

Czerwiec 2023 r.

# QIAscreen<sup>®</sup> HPV PCR Test — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)



Wersja 1



Do diagnostyki in vitro

Do stosowania z aparatem Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx



617005



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



1132289PL

Sample to Insight



# Spis treści

Przeznaczenie .....	4
Podsumowanie i objaśnienie .....	5
Zasada procedury .....	6
Materiały dostarczone w zestawie .....	7
Materiały wymagane, ale niedostarczane .....	8
Materiały eksploatacyjne, odczynniki i aparaty potrzebne do przygotowania próbek .....	8
Materiały eksploatacyjne do aparatu Rotor-Gene Q MDx .....	8
Wyposażenie .....	8
Sprzęt potrzebny do izolacji i przeprowadzenia reakcji real-time PCR .....	9
Ostrzeżenia i środki ostrożności .....	10
Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....	10
Ogólne środki ostrożności .....	10
Przechowywanie odczynników i sposób postępowania z odczynnikami .....	12
Przechowywanie próbek i sposób postępowania z próbkami .....	14
Przygotowanie próbek .....	16
Protokół: Test QIAscreen HPV PCR Test w aparacie Rotor-Gene Q MDx .....	19
Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki .....	21
Interpretacja wyników .....	25
Ograniczenia .....	27
Parametry skuteczności .....	29
Granica wykrywalności (Limit of Detection, LoD) .....	29

Swoistość analityczna .....	30
Skuteczność kliniczna w przypadku próbek z szyjki macicy (zeskrobin).....	30
Odtwarzalność* .....	31
Skuteczność testu przeprowadzonego na próbkach (szykowo-)pochwowych pobranych samodzielnie .....	31
Substancje zakłócające* .....	31
Literatura .....	32
Rozwiązywanie problemów .....	34
Symbole .....	36
Informacje kontaktowe.....	37
Informacje dotyczące zamawiania.....	38
Historia zmian dokumentu .....	40

# Przeznaczenie

Test QIAscreen HPV PCR Test to oznaczenie oparte na reakcji real-time PCR in vitro, które służy do jakościowego wykrywania DNA wirusa brodawczaka ludzkiego (Human papillomavirus, HPV) o następujących 15 genotypach (prawdopodobnie) wysokiego ryzyka: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 oraz 68.

Za pomocą testu QIAscreen HPV PCR Test można oznaczać próbki DNA wyizolowanego z materiałów pobranych w następujący sposób:

- próbki z szyjki macicy pobrane (przez lekarza) za pomocą szczoteczki/miotelki do wymazów cytologicznych;
- próbki wymazu z pochwy pobrane (samodzielnie) za pomocą szczoteczki cytologicznej lub irygatora.

## Wskazania dotyczące stosowania:

- jako test pierwszego rzutu wykonywany w ramach badań przesiewowych kobiet pod kątem ryzyka występowania stanów (przed)rakowych szyjki macicy w celu określenia konieczności skierowania na kolposkopię lub inne dalsze procedury;
- jako test kontrolny u kobiet, u których w badaniu cytologicznym stwierdzono obecność atypowych komórek nabłonka płaskiego o nieokreślonym znaczeniu (atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-US) lub małego stopnia zmian śródnabłonkowych w komórkach nabłonka płaskiego (low-grade squamous intra-epithelial neoplasia, LSIL) w celu określenia konieczności skierowania na kolposkopię lub inne dalsze procedury.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez wykwalifikowanych pracowników, takich jak technicy czy laboranci przeszkoleni w dziedzinie procedur diagnostyki in vitro, technik biologii molekularnej oraz obsługi systemu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## Podsumowanie i objaśnienie

Wirusy brodawczaka ludzkiego (Human papillomavirus, HPV) to niewielkie wirusy należące do rodziny papillomawirusów i posiadające dwuniciowy DNA. Kolisty genom składa się z około 7,9 tysiąca par zasad. Zidentyfikowano ponad 100 typów HPV, z których niektóre, określane jako wirusy HPV wysokiego ryzyka (ang. high-risk HPV, hrHPV), takie jak HPV 16 i 18, związane są z powstawaniem zmian błony śluzowej, co może prowadzić do rozwoju nowotworów złośliwych. Rak szyjki macicy i poprzedzające go zmiany chorobowe (śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy, ang. Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) to najbardziej znane powikłania przetrwałego zakażenia typem HPV wysokiego ryzyka (1–3).

Genom wirusa zawiera geny wczesne (Early, E) oraz późne (Late, L), które kodują białka niezbędne do odpowiednio wczesnych i późnych etapów cyklu replikacyjnego wirusa HPV. Produkty genów E6 i E7 wirusów hrHPV mają właściwości kancerogenne i są niezbędne do transformacji nowotworowej komórek gospodarza (4). Rozwój nowotworu złośliwego jest często związany z integracją genów wirusa z genomem komórki gospodarza (5). Integracja prowadzi do przerwania genomu wirusowego w regionie, który może rozciągać się od otwartej ramki odczytu E1 do L1 (6). Może to mieć wpływ na zachodzącą podczas reakcji PCR amplifikację wirusowego DNA w tych regionach. Inicjacja oraz utrzymanie zmienionego fenotypu wymaga ciągłej ekspresji wirusowych onkoprotein (7, 8), dlatego w raku szyjki macicy region E6/E7 wirusa jest zawsze utrzymywany w zintegrowanych genomach wirusowych (6). Test QIAscreen HPV PCR Test za miejsce docelowe wykorzystuje konserwatywny region genu E7. Oznaczenie zostało zatwierdzone klinicznie zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi w zakresie oznaczeń wykrywających wirusa HPV i na podstawie innych badań (9, 10, 14, 15).

