci se mogu testirati sa QIAscreen HPV PCR Test uključujući DNK izolovan iz uzoraka koji su prikupljeni na sledeće načine:

- Cervikalni uzorci prikupljeni četkicom (prikupljanje od strane lekara)
- Vaginalni uzorci prikupljeni četkicom ili priborom za ispiranje (samoprikupljanje)

Indikacije za upotrebu:

- Kao primarni test u skriningu kod žena radi otkrivanja rizika od cervikalnog (pre)kancera kako bi se utvrdila potreba za upućivanjem na kolposkopiju ili druge dodatne postupke
- Kao dodatni test za žene sa rezultatima Papa testa sa atipičnim pločastim ćelijama neodređenog značaja (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US) ili skvamoznom intraepitelnom neoplazijom niskog gradusa (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) kako bi se utvrdila potreba za upućivanjem na kolposkopiju ili druge dodatne postupke

Ovaj proizvod je predviđen za korišćenje od strane profesionalnih korisnika, kao što su tehničari i laboranti koji su obučeni za in vitro dijagnostičke procedure, tehnike molekularne biologije i Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM sistem.

Sažetak i objašnjenje

Humani papiloma virusi (HPV) pripadaju porodici Papillomaviridae i to su mali dvolančani DNK virusi. Cirkularni genom je veličine od oko 7,9 kilobaza. Identifikovano je više od 100 vrsta HPV, od kojih su određeni tipovi HPV, poznati kao visokorizični HPV (high-risk HPV, hrHPV) kao što su HPV 16 i 18, u vezi sa indukcijom mukozalnih lezija koja može prerasti u malignitet. Cervikalni kancer i njegove prethodnice lezije (cervikalna intraepitelna neoplazija, CIN) su najpoznatije komplikacije uporne infekcije sa visokorizičnim tipom HPV (1-3).

Virusni genom sadrži rane (early, E) i kasne (late, L) gene koji kodiraju proteine koji su potrebni za rane i kasne faze životnog ciklusa HPV. Proizvodi E6 i E7 gena hrHPV tipova imaju kancerogena svojstva i neophodni su za malignu transformaciju ćelije domaćina (4). Maligni napredak je često u vezi sa virusnom integracijom u genom ćelije domaćina (5). Rezultati integracije u prekidu virusnog genoma u oblasti koja se može proširiti sa E1 na L1 otvorenog okvira očitavanja (6). Ovo može imati posledice za amplifikaciju virusnog DNK posredstvom PCR u ovim oblastima. Budući da ne samo pokretanje, već i održavanje transformisanog fenotipa zavisi od neprekidnog izražavanja virusnih onkoproteina (7, 8), virusna E6/E7 oblast se bez izuzetka čuva u integrisanim virusnim genomima u cervikalnim kancerima (6). QIAscreen HPV PCR Test cilja očuvanu oblast u okviru E7 gena. Ispitivanje je klinički potvrđeno u skladu sa međunarodnim smernicama za ispitivanja za detekciju HPV i u drugim studijama (9, 10, 14, 15).

Principi procedure

QIAscreen HPV PCR Test je mnogostruko ispitivanje zasnovano na real-time PCR-u i usmereno protiv E7 gena 15 (verovatnih) hrHPV tipova, koje koristi fluorescentne probe za detekciju jednog ili više akumuliranih proizvoda PCR. Tokom svakog PCR ciklusa fluorescentni signal se logaritamski povećava, što rezultira krivom amplifikacije. Čim kriva amplifikacije ciljne oblasti pređe iznad ograničenja, uzorak se smatra pozitivnim za tu ciljnu oblast. Mnogostruki format omogućava istovremenu detekciju četiri različite fluorescentne boje po reakciji, gde svaka fluorescentna boja predstavlja različite ciljne oblasti. Četiri različite ciljne oblasti su: **1.** HPV 16, **2.** HPV 18, **3.** 13 drugih hrHPV tipova kao skup i **4.** humani β -globin gen. QIAscreen HPV PCR Test posebno detektuje HPV 16, HPV 18 i skup 13 drugih hrHPV genotipa. Humani β -globin gen se koristi kao kontrolni uzorak koji određuje i kvalitet uzorka DNK i prisustvo potencijalnih inhibitornih supstanci.

Obezbeđeni materijal

Sadržaj kompleta

QIAscreen HPV PCR Test Kit		72 reakcije
Kataloški br.		617005
QIAscreen Master Mix (QIAscreen master miks) (1 epruveta)	Providno	1080 µl
QIAscreen Positive Control (QIAscreen pozitivna kontrola) (1 epruveta)	Providno	100 µl
QIAscreen Negative Control (QIAscreen negativna kontrola) (1 epruveta)	Providno	100 µl
<i>QIAscreen HPV PCR Test uputstvo za upotrebu (uputstvo)</i>		1

Potreban materijal koji se ne isporučuje

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim tehničkim specifikacijama (Safety Data Sheet, SDS) dostupnim kod dobavljača proizvoda.

Potrošni materijal, reagensi i instrumenti za pripremu uzorka

- Hologic PreservCyt® Solution (za čuvanje samoprikupljenih uzoraka)
- Standardni kompleti za ekstrakciju DNK, kao što su QIAamp® DSP Virus Spin Kit (QIAGEN, kat. br. 61704) and QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit (QIAGEN, kat. br. 937055) i NucleoMag 96 Tissue Kit (Macherey-Nagel, kat. br. 744300)
- PBS za rukovanje cervikalnim uzorcima u medijumu za prikupljanje PreservCyt
- Pufer AL (QIAGEN, kat. br. 19075) za predtretman cervikalnih uzoraka prikupljenih u medijumu za prikupljanje SurePath i CellSolutions

Potrošni materijal za Rotor-Gene Q MDx instrument

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, za upotrebu sa rotorom 72-Well Rotor (QIAGEN kat. br. 981103 ili 981106)

Oprema

- Namenske pipete* (podesive) za PCR (1–10 µl; 10–100 µl)
- Namenski sterilni pipetni nastavci sa filterom i bez DNaze
- Rukavice za jednokratnu upotrebu
- Statička centrifuga*
- Vortex mešalica*

* Proverite da li su instrumenti provereni i kalibrisani u skladu sa preporukama proizvođača.

Oprema za ekstrakciju i real-time PCR

- QIASymphony SP Module (kat. br. 9001297) (za opcionu automatizaciju ekstrakcije)
- Rotor-Gene Q 5plex HRM System (kat. br. 9002033) ili Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument (kat. br. 9002032) sa Rotor-Gene Q verzijom softvera 2.3.1 ili novijom*
- QIAScreen matrica obrade za Rotor-Gene Q. Matrica se naziva „**QIAScreen RGQ profile v1.0.ret**“.
- QIAScreen matrice za analizu ekrana za zeleni (HPV 16), žuti (HPV drugo), narandžasti (β -globin) i crveni (HPV 18) kanal. Matrice imaju oznaku tipa datoteke „.qut“.

* Ako je primenljivo, može se koristiti Rotor-Gene Q 5plex HRM instrument proizveden u januaru 2010. godine ili kasnije. Datum proizvodnje se može pronaći u okviru serijskog broja na poleđini instrumenta. Serijski broj je naveden u obliku „mmggnnn“, gde „mm“ označava mesec proizvodnje u ciframa, „gg“ označava poslednje dve cifre godine proizvodnje, a „nnn“ predstavlja jedinstvenu identifikaciju instrumenta.

Upozorenja i mere opreza

Informacije o bezbednosti

Kada radite sa hemikalijama, uvek nosite odgovarajući laboratorijski mantil, rukavice za jednokratnu upotrebu i zaštitne naočare. Više informacija potražite u odgovarajućim listovima sa bezbednosnim podacima (Safety Data Sheet, SDS). Dostupni su na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na adresi www.qiagen.com/safety, na kojoj možete da pronađete, pogledate i odštampate SDS-ove za svaki QIAGEN komplet i komponentu kompleta.

- QIAscreen HPV PCR Test pozitivne i negativne kontrole sadrže natrijum azid kao konzervans (0,01%). Natrijum azid može da reaguje sa olovnim i bakarnim cevima čime se stvaraju azidi eksplozivnog metala. Prilikom odlaganja u slivnik, isperite odvod velikom količinom hladne vode da biste sprečili nagomilavanje azida.

Opšte mere opreza

Korišćenje PCR testova zahteva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je namenjena za molekularnu biologiju i koja je u skladu sa važećim propisima i odgovarajućim standardima.

Uvek obratite pažnju na sledeće:

- Nosite zaštitne rukavice bez pudera za jednokratnu upotrebu, laboratorijski mantil i zaštitu za oči prilikom rukovanja uzorcima.
- Sprečite mikrobiološku i kontaminaciju nukleazom (DNazom) uzorka i kompleta. DNaza može uzrokovati degradaciju DNK matrice.
- Izbegavajte prenosnu kontaminaciju DNK ili PCR proizvodom, što može rezultirati lažnim pozitivnim rezultatom.

- Uvek koristite pipetne nastavke bez DNaze za jednokratnu upotrebu sa aerosolnim barijerama.
- Reagensi za QIAscreen HPV PCR Test su optimalno razblaženi. Nemojte da dodatno razblažujete reagense pošto to može da dovede do smanjenja efikasnosti.
- Svi reagensi u okviru QIAscreen HPV PCR Test namenjeni su za upotrebu isključivo sa drugim reagensima koji se dostavljaju u istom kompletu. Ne zamenjujte nijedan reagens iz jednog kompleta istim reagensom iz drugog QIAscreen HPV PCR Test Kit kompleta, čak ni iz iste serije, jer to može uticati na performanse.
- Pročitajte korisnički priručnik za Rotor-Gene Q MDx instrument kako biste se upoznali sa dodatnim upozorenjima, merama opreza i postupcima.
- Pre prve obrade dana, izvršite probnu obradu za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na 95 °C na 10 minuta.
- Promena vremena inkubacije i temperature može rezultirati podacima sa greškom ili podacima koji se ne podudaraju.
- Ne koristite komponente kompleta kojima je istekao rok upotrebe ili koji su nepravilno čuvani.
- Izlaganje komponenti svetlosti svedite na minimum: reakcione smeše se mogu izmeniti usled izlaganja.
- Budite izuzetno oprezni kako biste sprečili kontaminaciju smeša sintetičkim materijalima koji se nalaze u PCR reagensima.
- Odlažite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu sa bezbednosnim postupcima koji su važeći u vašoj zemlji.

Čuvanje i rukovanje reagensima

Uslovi transporta

QIAscreen HPV PCR Test se isporučuje na suvom ledu. Ako bilo koja od komponenti QIAscreen HPV PCR Test po prispeću nije u zamrznutom stanju, ako se spoljašnje pakovanje otvorilo tokom transporta ili pošiljka ne sadrži otpremnicu, priručnik ili reagens, obratite se jednom od odeljenja za tehnička pitanja kompanije QIAGEN ili lokalnom distributeru (posetite veb stranicu www.qiagen.com).

Uslovi čuvanja

QIAscreen HPV PCR Test odmah po prispeću mora da se skladišti na temperaturama od -30 do -15 °C, u zamrzivaču sa konstantnom temperaturom i zaštićen od svetlosti.

Stabilnost


Kada se skladišti u navedenim uslovima za skladištenje, QIAscreen HPV PCR Test je stabilan do isteka roka upotrebe naznačenog na nalepnici na kutiji.

Nakon što se otvore, reagensi mogu da se čuvaju u svom originalnom pakovanju na temperaturama od -30 do -15 °C. Ponovljeno odmrzavanje i zamrzavanje treba izbegavati. Ne prekoračujte maksimalnih 5 ciklusa odmrzavanja i zamrzavanja.

- Blago promešajte okretanjem epruvete 10 puta i centrifugirajte sve epruvete pre otvaranja.
- Rok upotrebe za svaki reagens je naznačen na pojedinačnim nalepticama komponenti. U pravilnim uslovima čuvanja, proizvod će održavati performanse za period stabilnosti sve dok se koriste iste serije komponenti.
- Procedure kontrole kvaliteta kompanije QIAGEN koriste funkcionalno testiranje otpuštanja kompleta za svaku pojedinačnu seriju kompleta. Ne mešajte reagens iz različitih kompleta, čak i ako su iz iste serije.

Obratite pažnju na rokove trajanja i uslove skladištenja koji su odštampani na kutiji i nalepticama svih komponenti. Nemojte da koristite komponente kojima je istekao rok trajanja ili koje su nepropisno skladištene.

Čuvanje i rukovanje uzorcima

<p>OPREZ</p> 	<p>Svi uzorci moraju da se tretiraju kao potencijalno infektivan materijal.</p>
---	---

Cervikalni uzorci

QIAScreen HPV PCR Test je predviđen za korišćenje sa genomskim DNK uzorcima koji se dobijaju iz cervikalnih uzoraka (strugotine). Odobreni medijumi za prikupljanje cervikalnih uzoraka (strugotina) su PreservCyt, CellSolutions®, Pathtezt® i Surepath® medijumi za prikupljanje. Optimalna temperatura čuvanja kliničkih uzoraka je 2–8 °C po dospeću u laboratoriju. U ovim uslovima čuvanja, uzorci u medijumu za prikupljanje PreservCyt stabilni su 3 meseca, a u medijumu za prikupljanje Surepath 2 nedelje pre ekstrakcije DNK.