## Zasada procedury

Test QIAscreen HPV PCR Test to oznaczenie oparte na multipleksowej reakcji real-time PCR ukierunkowanej na gen E7 15 typów wirusa HPV (prawdopodobnie) wysokiego ryzyka, w której do wykrycia co najmniej jednego gromadzącego się produktu reakcji PCR wykorzystywane są sondy fluorescencyjne. W trakcie każdego cyklu reakcji PCR sygnał fluorescencyjny rośnie w sposób logarytmiczny, w wyniku czego powstaje krzywa amplifikacji. Gdy tylko krzywa amplifikacji sekwencji docelowej przekroczy wartość progową, próbka jest uznawana za pozytywną dla danej sekwencji. Reakcja multipleksowa umożliwia jednoczesną detekcję czterech różnych barwników fluorescencyjnych w jednej reakcji, gdzie każdy barwnik fluorescencyjny służy do identyfikacji innej sekwencji docelowej. Te cztery różne sekwencje docelowe znajdują się w: **1.** HPV 16, **2.** HPV 18, **3.** puli 13 innych typów hrHPV oraz **4.** ludzkim genie  $\beta$ -globiny. Test QIAscreen HPV PCR Test umożliwia oddzielną detekcję HPV 16, HPV 18 oraz puli 13 innych genotypów hrHPV. Ludzki gen  $\beta$ -globiny jest wykorzystywany jako kontrola próbki w celu określenia jakości badanego DNA oraz obecności potencjalnych substancji hamujących.

# Materiały dostarczone w zestawie

## Zawartość zestawu

<b>QIAscreen HPV PCR Test Kit</b>		<b>72 reakcje</b>
<b>Nr katalogowy</b>		<b>617005</b>
QIAscreen Master Mix (Mieszanka Master Mix QIAscreen) (1 probówka)	Przezroczysta	1080 µl
QIAscreen Positive Control (Kontrola pozytywna QIAscreen) (1 probówka)	Przezroczysta	100 µl
QIAscreen Negative Control (Kontrola negatywna QIAscreen) (1 probówka)	Przezroczysta	100 µl
QIAscreen HPV PCR Test — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)		1

## Materiały wymagane, ale niedostarczane

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

## Materiały eksploatacyjne, odczynniki i aparaty potrzebne do przygotowania próbek

- Roztwór Hologic PreservCyt® Solution (do przechowywania próbek pobranych samodzielnie)
- Standardowe zestawy do izolacji DNA, takie jak QIAamp® DSP Virus Spin Kit (QIAGEN, nr kat. 61704) i QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit (QIAGEN, nr kat. 937055) oraz NucleoMag 96 Tissue (Macherey-Nagel, nr kat. 744300)
- Bufor PBS do próbek z szyjki macicy w podłożu do pobierania próbek PreservCyt
- Bufor AL (QIAGEN, nr kat. 19075) do wstępnego przygotowania próbek z szyjki macicy zebranych do podłoża do pobierania próbek SurePath i CellSolutions

## Materiały eksploatacyjne do aparatu Rotor-Gene Q MDx

- Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, do stosowania w rotorze 72-Well Rotor (QIAGEN, nr kat. 981103 lub 981106)

## Wyposażenie

- Pipety (z regulacją) \*przeznaczone do reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl)
- Jałowe, wolne od DNaz końcówki do pipet z filtrem, przeznaczone do reakcji PCR
- Rękawiczki jednorazowe
- Wirówka laboratoryjna\*
- Wytrząsarka\*

\* Upewnić się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.



## Sprzęt potrzebny do izolacji i przeprowadzenia reakcji real-time PCR

- Moduł QIAasymphony SP (nr kat. 9001297) (do opcjonalnej automatyzacji izolacji)
- System Rotor-Gene Q 5plex HRM System (nr kat. 9002033) lub aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (nr kat. 9002032) z oprogramowaniem Rotor-Gene Q w wersji 2.3.1 lub wyższej\*
- Szablon programu QIAscreen dla aparatu Rotor-Gene Q. Szablon jest nazwany „**QIAscreen RGQ profile v1.0.ret**”.
- Szablony analizy kanałów QIAscreen dla kanału zielonego (HPV 16), żółtego (inne typy HPV), pomarańczowego ( $\beta$ -globina) i czerwonego (HPV 18). Pliki szablonów są zapisane z rozszerzeniem „.qut”.

\* Jeśli dotyczy, aparat Rotor-Gene Q 5plex HRM wyprodukowany w styczniu 2010 r. lub później. Data produkcji jest zawarta w numerze seryjnym znajdującym się z tyłu aparatu. Numer jest zapisany w formacie „mmrrnnn”, gdzie „mm” oznacza miesiąc produkcji zapisany za pomocą cyfr, „rr” oznacza dwie ostatnie cyfry roku produkcji, a „nnn” — unikatowy identyfikator aparatu.

# Ostrzeżenia i środki ostrożności

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, rękawiczki jednorazowe i okulary ochronne. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Są one dostępne online w wygodnym i kompaktowym formacie PDF pod adresem [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN.

- Kontrole pozytywne i negatywne testu QIAscreen HPV PCR Test zawierają azydek sodu jako środek konserwujący (0,01%). Azydek sodu może wchodzić w reakcję z ołowianymi i miedzianymi elementami instalacji wodno-kanalizacyjnej i tworzyć wybuchowe azydki metali. Aby uniknąć gromadzenia się azydków, po wylaniu ich do zlewu należy przepłukać rury dużą ilością zimnej wody.

## Ogólne środki ostrożności

Podczas przeprowadzania testów PCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.

Zawsze należy mieć na uwadze poniższe zalecenia:

- Podczas pracy z próbkami należy nosić jednorazowe rękawiczki bezpydrowe, fartuch laboratoryjny i okulary ochronne.
- Należy chronić próbki i zestaw przed zanieczyszczeniami mikrobiologicznymi i nukleazami (DNazami). DNazy mogą spowodować rozkład matrycy DNA.
- Należy unikać zanieczyszczeń spowodowanych przeniesieniem DNA lub produktów PCR, które mogłyby powodować uzyskanie fałszywie pozytywnego sygnału.