Cervikalni uzorci prikupljeni u medijumu za prikupljanje PreservCyt mogu se čuvati do 210 dana od prikupljanja uzoraka na temperaturi 18–25 °C, do dve i po godine na temperaturi 2–8 °C i do 2 godine na temperaturi od <20 °C. Uzorci grlića maternice prikupljeni u medijumu Surepath mogu se čuvati do 10 nedelja nakon uzimanja uzoraka na 2–30 °C, do dve i po godine na 2–8 °C i do 210 dana na < 20 °C.

Samoprikupljeni vaginalni uzorci dobijeni pomoću četkice

QIAscreen HPV PCR Test je predviđen za korišćenje sa genomskim DNK uzorcima ekstrahovanim iz samoprikupljenog vaginalnog uzorka dobijenog pomoću četkice i samoprikupljenim cervikovaginalnim uzorcima dobijenim ispiranjem. Samoprikupljeni vaginalni uzorci dobijeni pomoću četkice se mogu sakupiti i transportovati suvi ili u fiziološkom rastvoru (0,9% w/v NaCl) i, nakon dospeća u laboratoriju, čuvati u sredstvu PreservCyt. Samoprikupljeni cervikovaginalni uzorci dobijeni ispiranjem se mogu sakupiti i transportovati u fiziološkom rastvoru (0,9% w/v NaCl) i, nakon dospeća u laboratoriju, čuvati u medijumu PreservCyt. Samoprikupljeni uzorci u medijumu PreservCyt mogu se čuvati do 210 dana nakon uzimanja uzoraka na 18–25 °C, do dve i po godine na 2–8 °C i do 2 godine na < 20 °C.

Uzorci genomske DNK

Kada se ekstrahuje genomska DNK, može se čuvati na temperaturi od 2–8 °C na kratko (≤2 dana) ili na temperaturi od –30 do –15 °C do 12 meseci.

Priprema uzorka

Ekstrakcija DNK

Standardni kompleti za ekstrakciju DNK (npr. kompleti na bazi kolone ili magnetnog mehura, kao što su QIAamp® DSP Virus Spin Kit, QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit i NucleoMag 96 Tissue kit, (Macherey-Nagel)) kompatibilni su sa ovim ispitivanjem. Operativne informacije za QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi navedene su u nastavku.

Klinički uzorci u medijumu za prikupljanje PreservCyt ili PathTezt

Za cervikalne uzorke (strugotine) koji se čuvaju u medijumu za prikupljanje PreservCyt ili PathTezt, deo DNK koji se koristi kao unos na PCR predstavlja 0,125% od 20 ml PreservCyt ili PathTezt uzorka cervikalne strugotine. To odgovara 25 µl prvobitnih tipova uzorka. Budući da se maksimalno samo 5 µl ekstrahovane DNK može koristiti kao unos na PCR, procedure ekstrakcije DNK treba obaviti tako da 5 µl ekstrahovane DNK odgovara 25 µl cervikalnog uzorka (strugotine) kako bi se obezbedilo da se pravilan deo cervikalnog uzorka koristi na PCR. Ekvivalentni medijum za prikupljanje sa formaldehidom (npr. Surepath) ili bez njega (npr. PreservCyt) treba obraditi na isti način.

Važno: Medijum za prikupljanje PreservCyt može ometati proces ekstrakcije DNK. To se može sprečiti na dva načina.

1. Pre ekstrakcije DNK razblažite alikvot uzorka u medijumu za prikupljanje PreservCyt na jednaku zapreminu PBS-a ili pufera za liziranje iz kompleta za ekstrakciju DNK i promešajte. Proverite da li je ukupna zapremina uzorka kompatibilna sa kompletom za ekstrakciju DNK. Ako je ukupna zapremina prevelika za komplet za ekstrakciju, savetujemo vam da koristite 2. metodu navedenu u nastavku.

2. Centrifugirajte uzorak u medijumu za prikupljanje PreservCyt ($\geq 3400 \times g$ 10 minuta) i izvadite supernatant. Kuglica se resuspenduje u odgovarajuću zapreminu PBS-a ili pufera za liziranje koji je kompatibilan sa kompletom za ekstrakciju DNK (za QIAamp DSP Virus Spin Kit: resuspendujte 200 μ l PBS-a i pratite uputstvo proizvođača za ekstrakciju DNK, isperite u 100 μ l; za Margery Nagel Nucleomag96 Tissue Kit: resuspendujte u 100 μ l pufera T1 tog kompleta i pratite uputstvo proizvođača, isperite u 100 μ l)

Ekvivalentni medijum treba obraditi na sličan način.

Operativne informacije za QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit

QSDSP protokol: 500 μ l cervikalnog uzorka u medijumu za prikupljanje PreservCyt meša se sa 500 μ l PBS-a. Integrisana analiza kojom se sprovodi protokol Complex800_V6_DSP počinje na QIASymphony instrumentu u skladu sa koracima navedenim u dokumentu „Konsolidovan radni vodič za QIASymphony® SP/AS – 12.3 integrisana analiza“. DNK se eluira u 60 μ l, a 5 μ l se koristi za QIAscreen HPV PCR Test. Ako koristite samo QIASymphony SP modul, ciklus pripreme uzorka se izvodi pomoću protokola Complex800_V6_DSP sa instrumentom QIASymphony SP. Sledite korake opisane u „Uputstvo za upotrebu (priručnik) za QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit – opšti protokol prečišćavanja“.

Za cervikalne uzorke (strugotine) koji se suspenduju u medijumu za prikupljanje Surepath ili CellSolutions, deo DNK koji se koristi kao unos na PCR predstavlja 0,25% od 10 ml uzorka cervikalne strugotine SurePath ili CellSolutions. To odgovara zapremini od 25 μ l prvobitnog uzorka. Budući da se maksimalno samo 5 μ l ekstrahovane DNK može koristiti kao unos na PCR, zapreminu uzorka i izdvojenu zapreminu DNK treba izabrati tako da 5 μ l ekstrahovane DNK odgovara 25 μ l cervikalnog uzorka (strugotine) kako bi se obezbedilo da se pravilan deo cervikalnog uzorka koristi na PCR.

VAŽNO: Klinički uzorci prikupljeni u medijumima za prikupljanje SurePath i CellSolutions moraju proći predtretman pre upotrebe da bi se sprečilo unakrsno povezivanje izazvano formaldehidom u skladu sa protokolom navedenim u nastavku.

Klinički uzorci za predtretman prikupljeni u medijumima za prikupljanje SurePath i CellSolutions:

1. Promešajte uzorak SurePath ili CellSolutions sa puferom AL u odnosu zapremine 1:1 (QIAGEN) i dobro promešajte.
2. Inkubirajte na temperaturi od 90 °C u trajanju od 20 minuta, nakon čega sledi kalibrisanje na sobnu temperaturu pre početka ekstrakcije DNK.

Ekvivalentni medijum koji sadrži formaldehid treba obraditi na sličan način.

Za samoprikupljene vaginalne uzorke dobijene pomoću četkice koji se suspenduju u rastvoru Hologic PreservCyt Solution, procedure ekstrakcije DNK treba obaviti tako da 5 µl ekstrahovane DNK, koja se koristi kao unos na PCR, predstavlja 0,5% vaginalnog uzorka. Na primer, samoprikupljeni vaginalni uzorak se suspenduje u 2 ml rastvora PreservCyt Solution i tada 5 µl unete DNK odgovara 10 µl suspenzije samoprikupljenog uzorka.

Za samoprikupljene cervikovaginalne uzorke dobijene ispiranjem, deo DNK koji se koristi kao unos na PCR predstavlja 0,5% samoprikupljenog uzorka dobijenog ispiranjem. Tako, u slučaju ukupne zapremine dobijene ispiranjem od 3 ml, procedure ekstrakcije DNK treba obaviti tako da 5 µl DNK za unos odgovara 15 µl originalnog samoprikupljenog uzorka dobijenog ispiranjem.

Protokol: QIAscreen HPV PCR Test na Rotor-Gene Q MDx instrumentu

Važne napomene pre početka

Izdvojite vreme da se upoznate sa Rotor-Gene Q MDx instrumentom pre nego što započnete protokol. Pročitajte korisnički priručnik za taj instrument.

Pre prve obrade dana, izvršite probnu obradu za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na 95 °C na 10 minuta.

Matrica softvera serije Rotor-Gene Q je potrebna za obavljanje testa. Vodite računa da se koristi matrica QIAscreen RGQ profile v1.0.ret.

Za analizu testa za svaki od četiri kanala za detekciju, potrebna je matrica softvera serije Rotor-Gene Q. Vodite računa da se koristi ispravna matrica za svaki kanal, kao što je navedeno u nastavku:

- „QIAscreen RGQ Green Channel analysis template.qut“ se mora koristiti za analizu signala na zelenom kanalu (HPV 16).
- „QIAscreen RGQ Orange Channel analysis template.qut“ se mora koristiti za analizu signala na narandžastom kanalu (β -globin).
- „QIAscreen RGQ Yellow Channel analysis template.qut“ e mora koristiti za analizu signala na žutom kanalu (HPV drugo).
- „QIAscreen RGQ Red Channel analysis template.qut“ e mora koristiti za analizu signala na crvenom kanalu (HPV 18).

Obrada uzoraka na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete

Do 70 uzoraka genomske DNK se može testirati u okviru istog eksperimenta, pored pozitivne i negativne kontrole. Šematski prikaz u Tabeli 1 pruža primer držača za epruvete ili podešavanja rotora za eksperiment sa testom QIAscreen HPV PCR Test. Brojevi označavaju pozicije u držaču za epruvete i krajnju poziciju u rotoru.

Tabela 1. Podešavanje ploče i rotora za eksperiment sa testom QIAscreen HPV PCR Test na Rotor-Gene Q MDx instrumentu

Traka	Položaj epruvete	Naziv uzorka	Traka	Položaj epruvete	Naziv uzorka	Traka	Položaj epruvete	Naziv uzorka
1	1	Pozitivna kontrola	7	25	Uzorak 23	13	49	Uzorak 47
	2	Negativna kontrola		26	Uzorak 24		50	Uzorak 48
	3	Uzorak 1		27	Uzorak 25		51	Uzorak 49
	4	Uzorak 2		28	Uzorak 26		52	Uzorak 50
2	5	Uzorak 3	8	29	Uzorak 27	14	53	Uzorak 51
	6	Uzorak 4		30	Uzorak 28		54	Uzorak 52
	7	Uzorak 5		31	Uzorak 29		55	Uzorak 53
	8	Uzorak 6		32	Uzorak 30		56	Uzorak 54
3	9	Uzorak 7	9	33	Uzorak 31	15	57	Uzorak 55
	10	Uzorak 8		34	Uzorak 32		58	Uzorak 56
	11	Uzorak 9		35	Uzorak 33		59	Uzorak 57
	12	Uzorak 10		36	Uzorak 34		60	Uzorak 58
4	13	Uzorak 11	10	37	Uzorak 35	16	61	Uzorak 59
	14	Uzorak 12		38	Uzorak 36		62	Uzorak 60
	15	Uzorak 13		39	Uzorak 37		63	Uzorak 61
	16	Uzorak 14		40	Uzorak 38		64	Uzorak 62
5	17	Uzorak 15	11	41	Uzorak 39	17	65	Uzorak 63
	18	Uzorak 16		42	Uzorak 40		66	Uzorak 64
	19	Uzorak 17		43	Uzorak 41		67	Uzorak 65
	20	Uzorak 18		44	Uzorak 42		68	Uzorak 66
6	21	Uzorak 19	12	45	Uzorak 43	19	69	Uzorak 67
	22	Uzorak 20		46	Uzorak 44		70	Uzorak 68
	23	Uzorak 21		47	Uzorak 45		71	Uzorak 69
	24	Uzorak 22		48	Uzorak 46		72	Uzorak 70

Napomena: Popunite sve neiskorišćene položaje praznim epruvetama.

PCR na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete

1. Podesite QIAscreen HPV PCR Test.

Napomena: Da bi se umanjio rizik od kontaminacije PCR reakcije, strogo se preporučuje da koristite PCR ormar sa mogućnošću UV zračenja.

Važno: Raspoređivanje QIAscreen Master Mix se mora obaviti u oblasti odvojenoj od one u kojoj se obavlja ekstrakcija DNK.

1a. Očistite oblast stola, pipete i držač za epruvete pre korišćenja sa rastvorom za razgradnju DNK kako bi se sprečila kontaminacija matrice ili nukleaze.

Napomena: Menjajte nastavke za svaku epruvetu da biste izbegli bilo kakvu nespecifičnu kontaminaciju matrice ili smeše reagenasa, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

1b. Blago promešajte izvrtanjem 10 puta, zatim kratko centrifugirajte kako biste prikupili rastvor na dnu epruvete.

1c. Rasporedite 15 µL QIAscreen Master Mix u odgovarajuće epruvete na trakama epruveta (maksimalno 72 epruvete po Rotor-Gene Q MDx obradi). Postavljanje reakcije se može obaviti na sobnoj temperaturi.

1d. Vratite QIAscreen Master Mix u zamrzivač da biste izbegli razgradnju materijala. Prenesite epruvete u odvojenu oblast da biste rasporedili QIAscreen Positive Control i uzorak DNK.

1e. Dodajte 5 µL negativne kontrole u epruvetu na položaju 2, mešajte pipetiranjem gore i dole ili blagim udaranjem epruvete i zatvorite epruvetu pritiskanjem poklopca.

1f. Dodajte 5 µL kontrole QIAscreen Positive Control u epruvetu na položaju 1, mešajte pipetiranjem gore i dole ili blagim udaranjem epruvete i zatvorite epruvetu.