- Zawsze należy używać jednorazowych końcówek do pipet wolnych od DNaz z barierami aerozolowymi.
- Odczynniki testu QIAscreen HPV PCR Test zostały rozcieńczone w optymalny sposób. Nie należy bardziej rozcieńczać odczynników, ponieważ może to skutkować utratą skuteczności.
- Wszystkie odczynniki dostarczone z testem QIAscreen HPV PCR Test są przeznaczone wyłącznie do stosowania z odczynnikami z tego samego zestawu. Nie należy zastępować odczynnika z jednego zestawu odczynnikiem z innego zestawu QIAscreen HPV PCR Test kit, nawet jeśli pochodzi on z tej samej partii, ponieważ może to wpływać na skuteczność.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury można znaleźć w instrukcji obsługi aparatu Rotor-Gene Q MDx.
- Przed wykonaniem pierwszego cyklu danego dnia należy wykonać program rozgrzewający aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM w temperaturze 95°C przez 10 minut.
- Zmiana czasów i temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub sprzecznych danych.
- Nie należy używać składników zestawu po upływie daty ważności lub w przypadku, gdy były niewłaściwie przechowywane.
- Czas ekspozycji składników na światło powinien być zminimalizowany: właściwości mieszanin reakcyjnych mogą ulec zmianie pod wpływem światła.
- Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia mieszanin syntetycznymi materiałami, które są zawarte w odczynnikach do reakcji PCR.
- Pozostałości próbek i odczynników należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

# Przechowywanie odczynników i sposób postępowania z odczynnikami

## Warunki transportu

Test QIAscreen HPV PCR Test jest transportowany na suchym lodzie. Jeśli którykolwiek składnik testu QIAscreen HPV PCR Test nie był zamrożony w chwili odbioru, opakowanie zewnętrzne zostało otwarte podczas transportu lub przesyłka nie zawiera listu przewozowego, instrukcji obsługi lub odczynników, należy skontaktować się z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem (informacje znajdują się na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Warunki przechowywania

Test QIAscreen HPV PCR Test musi zostać natychmiast po dostarczeniu umieszczony w zamrażarce o stałej temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  bez dostępu światła.

## Stabilność

Test QIAscreen HPV PCR Test zachowuje stabilność do upłynięcia terminu ważności podanego na etykiecie opakowania, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach.


Po otwarciu odczynniki można przechowywać w oryginalnych opakowaniach w temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ . Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania. Nie należy przekraczać 5 cykli zamrażania-rozmrażania.

- Przed otwarciem delikatnie wymieszać przez 10-krotne odwrócenie probówki i odwirować wszystkie probówki.
- Daty ważności dla każdego odczynnika są określone na etykietach poszczególnych składników. W prawidłowych warunkach przechowywania skuteczność produktu zostanie zachowana w okresie stabilności, jeżeli będą używane składniki pochodzące z tej samej partii.

- Procedury kontroli jakości firmy QIAGEN obejmują testowanie działania zestawów przed ich dopuszczeniem, wykonywane dla każdej serii zestawów. Nie należy mieszać odczynników z różnych zestawów, nawet jeśli pochodzą z tej samej serii.

Należy zwrócić uwagę na daty ważności oraz informacje o warunkach przechowywania wydrukowane na pudełkach i etykietach wszystkich składników. Nie należy używać składników z przekroczoną datą ważności ani niewłaściwie przechowywanych.

# Przechowywanie próbek i sposób postępowania z próbkami

<p><b>PRZESTROGA</b></p> 	<p>Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.</p>
--	--

## Próbki z szyjki macicy

Test QIAscreen HPV PCR Test należy przeprowadzać na próbkach genomowego DNA uzyskanego z próbek z szyjki macicy (zeskrobiny). Zatwierdzone podłoża do pobierania próbek z szyjki macicy (zeskrobin) to PreservCyt, CellSolutions®, Pathtest® i Surepath®. Optymalna temperatura przechowywania próbek klinicznych po dostarczeniu do laboratorium wynosi 2–8°C. W tych warunkach przechowywania próbki w podłożu do pobierania próbek PreservCyt są stabilne przez 3 miesiące, a w podłożu do pobierania próbek Surepath przez 2 tygodnie przed izolacją DNA.

Próbki z szyjki macicy zebrane do podłoża PreservCyt można przechowywać przez maksymalnie 210 dni od momentu pobrania w temperaturze 18–25°C, maksymalnie dwa i pół roku w temperaturze 2–8°C oraz maksymalnie 2 lata w temperaturze <20°C. Próbki z szyjki macicy zebrane do podłoża Surepath można przechowywać przez maksymalnie 10 tygodni od momentu pobrania w temperaturze 2–30°C, maksymalnie dwa i pół roku w temperaturze 2–8°C oraz maksymalnie 210 dni w temperaturze <20°C.

## Próbki wymazu z pochwy pobrane samodzielnie szczoteczką cytologiczną

Test QIAscreen HPV PCR Test należy przeprowadzać z użyciem genomowego DNA wyizolowanego z próbek pobranych samodzielnie szczoteczką cytologiczną oraz z próbek pobranych samodzielnie poprzez irygację szyjkowo-pochwową. Próbki wymazu z pochwy pobrane samodzielnie szczoteczką cytologiczną po pobraniu należy transportować na sucho lub w roztworze soli fizjologicznej (NaCl o stężeniu masowym 0,9%), natomiast po dostarczeniu do laboratorium przechowywać w podłożu PreservCyt. Próbki pobrane samodzielnie poprzez irygację szyjkowo-pochwową po pobraniu należy transportować w roztworze soli fizjologicznej (NaCl o stężeniu masowym 0,9%), natomiast po dostarczeniu do laboratorium przechowywać w podłożu PreservCyt. Próbki pobrane samodzielnie w podłożu PreservCyt można przechowywać maksymalnie 210 dni od momentu pobrania w temperaturze 18–25°C, maksymalnie dwa i pół roku w temperaturze 2–8°C oraz maksymalnie 2 lata w temperaturze <20°C.

## Próbki genomowego DNA

Po izolacji genomowy DNA może być przechowywany w temperaturze 2–8°C przez krótki okres ( $\leq 2$  dni) lub w temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  przez maksymalnie 12 miesięcy.

# Przygotowanie próbki

## Izolacja DNA

Standardowe zestawy do izolacji DNA (np. zestawy z kolumnami i kulkami magnetycznymi, takie jak QIAamp® DSP Virus Spin Kit, QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit oraz NucleoMag 96 Tissue, (Macherey-Nagel)) są zgodne z tym oznaczeniem. Szczegółowe informacje dotyczące korzystania z zestawu QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit przedstawiono poniżej.