Napomena: Menjajte nastavke za svaku epruvetu da biste izbegli bilo kakvu nespecifičnu kontaminaciju matrice ili smeše reagenasa, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

- 1g. Dodajte 5 µl uzorka DNK u odgovarajuće epruvete koje sadrže QIAscreen Master Mix, mešajte pipetiranjem gore i dole ili blagim udaranjem epruveta i zatvorite epruvete pritiskanjem poklopca.
- 1h. Kada se postavljene 4 epruvete napune, zatvorite ih poklopcem.
Napomena: PCR epruvete se mogu čuvati 30 minuta između pipetiranja uzoraka u PCR i početka eksperimenta u uređaju na temperaturi 2-8 °C na tamnom.
2. Pripremite Rotor-Gene Q MDx i počnite eksperiment na sledeći način:
Važno: Pre prve obrade dana, izvršite probnu obradu za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na 95 °C na 10 minuta.
- 2a. Postavite 72-Well Rotor na držač Rotor Holder.
- 2b. Napunite rotor trakama sa epruvetama u skladu sa dodeljenim položajima, počevši od položaja 1, kao što je prikazano u Tabeli 1 sa trakama sa praznim epruvetama sa poklopcem na svim neiskorišćenim položajima.
Napomena: Vodite računa da prva epruveta bude umetnuta na položaj 1 i da trake sa epruvetama budu postavljene na pravilnu orijentaciju i položaje kao što je prikazano u Tabeli 1.
- 2c. Pričvrstite prsten za zaključavanje.
- 2d. Postavite rotor i prsten za zaključavanje u Rotor-Gene Q MDx instrument i zatvorite poklopac instrumenta.
- 2e. Idite do prozora **New Run** (Nova obrada) i kliknite na **Open a template in another folder...** (Otvori matricu u drugoj fascikli...).
- 2f. Izaberite QIAscreen run template (QIAscreen matrica za obradu) pod nazivom **QIAscreen RGQ profile v1.0.ret**.
- 2g. Izaberite Rotor type (Tip rotora): **72-well rotor** (Rotor sa 72 bunarčića) i **Locking ring attached** (Pričvršćen prsten za zaključavanje) i kliknite na opciju **Next** (Sledeće).
- 2h. Za Operator (Operator), unesite inicijale i kliknite na opciju **Next** (Sledeće).
- 2i. U narednom prozoru kliknite na opciju **Next** (Sledeće).
- 2j. Kliknite na opciju **Start run** (Pokreni obradu).
Da biste uneli nazive uzoraka, kliknite na opciju **Edit samples** (Uredi uzorke) (ovo se takođe može obaviti nakon završetka obrade).

Tabela 2. Podešavanja ciljne oblasti i kanala*

Ciljna oblast	Kanal za detekciju
β-globin	Orange
HPV 16	Green
HPV 18	Red
HPV drugo*	Yellow

* HPV drugo sadrži skup od 13 HPV tipova koji nisu 16 i 18.

3. Analizirajte podatke.

- 3a. Izaberite epruvete koje će se koristiti za analizu.
 - 3b. Idite do prozora **Analysis tool** (Alatka za analizu), izaberite **Cycling A. Green** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite na **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezena podešavanja) (desni donji deo prozora) i izaberite datoteku **QIAScreen RGQ Green Channel analysis template.qut**. Izaberite opciju **Cycling A. Green** i kliknite na **Hide** (Sakrij).
 - 3c. Izaberite opciju **Cycling A. Orange** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite na opciju **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezena podešavanja) i izaberite datoteku **QIAScreen RGQ Orange Channel analysis template.qut**. Izaberite opciju **Cycling A. Orange** i kliknite na **Hide** (Sakrij).
 - 3d. Izaberite opciju **Cycling A. Red** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite na opciju **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezena podešavanja) i izaberite datoteku **QIAScreen RGQ Red Channel analysis template.qut**. Izaberite opciju **Cycling A. Red** i kliknite na **Hide** (Sakrij).
 - 3e. Izaberite opciju **Cycling A. Yellow** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite na opciju **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezena podešavanja) i izaberite datoteku **QIAScreen RGQ Yellow Channel analysis template.qut**.
 - 3f. Kliknite na dugme **Save** (Sačuvaj).
 - 3g. OPCIONO: Za tumačenje rezultata, podaci se mogu izvesti kao .csv datoteka. Idite na **File > Save as > Excel Analysis Sheet** (Datoteka > Sačuvaj kao > Excel list sa analizom) i sačuvajte datoteku za izvoz.
4. Ispraznite Rotor-Gene Q MDx instrument i odložite trake sa epruvetama u skladu sa lokalnim bezbednosnim propisima.

Tumačenje rezultata

Kriterijumi za validaciju obrade i uzorka su navedeni u nastavku pod A i B. Odgovarajuće mere su navedene u slučaju da jedan (ili više) kriterijuma nije ispunjeno.

A. Kriterijumi za validaciju QIAscreen HPV PCR Test kontrola

Ciljne oblasti u QIAscreen Positive Control treba da daju C_T vrednosti koje su niže od 29 za β -globin, niže od 30 za HPV 16 i HPV 18 i niže od 32 za HPV drugo. Ako to nije slučaj, a podešavanja analize su ispravna, eksperiment treba ponoviti.

Nijedna ciljna oblast u QIAscreen Negative Control ne treba da daje signal iznad ograničenja do kraja obrade PCR (tj. ciklus 40 ili nedefinisano). Ako je signal vidljiv pre ciklusa 40, a podešavanja analize su ispravna, eksperiment treba ponoviti.

Napomena: Ako kontrole nisu u skladu sa ustanovljenim ograničenjima, a ponavljanje ne uključuje greške u tehnici, proverite sledeće stavke:

- Rok upotrebe na pakovanju reagensa
- Temperaturu reagenasa
- Podešavanja PCR sistema i softvera
- Kontaminaciju

Ako kontrole i dalje nisu validne, kontaktirajte korisnički servis prodavca ili lokalnog distributera.

B. Tumačenje rezultata uzorka

Rezultat za uzorak se određuje na sledeći način (Tabela 3).

Tabela 3. Tumačenje rezultata

	C_T vrednost HPV ciljna oblast(i)	C_T vrednost β-globin	Interpretacija
1	HPV 16 i/ili HPV 18 <36 i/ili HPV drugo <33,5	Bilo koja vrednost	HPV pozitivno
2	HPV 16 i HPV 18 ≥36 ili nije definisano i HPV drugo ≥33,5 ili nije definisano	≤30	HPV negativno
3	HPV 16 i HPV 18 ≥36 ili nije definisano i HPV drugo ≥33,5 ili nije definisano	>30	Nevažeće

1. HPV pozitivno. Kada je C_T vrednost(i) HPV 16 i/ili HPV 18 <36 i/ili drugog HPV <33,5 (bez obzira na C_T vrednost β-globina). Kanal pokazuje postojeći tip(ove). **2. HPV negativno.** Kada je C_T vrednost za β-globin ≤30 i C_T vrednosti za HPV 16 i HPV 18 ≥36 ili ne pokazuju signal i HPV drugo je ≥33,5 ili ne pokazuje signal. **3. Nevažeće.** Kada je C_T vrednost β-globina >30 i C_T vrednosti za HPV 16 i HPV 18 ≥36 ili ne pokazuju signal i drugi HPV je ≥33,5 ili ne pokazuje signal.