## Próbki kliniczne w podłożu do pobierania próbek PreservCyt lub PathTezt

W przypadku próbek (zeskrobin) z szyjki macicy zawieszonych w podłożu do pobierania próbek PreservCyt lub PathTezt frakcja DNA użyta do reakcji PCR stanowi 0,125% z 20 ml próbki zeskrebin z kanału szyjki macicy w podłożu PreservCyt lub PathTezt. Odpowiada to 25 µl pierwotnego typu próbki. Jako matrycy do reakcji PCR można użyć tylko 5 µl wyizolowanego DNA, dlatego należy zmodyfikować protokół izolacji DNA, tak aby 5 µl wyizolowanego DNA opowiadało 25 µl próbki z szyjki macicy (zeskrobin), co zagwarantuje, że do reakcji PCR wykorzystana zostanie właściwa frakcja próbki z szyjki macicy. Równoważnościowe podłoża z dodatkiem (np. Surepath) lub bez dodatku (np. PreservCyt) formaldehydu należy wykorzystywać w podobny sposób.

**Ważne:** Podłoże PreservCyt może zakłócać proces izolacji DNA. Problem ten można rozwiązać na dwa sposoby.

1. Przed rozpoczęciem izolacji DNA rozcieńczyć porcję próbki w podłożu PreservCyt w równej objętości buforu PBS lub buforu do lizy z zestawu do izolacji DNA i wymieszać. Upewnić się, że całkowita objętość próbki jest właściwa dla danego zestawu do izolacji DNA. Jeśli całkowita objętość jest zbyt duża dla danego zestawu do izolacji, zaleca się zastosowanie 2. metody opisanej poniżej.



2. Odwirować próbkę w podłożu PreservCyt ( $\geq 3400 \times g$  przez 10 min) i usunąć supernatant. Osad będzie ponownie zawieszony w odpowiedniej objętości buforu PBS lub buforu do lizy właściwego dla danego zestawu do izolacji DNA (w przypadku zestawu QIAamp DSP Virus Spin Kit: zawiesić w 200  $\mu$ l buforu PBS i postępować zgodnie z instrukcjami producenta w zakresie izolacji DNA, przeprowadzić elucję w 100  $\mu$ l; w przypadku zestawu Nagel NucleoMag96 Tissue: zawiesić w 100  $\mu$ l buforu T1 z zestawu i postępować zgodnie z instrukcjami producenta, przeprowadzić elucję w 100  $\mu$ l).

Równoważne podłoże należy przetwarzać w podobny sposób.

## Szczegółowe informacje dotyczące korzystania z zestawu QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit

Protokół QSDSP: 500  $\mu$ l próbki z szyjki macicy w podłożu PreservCyt zostaje zmieszane z 500  $\mu$ l buforu PBS. Cykl zintegrowany zgodny z protokołem Complex800\_V6\_DSP zostaje uruchomiony w aparacie QIASymphony po wykonaniu kroków opisanych w dokumencie „Zbiornicza instrukcja obsługi aparatów QIASymphony® SP/AS — 12.3, cykl zintegrowany”. Następuje elucja DNA w 60  $\mu$ l, a 5  $\mu$ l zostaje użyte do testu QIAScreen HPV PCR Test. W przypadku korzystania wyłącznie z modułu QIASymphony SP cykl przygotowania próbki z wykorzystaniem protokołu Complex800\_V6\_DSP jest wykonywany w aparacie QIASymphony SP. Należy postępować zgodnie z krokami opisanymi w dokumencie „QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit — Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi) — Ogólny protokół oczyszczania”.

W przypadku próbek (zeskrobin) z szyjki macicy zawieszonych w podłożu do pobierania próbek SurePath lub CellSolutions frakcja DNA użyta do reakcji PCR stanowi 0,25% z 10 ml próbki zeskrebin z kanału szyjki macicy w podłożu SurePath lub CellSolutions. Odpowiada to 25  $\mu$ l pierwotnej próbki. Jako matrycy do reakcji PCR można użyć tylko 5  $\mu$ l wyizolowanego DNA, dlatego należy zastosować taką objętość próbki i objętość elucji DNA, aby 5  $\mu$ l wyizolowanego DNA opowiadało 25  $\mu$ l próbki z szyjki macicy (zeskrebin), co zagwarantuje, że do reakcji PCR wykorzystana zostanie właściwa frakcja próbki z szyjki macicy.

**WAŻNE:** Przed użyciem próbek klinicznych zebranych do podłoża SurePath i CellSolutions należy poddać je przygotowaniu wstępnemu, aby odwrócić proces sieciowania powodowany przez formaldehyd, stosując niżej opisany protokół.

### Przygotowanie wstępne próbek klinicznych zebranych do podłoża SurePath i CellSolutions:

3. Dokładnie wymieszać próbkę w podłożu SurePath lub CellSolutions z buforem AL (QIAGEN) w proporcjach 1:1.
4. Inkubować w temperaturze 90°C przez 20 minut, po czym doprowadzić do temperatury pokojowej przed przejściem do procesu izolacji DNA.

Równoważne podłoże zawierające formaldehyd powinno być przetwarzane w podobny sposób.

W przypadku próbek wymazu z pochwy pobranych samodzielnie szczoteczką cytologiczną, zawieszonych w roztworze Hologic PreservCyt Solution, należy zmodyfikować protokół izolacji DNA, tak aby 5 µl wyizolowanego DNA stanowiącego matrycę dla reakcji PCR odpowiadało 0,5% próbki wymazu z pochwy. Przykładowo jeśli samodzielnie pobrana próbka wymazu z pochwy zostanie zawieszona w 2 ml roztworu PreservCyt Solution, to 5 µl matrycy DNA odpowiada 10 µl zawiesiny samodzielnie pobranej próbki.