Ograničenja

- Za navedenu predviđenu upotrebu, test treba obavljati na uzorcima cervikalnih strugotina ili samoprikupljenim (cerviko)vaginalnim uzorcima. Ipak, QIAscreen HPV PCR Test je takođe procenjen za korišćenje sa DNK ekstrahovanom iz uzoraka biopsije fiksiranih formalinom i ukalupljenih parafinom (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).
- Prikupljanje, transport i čuvanje uzoraka može da utiče na broj kopija ciljnih oblasti u uzorku, što uzrokuje potencijalan lažno pozitivan ili lažno negativan rezultat.
- Ova uputstva se primenjuju samo na Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument.
- Loše performanse ekstrakcije DNK mogu dovesti do nevažjećih rezultata testa. Konsultujte lokalnog distributera ili korisnički servis proizvođača za tehnički savet o protokolu ekstrakcije DNK ako se ovo nastavi.
- Uzorci sa nepouzdanim rezultatima usled malog broja kopija ciljnih oblasti se mogu potvrditi ponovljenom analizom.
- U retkim slučajevima, cervikalne lezije mogu biti indukovane prirodnim HPV varijantama ili HPV tipovima koji nisu ciljani QIAscreen HPV PCR Test.
- QIAscreen HPV PCR Test reagensi se isključivo mogu koristiti za in vitro dijagnostiku.
- Korišćenje PCR testova zahteva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je namenjena za molekularnu biologiju i koja je u skladu sa važećim propisima i odgovarajućim standardima.
- Dostavljeni reagensi i uputstva za QIAscreen HPV PCR Test su potvrđeni za optimalne performanse.
- QIAscreen HPV PCR Test je predviđen za korišćenje od strane laboratorijskih profesionalaca obučeni za korišćenje Rotor-Gene Q MDx instrumenata.
- Proizvod je predviđen samo za korišćenje od strane osoblja koje je dobilo uputstva i koje je obučeno za real-time PCR tehnike i in vitro dijagnostičke procedure. Svi generisani dijagnostički rezultati se moraju tumačiti zajedno za drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

- Strogo postupanje u skladu sa Uputstvom za upotrebu (uputstvom) je potrebno za optimalne QIAscreen HPV PCR Test rezultate.
- Obratite pažnju na rokove trajanja koji su odštampani na kutiji i nalepnicama svih komponenti. Ne koristite komponente isteklog roka.
- Svi reagensi u okviru QIAscreen HPV PCR Test namenjeni su za upotrebu isključivo sa drugim reagensima koji se dostavljaju u istom kompletu. Ovo u suprotnom može uticati na performanse.
- Svaka nepredviđena upotreba ovog proizvoda i/ili izmena komponenti poništava pouzdanost Self-screen B.V.
- Odgovornost korisnika je potvrdi performanse sistema za sve procedure koje se koriste u njegovoj laboratoriji, a koje nisu pokriveno studijama performansi.

Karakteristike učinka

Ograničenje detekcije (Limit of Detection, LoD)

Ograničenje detekcije (Limit of Detection, LoD) je određeno pomoću g-blokova (tj. dvolančanih blokova genomske DNK) koji sadrže deo E7 genoma HPV genotipa. Serijske 3-slojne serije razblaživanja g-bloka preostalih 15 ciljanih HPV tipova (tj. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 i 68) su pripremljene u pozadini 50 ng ljudske DNK i analizirane 8 puta. Za β -globin, LoD je procenjen na serijskoj 3-slojnoj seriji razblaživanja g-bloka u vodi koji sadrži deo β -globin genoma koji je analiziran 8 puta.

Tabela 4. Ograničenje detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja QIAscreen HPV PCR Test 15 HPV tipova i β -globin genoma

Ciljna oblast	LoD (kopije po PCR)
HPV 16	206
HPV 18	69
HPV 39, 45	617
HPV 31, 33, 35, 51, 56, 59, 66, 67	1852
HPV 52, 58, 68	5556
β -globin	617

Analitička specifičnost*

Analitička specifičnost je određena za plazmidnu DNK neciljanih HPV genoma (tj. HPV 6, 11, 26, 40, 42, 43, 53, 61 i 70) pri koncentraciji od najmanje 46.000 kopija po testu i za 3 najpotencijalnija patogena vaginalna mikroorganizma *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Candida albicans* pri koncentraciji od najmanje 10.000 kopija po testu. Test nije pokazao nikakvu unakrsnu reaktivnost sa neciljanim HPV tipovima 6, 11, 26, 40, 42, 43, 53 i 61 ili mikroorganizmima. Samo za HPV 70 uočen je pozitivan signal na kanalu „HPV drugo“ (tj. kanal koji detektuje skup od 13 HPV tipova koji nisu 16 i 18), koji se nakon daljeg razblaživanja može detektovati na >17.000 kopija po testu. HPV 70 se smatra verovatno kancerogenim na osnovu epidemioloških, filogenetskih i funkcionalnih studija (11-13).

Klinički učinak na cervikalnim uzorcima (strugotinama)

Klinička osetljivost i specifičnost testa za cervikalnu intraepitelnu neoplaziju 2. stepena ili većeg (CIN 2+) u cervikalnim uzorcima (strugotinama) koji se čuvaju u medijumu za prikupljanje PreservCyt potvrđene su u dvema studijama analizom neinferiornosti u odnosu na visokorizični HPV GP5+/6+ PCR(10) ili Hybrid Capture 2 (14) u skladu sa međunarodnim smernicama za zahteve HPV testa za skrining cervikalnog kancera (9). Klinička osetljivost za CIN 2+ bila je 96,8% (61/63) odnosno 92,9% (91/98), a klinička osetljivost za CIN 2+ bila je 95,1% (783/823) odnosno 94,2% (933/990). Klinička osetljivost i specifičnost su bile neinferiorne u odnosu na referentno ispitivanje GP5+/6+ PCR (10) ili Hybrid Capture 2 (14), što pokazuje veoma dobar klinički učinak. Za žene sa ASC-US ili LSIL, vrednosti kliničke osetljivosti i specifičnosti za CIN2+ su bile 97,4% (37/38; 95% CI 83,5–99,6) i 59,8% (52/87; 95% CI: 49,2–69,5).(14)

* Karakteristike performansi su navedene za verziju testa ABI7500. Analiza ekvivalentnosti je pokazala slične performanse i validaciju za QIAScreen HPV PCR Test za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Reproduktivnost*

Reproduktivnost unutar laboratorije i međulaboratorijsko poklapanje testa su potvrđeni u skladu sa međunarodnim smernicama za zahteve HPV testa za skrining cervikalnog kancera (9). Reproductivnost unutar laboratorije na cervikalnim uzorcima (strugotinama) tokom vremena je bila 99,5% (544/547) sa kapa vrednošću od 0,99, a međulaboratorijsko poklapanje je bilo 99,2% (527/531) sa kapa vrednošću od 0,98, što pokazuje veoma dobro poklapanje (10).