W przypadku próbek pobranych samodzielnie poprzez irygację szyjkowo-pochwową frakcja DNA stanowiąca matrycę do reakcji PCR odpowiada 0,5% próbki pobranej samodzielnie poprzez irygację. Dlatego jeśli objętość całkowita po irygacji wynosi 3 ml, protokół izolacji DNA należy zmodyfikować tak, aby 5 µl matrycy DNA odpowiadało 15 µl pierwotnej próbki pobranej samodzielnie poprzez irygację.

# Protokół: Test QIAscreen HPV PCR Test w aparacie Rotor-Gene Q MDx

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

Przed rozpoczęciem protokołu należy zapoznać się z obsługą aparatu Rotor-Gene Q MDx. Należy zapoznać się z instrukcją obsługi aparatu.

Przed wykonaniem pierwszego cyklu danego dnia należy wykonać program rozgrzewający aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM w temperaturze 95°C przez 10 minut.

Do przeprowadzenia testu wymagany jest szablon z oprogramowania z serii Rotor-Gene Q. Należy się upewnić, że wykorzystywany jest szablon QIAscreen RGQ profile v1.0.ret.

Do analizowania testu dla każdego z czterech kanałów detekcji wymagany jest szablon z oprogramowania z serii Rotor-Gene Q. Należy się upewnić, że dla każdego kanału wykorzystywany jest odpowiedni szablon, jak przedstawiono poniżej:

- Szablону „QIAscreen RGQ Green Channel analysis template.qut” należy użyć do analizy sygnału z kanału zielonego (HPV 16).
- Szablону „QIAscreen RGQ Orange Channel analysis template.qut” należy użyć do analizy sygnału z kanału pomarańczowego ( $\beta$ -globina).
- Szablону „QIAscreen RGQ Yellow Channel analysis template.qut” należy użyć do analizy sygnału z kanału żółtego (inne typy HPV).
- Szablonu „QIAscreen RGQ Red Channel analysis template.qut” należy użyć do analizy sygnału z kanału czerwonego (HPV 18).

## Przetwarzanie próbek w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 próbki

W czasie jednego eksperymentu, poza pozytywną i negatywną kontrolą, można zbadać maksymalnie 70 próbek genomowego DNA. Na schemacie przedstawionym w Tabeli 1 pokazano przykład rozkładu próbek w bloku ładowania lub rotorze dla eksperymentu z wykorzystaniem testu QIAscreen HPV PCR Test. Liczby oznaczają pozycje w bloku ładowania i wskazują końcową pozycję rotora.

**Tabela 1. Ustawienia płytki i rotora dla eksperymentów z wykorzystaniem testu QIAscreen HPV PCR Test w aparacie Rotor-Gene Q MDx**

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

**Uwaga:** We wszystkich niewykorzystanych pozycjach należy umieścić puste próbki.

## Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki

### 1. Przygotować test QIAscreen HPV PCR Test.

**Uwaga:** Aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia reakcji PCR, stanowczo zaleca się wykorzystanie komory do PCR z możliwością włączenia lampy UV.

**Ważne:** Mieszaninę QIAscreen Master Mix należy rozdzielać do probówek w miejscu oddzielnym od obszaru, w którym przeprowadzana jest izolacja DNA.

- 1a. Przed użyciem należy przemyć roztworem degradującym DNA stół roboczy, pipety i statyw na probówki, aby uniknąć zanieczyszczenia matrycą lub nukleazami.

**Uwaga:** Należy zmieniać końcówkę pipety przy każdej probówce, aby uniknąć przeniesienia zanieczyszczeń w postaci niespecyficznej matrycy lub mieszaniny reakcyjnej, co mogłoby prowadzić do otrzymania fałszywie pozytywnych wyników.

- 1b. Przed użyciem delikatnie wymieszać przez 10-krotne odwrócenie probówki i krótko odwirować, aby pobrać roztwór z dna probówki.
- 1c. Rozdzielić po 15 µl mieszaniny QIAscreen Master Mix do odpowiednich probówek i probówek w paskach (maksymalnie 72 probówki na jeden program aparatu Rotor-Gene Q MDx). Reakcję można przygotowywać w temperaturze pokojowej.
- 1d. Mieszaninę QIAscreen Master Mix należy ponownie umieścić w zamrażalniku, aby uniknąć degradacji składników. Probówki należy przenieść w inne miejsce i tam dodać kontrolę QIAscreen Positive Control oraz próbki DNA.
- 1e. Dodać 5 µl kontroli negatywnej do probówki w pozycji 2, wymieszać przez pipetowanie w górę i dół lub potrząsanie probówką, a następnie zamknąć probówkę przez naciśnięcie zatyczki probówki.
- 1f. Dodać 5 µl kontroli QIAscreen Positive Control do probówki w pozycji 1, wymieszać przez pipetowanie w górę i dół lub potrząsanie probówką, a następnie zamknąć probówkę.

**Uwaga:** Należy zmieniać końcówkę pipety przy każdej próbówce, aby uniknąć przeniesienia zanieczyszczeń w postaci niespecyficznego matrycy lub mieszaniny reakcyjnej, co mogłoby prowadzić do otrzymania fałszywie pozytywnych wyników.

1g. Dodać po 5 µl próbki DNA do odpowiednich probówek zawierających mieszaninę QIAscreen Master Mix, wymieszać przez pipetowanie w górę i w dół lub potrząsanie probówką, a następnie zamknąć probówkę przez naciśnięcie zatyczki probówki.

1h. Po napełnieniu zestawu 4 probówek należy zamknąć probówki.

**Uwaga:** Probówki do reakcji PCR mogą być przechowywane w temperaturze 2-8°C, w ciemności, do 30 minut od czasu pipetowania próbek do probówek do reakcji PCR do momentu rozpoczęcia eksperymentu w aparacie.

2. Należy przygotować aparat Rotor-Gene Q MDx i rozpocząć eksperyment w następujący sposób:

**Ważne:** Przed wykonaniem pierwszego cyklu danego dnia należy wykonać program rozgrzewający aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM w temperaturze 95°C przez 10 minut.

2a. Umieścić 72-dółkowy rotor w uchwycie na rotor.

2b. Załadować paski probówek do rotora zgodnie z przypisanymi pozycjami, zaczynając od pozycji 1, jak pokazano w Tabeli 1, a w niewykorzystanych dołkach umieścić puste, zamknięte probówki w paskach.

**Uwaga:** Należy upewnić się, że pierwsza probówka została umieszczona w pozycji 1, a probówki w paskach są umieszczone w prawidłowej orientacji i prawidłowych pozycjach, tak jak przedstawia to Tabela 1.

2c. Zamocować pierścień blokujący.

2d. Załadować rotor z pierścieniem blokującym do aparatu Rotor-Gene Q MDx, a następnie zamknąć pokrywę aparatu.

2e. Przejść do okna **New Run** (Nowy program) i kliknąć opcję **Open a template in another folder...** (Otwórz szablon w innym folderze...).

2f. Wybrać szablon QIAscreen run template (Szablon programu QIAscreen) o nazwie **QIAscreen RGQ profile v1.0.ret**.

- 2g. Wybrać opcję Rotor type (Typ rotora): **72-well rotor** (Rotor 72-dółkowy) oraz **Locking ring attached** (Pierścień blokujący przymocowany) i kliknąć przycisk **Next** (Dalej).
- 2h. W polu Operator wpisać inicjały i kliknąć przycisk **Next** (Dalej).
- 2i. W następnym oknie kliknąć przycisk **Next** (Dalej).
- 2j. Kliknąć przycisk **Start run** (Rozpocznij program).  
Aby wprowadzić nazwy próbek, należy kliknąć opcję **Edit samples** (Edytuj próbki) (można to także zrobić po zakończeniu programu).

**Tabela 2. Ustawienia kanałów i sekwencji docelowych\***

Sekwencja docelowa	Kanał detekcji
β-globina	Orange
HPV 16	Green
HPV 18	Red
Inne typy HPV*	Yellow

\* Inne typy HPV odnoszą się do puli 13 typów HPV innych niż HPV 16/18.

- 3. Przeanalizować dane.
  - 3a. Wybrać próbki, które będą używane do analizy.
  - 3b. Przejść do okna **Analysis tool** (Narzędzie do analizy), wybrać opcję **Cycling A. Green** i kliknąć przycisk **Show** (Pokaż). W obszarze **Imported Settings** (Ustawienia importu) (prawy dolny róg okna) kliknąć opcję **Import** (Importuj) i wybrać plik **QIAScreen RGQ Green Channel analysis template.qut**. Wybrać opcję **Cycling A. Green** i kliknąć przycisk **Hide** (Ukryj).
  - 3c. Wybrać opcję **Cycling A. Orange** i kliknąć przycisk **Show** (Pokaż). W obszarze **Imported Settings** (Ustawienia importu) kliknąć opcję **Import** (Importuj) i wybrać plik **QIAScreen RGQ Orange Channel analysis template.qut**. Wybrać opcję **Cycling A. Orange** i kliknąć przycisk **Hide** (Ukryj).

- 3d. Wybrać opcję **Cycling A. Red** i kliknąć przycisk **Show** (Pokaż). W obszarze **Imported Settings** (Ustawienia importu) kliknąć opcję **Import** (Importuj) i wybrać plik **QIAscreen RGQ Red Channel analysis template.qut**. Wybrać opcję **Cycling A. Red** i kliknąć przycisk **Hide** (Ukryj).
  - 3e. Wybrać opcję **Cycling A. Yellow** i kliknąć przycisk **Show** (Pokaż). W obszarze **Imported Settings** (Ustawienia importu) kliknąć opcję **Import** (Importuj) i wybrać plik **QIAscreen RGQ Yellow Channel analysis template.qut**.
  - 3f. Kliknąć przycisk **Save** (Zapisz).
  - 3g. OPCJONALNIE: W celu interpretacji wyników dane można wyeksportować w formacie pliku .csv. Przejść do opcji **File > Save as > Excel Analysis Sheet** (Plik > Zapisz jako > Arkusz Excel do analizy) i zapisać eksportowany plik.
4. Rozładować aparat Rotor-Gene Q MDx i usunąć próbówki w paskach zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.



# Interpretacja wyników

Kryteria walidacji programu i próbek przedstawiono poniżej, odpowiednio w punktach A i B. W przypadku niespełnienia jednego (lub więcej) kryteriów wskazano odpowiednie środki.

## A. Kryteria walidacji kontroli testu QIAscreen HPV PCR Test

Wartości  $C_T$  dla sekwencji docelowych w kontroli QIAscreen Positive Control powinny być mniejsze niż 29 dla  $\beta$ -globiny, mniejsze niż 30 dla HPV 16 i HPV 18 i mniejsze niż 32 dla innych typów HPV. Jeśli otrzymane wyniki są inne, a ustawienia analizy są prawidłowe, należy powtórzyć eksperyment.

Żadna z sekwencji docelowych w kontroli QIAscreen Negative Control nie powinna emitować sygnału powyżej ustalonego progu do końca trwania programu PCR (tj. do cyklu 40 lub nieokreślonego). Jeśli zaobserwowano sygnał przed 40 cyklem, a ustawienia analizy są prawidłowe, należy powtórzyć eksperyment.

**Uwaga:** Jeżeli kontrole nie mieszczą się w określonych limitach, a powtórzenia wykluczają błędy w technice, należy sprawdzić następujące pozycje:

- Datę ważności na opakowaniu odczynników
- Temperaturę odczynników
- Ustawienia systemu PCR i oprogramowania
- Zanieczyszczenia

Jeżeli kontrole wciąż są niezgodne, należy skontaktować się z działem obsługi klienta producenta lub z lokalnym dystrybutorem.

## B. Interpretacja wyników próbek

Wynik próbki określa się w następujący sposób (Tabela 3).