Performanse na samoprikupljenim (cerviko)vaginalnim uzorcima*

Performanse testa u samoprikupljenim (cerviko)vaginalnim uzorcima su potvrđene za dve različite metode uzorkovanja: 1) samoprikupljeni uzorci dobijeni ispiranjem i 2) samoprikupljeni vaginalni uzorci dobijeni pomoću četkice. Za samoprikupljene uzorke ispiranjem, poklapanje sa referentnim ispitivanjem GP5+/6+ PCR je bilo 96,7% (59/61) sa CIN 2+ osetljivošću od 91,4% (21/23) (10). Za samoprikupljene vaginalne uzorke dobijene pomoću četkice, poklapanje sa referentnim testom GP5+/6+ PCR je bilo 92,9% (104/112) sa CIN 2+ osetljivošću od 93,9% (31/34) (10).

Ometajuće supstance*

Tragovi EDTA (0,5M), HCl (1N), silikagel (1 µl), krv (1 µl), urea (40 g/100 ml) i pufer za liziranje inhibirali su performanse testa. ETOH 96% (1 µl) i DMSO 4% (v/v) nisu imali inhibicioni efekat na performanse testa. Inhibicija se prati kontrolom uzorka (npr. ciljani β-globin).

* Karakteristike performansi su navedene za verziju testa ABI7500. Analiza ekvivalentnosti je pokazala slične performanse i validaciju za QIAscreen HPV PCR Test za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Reference

1. Walboomers, J.M., et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189 (1), 12.
2. Munoz, N., et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518.
3. Bosch, F.X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C.J., Shah, K.V. (2002) The casual relationship between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 55, 244.
4. Snijders, P.J., Steenbergen, R.D., Heideman, D.A., Meijer, C.J. (2006) HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J. Pathol.* 208(2), 152.
5. Vinokurova, S., et al. (2008) Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 68(1), 307.
6. Kraus, I., Driesch, C., Vinokurova, S., Hovig, E., Schneider, A., von Knebel, D.M., Durst, M. (2008) The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. *Cancer Res.* 68(7), 2514.
7. Horner, S.M., DeFilippis, R.A., Manuelidis, L., DiMaio, D. (2004) Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J. Virol.* 78, 4063.
8. Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., Hoppe-Seyler, F. (2003) siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 22(38), 5938.
9. Meijer, C.J., et al. (2009) Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int. J. Cancer* 124(3), 516.
10. Hesselink, A. et al. (2014) Clinical validation of the HPV-Risk assay: a novel, real-time PCR assay for the detection of high-risk human papillomavirus DNA by targeting the E7 region. *J. Clin. Microbiol.* 52, 890.

11. de Sanjose, S. et al. (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 11, 1048.
12. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012) Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 100(Pt B), 1.
13. Hiller, T., Poppelreuther, S., Stubenrauch, F., Iftner, T. (2006) Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 1262.
14. Polman, N. et al. (2017) Evaluation of the Clinical Performance of the HPV-Risk Assay Using the VALGENT-3 Panel. *J. Clin Microbiol.* 2017 Dec;55(12):3544-3551.
15. Heideman, D. et al. (2019) Clinical performance of the HPV-Risk assay on cervical samples in SurePath medium using the VALGENT-4 panel. *J Clin Virol.*;121:104201.

Vodič za rešavanje problema

Ovaj vodič za rešavanje problema može da bude koristan pri rešavanju svih problema do kojih može doći. Dodatne informacije potražite i na strani „Frequently Asked Questions“ (Često postavljana pitanja) našeg Centra za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naučnici tehničke službe kompanije QIAGEN uvek sa zadovoljstvom odgovaraju na svako pitanje koje možda imate u vezi sa informacijama i/ili protokolima iz ovog priručnika ili tehnologijama uzorkovanja i ispitivanja (za podatke o kontaktu posetite veb-stranicu www.qiagen.com).

Komentari i sugestije

Uzorak je označen kao nevažeći: amplifikacija β -globina je previše slaba ili je nema

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Greška pri korišćenju pipeta ili izostavljeni reagensi. Pogledajte „PCR na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete“ na strani 21 | Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite uzorak. |
| b) | Proverite eluat DNK | Ponovite ekstrakciju DNK. |

Pozitivna kontrola je označena kao nevažeća: amplifikacija je previše slaba ili je nema za jednu ili više ciljanih oblasti

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Greška pri korišćenju pipeta ili izostavljeni reagensi. Pogledajte „PCR na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete“ na strani 21 | Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite uzorak. |
| b) | Delimično razaranje | Sadržaj kompleta čuvajte na temperaturi od -15 do -30 °C. Izbegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje do maksimalno pet ciklusa. |
| c) | PCR reagensi delimično razgrađeni | Čuvajte sadržaj kompleta na temperaturi od -15 do -30 °C i čuvajte reakcione smeše zaštićene od svetlosti. Izbegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje. |
| d) | Inverzija trake sa epruvetama | Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. |
| e) | Rok upotrebe | Proverite rok upotrebe korišćenog kompleta. |
| f) | Vremensko odlaganje između pipetiranja uzoraka i početka obrade | PCR smeše se mogu čuvati 30 minuta između pipetiranja uzoraka u PCR i početka obrade u uređaju na temperaturi $2-8$ °C na tamnom. |

Komentari i sugestije

Nijedna kontrola matrice (No Template Control, NTC) nije nevažeća

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Greška pri korišćenju pipeta ili izostavljeni reagensi. Pogledajte „PCR na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete“ na strani 21 | Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite uzorak. |
|----|---|---|













Odsutni ili slabi signali u uzorku, ali je obrada kontrole u redu

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Inhibitorni efekti | Uvek proverite da li ima ostataka pufera tokom ekstrakcije DNK. Ponovite ekstrakciju DNK. |
| b) | Greška pri korišćenju pipeta. Pogledajte „PCR na Rotor-Gene Q MDx instrumentima sa rotorom za 72 epruvete“ na strani 21 | Proverite šemu pipetiranja i podešavanje reakcije. Ponovite PCR obradu. |

Ako se problem nastavi, kontaktirajte tehnički servis kompanije QIAGEN.