Tabela 3. Interpretacja wyników

	Wartość C <sub>T</sub> dla sekwencji docelowych HPV	Wartość C <sub>T</sub> dla β-globiny	Interpretacja
1	Dla HPV 16 i/lub HPV 18 <36 i/lub dla innych typów HPV <33,5	Dowolna	Wynik dla HPV pozytywny
2	Dla HPV 16 i HPV 18 ≥36 lub nieokreślona i dla innych typów HPV ≥33,5 lub nieokreślona	≤30	Wynik dla HPV negatywny
3	Dla HPV 16 i HPV 18 ≥36 lub nieokreślona i dla innych typów HPV ≥33,5 lub nieokreślona	>30	Wynik nieważny

**1. Wynik dla HPV pozytywny.** Gdy wartości C<sub>T</sub> dla HPV 16 i/lub HPV 18 wynoszą <36 i/lub dla innych typów HPV wynoszą <33,5 (bez względu na wartość C<sub>T</sub> dla β-globiny). Kanał wskazuje które typy są obecne. **2. Wynik dla HPV negatywny.** Gdy wartość C<sub>T</sub> dla β-globiny wynosi ≤30 oraz wartości C<sub>T</sub> dla HPV 16 i HPV 18 wynoszą ≥36 lub brak jest sygnału, a dla innych typów HPV wynoszą ≥33,5 lub brak jest sygnału. **3. Wynik nieważny.** Gdy wartość C<sub>T</sub> dla β-globiny wynosi >30 oraz wartości C<sub>T</sub> dla HPV 16 i HPV 18 wynoszą ≥36 lub brak jest sygnału, a dla innych typów HPV wynoszą ≥33,5 lub brak jest sygnału.

## Ograniczenia

- Dla wskazanego przewidzianego zastosowania test należy wykonywać na próbkach zeszkrobionych z kanału szyjki macicy lub samodzielnie pobranych próbkach (szyjkowo-) pochwowych. Jednakże test QIAscreen HPV PCR Test został także oceniony pod kątem wykorzystania DNA wyizolowanego z próbek z biopsji utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).
- Sposób pobierania, transportu i przechowywania może wpływać na liczbę kopii sekwencji docelowej w próbce i spowodować otrzymanie wyniku fałszywie pozytywnego lub fałszywie negatywnego.
- Te instrukcje odnoszą się wyłącznie do aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Niedokładne przeprowadzenie izolacji DNA może skutkować otrzymaniem nieważnych wyników testu. W takim wypadku należy skontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub działem obsługi klienta producenta w celu otrzymania technicznych porad dotyczących protokołu izolacji DNA.
- Niejednoznaczne wyniki dla próbek z niską liczbą kopii sekwencji docelowych mogą zostać potwierdzone poprzez powtórny analizę.
- W rzadkich przypadkach zmiany chorobowe szyjki macicy mogą powstawać wskutek naturalnych wariantów HPV lub typów HPV, które nie są wykrywane za pomocą testu QIAscreen HPV PCR Test.
- Wszystkie odczynniki używane do testu QIAscreen HPV PCR Test są przeznaczone wyłącznie do diagnostyki in vitro.
- Podczas przeprowadzania testów PCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami.
- Odczynniki i instrukcje dostarczone z testem QIAscreen HPV PCR Test zostały zwalidowane w celu zapewnienia optymalnej skuteczności.
- Test QIAscreen HPV PCR Test jest przeznaczony do użycia przez personel laboratorium przeszkolony w zakresie używania aparatów Rotor-Gene Q MDx.

- Z produktu może korzystać jedynie personel odpowiednio poinstruowany i przeszkolony w zakresie techniki real-time PCR i procedur diagnostycznych in vitro. Wszelkie uzyskane wyniki diagnostyczne należy interpretować wraz z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.
- W celu uzyskania optymalnych wyników testu QIAscreen HPV PCR Test należy ściśle przestrzegać Instrukcji użycia (instrukcji obsługi).
- Należy zwracać uwagę na daty przydatności wydrukowane na pudełku i etykietach wszystkich składników zestawu. Nie używać przeterminowanych składników.
- Wszystkie odczynniki dostarczone z testem QIAscreen HPV PCR Test są przeznaczone wyłącznie do stosowania z odczynnikiem z tego samego zestawu. W przeciwnym wypadku może dojść do obniżenia skuteczności.
- Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy Self-screen B.V.
- Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami skuteczności.

# Parametry skuteczności

## Granica wykrywalności (Limit of Detection, LoD)

Granice wykrywalności (Limit of Detection, LoD) określono za pomocą bloków gBlock (tj. bloków dwuniciowego genomowego DNA) zawierających część genu E7 z genotypu wirusa HPV. Przygotowano serie trzykrotnych rozcieńczeń bloków gBlock dla 15 docelowych typów wirusa HPV (tj. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 i 68) w obecności 50 ng ludzkiego DNA i przeanalizowano w ośmiu powtórzeniach. W przypadku  $\beta$ -globiny wartość LoD oceniono na podstawie serii trzykrotnych rozcieńczeń bloków gBlock zawierających część genu  $\beta$ -globiny przygotowanych w wodzie i przeanalizowano w ośmiu powtórzeniach.

**Tabela 4. Granica wykrywalności (Limit of Detection, LoD) testu QIAscreen HPV PCR Test dla 15 typów wirusa HPV i genu  $\beta$ -globiny**

Sekwencja docelowa	LoD (l. kopii na reakcję 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
$\beta$ -globina	617

## Swoistość analityczna\*

Swoistość analityczna została określona z wykorzystaniem fragmentów DNA plazmidowego zawierających sekwencje genomów HPV niebędące sekwencjami docelowymi (tj. HPV 6, 11, 26, 40, 42, 43, 53, 61 i 70) w stężeniu co najmniej 46 000 kopii/test oraz 3 potencjalnie najbardziej patogennych mikroorganizmów pochwy: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Candida albicans* w stężeniu co najmniej 10 000 kopii/test. Test nie wykazał reaktywności krzyżowej z typami HPV niezawierającymi sekwencji docelowych (6, 11, 26, 40, 42, 43, 53 i 61) ani z mikroorganizmami. Pozytywny sygnał zaobserwowano wyłącznie dla HPV 70 w kanale innych typów HPV (tj. w kanale, w którym wykrywana jest pula 13 typów HPV innych niż HPV 16/18), który po dalszym rozcieńczeniu był wykrywany przy >17 000 kopii/test. Na podstawie badań epidemiologicznych, filogenetycznych i czynnościowych uznano wirus HPV 70 za potencjalnie nowotworowy (11–13).