Simboli

Sledeći simboli mogu da se nalaze na pakovanju i oznakama:

Simbol	Definicija simbola
	Upotrebiti do
	Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku
	Simbol CE-IVD oznake
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala
	Komponente
	Sadrži
	Broj
Rn	„R“ označava reviziju Uputstva za upotrebu (uputstva), a „n“ je broj revizije
	Globalni broj trgovinske jedinice
	Temperaturno ograničenje
	Proizvođač

Simbol

Definicija simbola



Držite dalje od sunčeve svetlosti



Pogledajte uputstvo za upotrebu



Oprez

Kontakt informacije

Tehničku pomoć i više informacija potražite u našem Centru za tehničku podršku na adresi www.qiagen.com/Support, telefon 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od QIAGEN odeljenja za tehničku pomoć ili lokalnim dobavljačima (pogledajte poledinu ili posetite adresu www.qiagen.com).

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QIAscreen HPV PCR Test	Za 72 reakcije, uključuje: Master miks, pozitivnu kontrolu, negativnu kontrolu, Uputstvo za upotrebu	617005
QIASymphony SP	Modul za pripremu uzorka QIASymphony (opciono za ekstrakciju)	9001297
Rotor-Gene Q MDx		
Rotor-Gene Q MDx HRM System	Real-time PCR ciklusni uređaj i analizator topljenja visoke rezolucije sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, jarko crven) plus HRM kanal, laptop računar, softver, dodatni pribor: uključuje 1-godišnju garanciju za delove i rad, instalaciju i obuku	9002035
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR ciklusni uređaj i analizator topljenja visoke rezolucije sa 5 kanala (zeleni, žuti, narandžasti, crveni, jarko crven) plus HRM kanal, laptop računar, softver, dodatni pribor, sadrži 1-godišnju garanciju za delove i rad, instalacija i obuka nisu uključeni	9002032
Rotor-Gene Q MDx dodatni pribor		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminijumski stalak za epruvete za ručnu postavku reakcije sa pipetom od jednog kanala u epruvetama od 72 × 0,1 ml	9018901

Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 traka sa po 4 epruvete i poklopca za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 × 250 traka sa po 4 epruvete i poklopca za 10.000 reakcija	981106

Najnovije informacije o licenciranju i odricanjima od odgovornosti specifičnim za proizvod potražite u odgovarajućem priručniku za QIAGEN komplet ili korisničkom priručniku. Uputstva za komplet kompanije QIAGEN i korisnički priručnici dostupni su na adresi www.qiagen.com, a možete da ih zatražite i od tehničke službe kompanije QIAGEN ili svog lokalnog dobavljača.

Istorija revizija dokumenta

Datum	Promene
R2, avgust 2018.	Ažuriran je odeljak „Upozorenja i mere opreza“; CellSolutions® je dodato u odeljak „Čuvanje i rukovanje uzorcima“; revidiran je odeljak „Priprema uzorka“ za zamenu razlomaka sa procentima; ažuriran je protokol: QIAScreen HPV PCR Test za RGQ MDx; revidirana je kolona 3 u Tabeli 1 za protokol: QIAScreen HPV PCR Test za RGQ MDx; ažuriran je odeljak PCR na RGQ MDx sa rotorom za 72 epruvete za dodavanje važne napomene i promenu prozora „New experiment“ (Novi eksperiment) u „New Run“ (Nova obrada); ažuriran je odeljak „Karakteristike učinka“; korigovan je kataloški broj za QIAScreen HPV PCR Test; ažuriran je rasposed
R3, jun 2023.	Ažuriran odeljak o čuvanju uzoraka i njihovom rukovanju; ažuriran odeljak o pripremi uzoraka sa predtretmanom uzoraka koji se čuvaju u medijumu za prikupljanje SurePath i uputstva za ekstrakciju DNK pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Spin Kit i ekstrakciju DNK na QIASymphony instrumentu pomoću kompleta QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit; ažuriran je klinički učinak uzoraka koji se čuvaju u medijumu za prikupljanje SurePath i dodata je referenca za potvrdu uzoraka koji se čuvaju u medijumu za prikupljanje SurePath.

Ugovor o ograničenoj licenci za QIAScreen HPV PCR Test

Korišćenje ovog proizvoda označava da je kupac ili korisnik ovog proizvoda saglasan sa sledećim uslovima:

- Ovaj proizvod sme da se koristi samo u skladu sa protokolima navedenim uz proizvod i u ovom uputstvu i samo sa komponentama koje se nalaze u kompletu. QIAGEN ne odobrava licencu u okviru svoje intelektualne svojine za korišćenje ili kombinovanje isporučenih komponenti sa komponentama koje nisu deo ovog kompleta, osim kao što je opisano u protokolima navedenim uz proizvod, u ovom uputstvu i dodatnim protokolima dostupnim na adresi www.qiagen.com. Neke od ovih dodatnih protokola su obezbedili korisnici QIAGEN proizvoda za korisnike QIAGEN proizvoda. Kompanija QIAGEN nije detaljno testirala niti optimizovala te protokole. Kompanija QIAGEN ne daje garancije za njih niti tvrdi da oni ne krše prava nezavisnih proizvođača.
- Osim izričito navedenih licenci, QIAGEN ne garantuje da ovaj panel i/ili njegovo korišćenje ne krše prava nezavisnih proizvođača.
- Ovaj panel i njegove komponente su licencirani za jednokratnu upotrebu i ne smeju da se ponovo koriste, doraduju ili ponovo prodaju.
- Kompanija QIAGEN posebno se odriče svih drugih licenci, izričitih ili impliciranih, osim onih izričito navedenih.
- Kupac i korisnik ovog kompleta saglasni su da neće preduzeti i da neće drugim licima dozvoliti da preduzmu korake koji bi mogli da prouzrokuju ili omoguće bilo koje postupke zabranjene u tekstu iznad. QIAGEN može da primeni zabrane ovog Sporazuma o ograničenoj licenci na bilo kom sudu i povratice sve svoje istražne i sudske troškove, uključujući advokatske troškove, koji su u vezi sa primenom ovog Sporazuma o ograničenoj licenci ili prava na intelektualnu svojinu koja se odnose na panel i/ili njegove komponente.

Da biste videli ažurirane uslove licenciranja, posetite www.qiagen.com.

Zaštićeni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); PreservCyt® (Hologic, Inc.); CellSolutions®; Pathtezt® (Pathtezt); SurePath® (Becton Dickinson and Company). Registrovani nazivi, robne marke itd., koji se koriste u ovom dokumentu, čak iako nisu posebno naznačeni kao takvi, zaštićeni su zakonom.

Self-screen B.V. je zakonski proizvođač QIAScreen HPV PCR Test.

QIAScreen HPV PCR Test je proizveden za QIAGEN by Self-screen B.V.

1132289SR 06/2023 HB-2579-004 © 2023 QIAGEN, sva prava zadržana.