## Skuteczność kliniczna w przypadku próbek z szyjki macicy (zeskrobin)

Kliniczna czułość i swoistość testu na próbkach (zeskrobinach) z szyjki macicy ze śródnamionkową neoplazją szyjki macicy stopnia 2 lub wyższego (Cervical Intraepithelial Neoplasia 2+, CIN 2+) zebranych w podłożu PreservCyt została zwalidowana w dwóch różnych badaniach za pomocą analizy równoważności względem testu wykrywającego wirusa HPV wysokiego ryzyka wykonywanego techniką GP5+/6+ PCR(10) lub Hybrid Capture 2 (14) zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi dotyczącymi wymagań dla testów na obecność wirusa HPV przeprowadzanych podczas badań przesiewowych pod kątem raka szyjki macicy (9). Czulość kliniczna w przypadku CIN 2+ wynosiła kolejno 96,8% (61/63) i 92,9% (91/98), a swoistość kliniczna w przypadku CIN 2+ kolejno 95,1% (783/823) i 94,2% (933/990). Kliniczna czułość i swoistość były równoważne tym w oznaczeniu referencyjnym wykonywanym techniką GP5+/6+ PCR (10) lub Hybrid Capture 2 (14), co wskazuje na bardzo dobrą skuteczność kliniczną. W przypadku kobiet, u których stwierdzono komórki ASC-US lub LSIL, wartości klinicznej czułości i swoistości dla próbek CIN2+ wyniosły odpowiednio 97,4% (37/38; 95-procentowy CI: 83,5–99,6) i 59,8% (52/87; 95-procentowy CI: 49,2–69,5).(14)

\* Parametry skuteczności testu dotyczą wersji ABI7500. Równoważna analiza wykazała zbliżoną skuteczność i walidację testu QIAScreen HPV PCR Test w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## Odtwarzalność\*

Wewnątrzlaboratoryjna odtwarzalność i międzylaboratoryjna zgodność testu zostały zwalidowane zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi w zakresie wymagań dotyczących testów na obecność wirusa HPV przeprowadzanych podczas badań przesiewowych pod kątem raka szyjki macicy (9). Wewnątrzlaboratoryjna odtwarzalność badań na próbkach z szyjki macicy (zeskrobinach) w czasie wyniosła 99,5% (544/547) z wartością kappa 0,99, a międzylaboratoryjna zgodność wyniosła 99,2% (527/531) z wartością kappa 0,98, co wskazuje na bardzo dobrą zgodność (10).

## Skuteczność testu przeprowadzonego na próbkach (szyjkowo-)pochwowych pobranych samodzielnie\*

Skuteczność testu przeprowadzonego na próbkach (szyjkowo-)pochwowych pobranych samodzielnie została zwalidowana dla dwóch różnych metod pobierania próbek: 1) próbki pobrane samodzielnie za pomocą irygacji oraz 2) próbki pobrane samodzielnie szczoteczką. Dla próbek pobranych samodzielnie za pomocą irygacji zgodność z oznaczeniem referencyjnym wykonywanym techniką GP5+/6+ PCR wyniosła 96,7% (59/61) z czułością CIN 2+ wynoszącą 91,4% (21/23) (10). Dla próbek pobranych samodzielnie szczoteczką zgodność z testem referencyjnym wykonywanym techniką GP5+/6+ PCR wyniosła 92,9% (104/112) z czułością CIN 2+ wynoszącą 93,9% (31/34) (10).

## Substancje zakłócające\*

Śladowe ilości EDTA (0,5 M), HCl (1 N), kulek krzemionkowych (1 µl), krwi (1 µl), mocznika (40 g/100 ml) i buforu do lizy obniżają skuteczność testu. Etanol 96% (1 µl) i DMSO 4% (o/o) nie wykazały efektu hamującego wpływającego na skuteczność testu. Efekt hamujący monitorowano z użyciem próbki kontrolnej (np. sekwencji docelowej β-globiny).

\* Parametry skuteczności testu dotyczą wersji ABI7500. Równoważna analiza wykazała zbliżoną skuteczność i walidację testu QIAscreen HPV PCR Test w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

# Literatura

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.

# Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji dotycząca rozwiązywania problemów może być przydatna w przypadku wystąpienia ewentualnych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy również zapoznać się ze stroną poświęconą często zadawanym pytaniom (Frequently Asked Questions, FAQ) w witrynie naszego centrum pomocy technicznej pod adresem: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Naukowcy z działu serwisu technicznego firmy QIAGEN zawsze chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i/lub protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i oznaczeń (informacje kontaktowe znajdują się na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentarze i wskazówki

### Wynik dla próbki jest nieważny: amplifikacja $\beta$ -globiny jest zbyt niska lub nie występuje

- |    |   |   |
|----|---|---|
| a) | Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników. Patrz „Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 próbówki”, strona 21 | Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć badanie próbki. |
| b) | Sprawdzić eluat DNA   | Powtórzyć izolację DNA.   |

### Wynik kontroli pozytywnej jest nieważny: amplifikacja jest zbyt niska lub nie występuje dla jednej lub większej liczby sekwencji docelowych

- |    |   |   |
|----|---|---|
| a) | Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników. Patrz „Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 próbówki”, strona 21 | Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć badanie próbki.   |
| b) | Częściowa degradacja  | Zawartość zestawu przechowywać w temperaturze od $-15^{\circ}\text{C}$ do $-30^{\circ}\text{C}$ . Unikać ponownego zamrażania i rozmrażania więcej niż pięć razy.                                     |
| c) | Odczynniki do reakcji PCR częściowo zdegradowane  | Zawartość zestawu przechowywać w temperaturze od $-15^{\circ}\text{C}$ do $-30^{\circ}\text{C}$ i chronić mieszaniny reakcyjne przez światłem. Unikać wielokrotnego zamrażania i odmrażania.          |
| d) | Odwrócenie próbek w pasku   | Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji.   |
| e) | Data ważności   | Sprawdzić datę ważności używanego zestawu.  |
| f) | Zbyt długa przerwa między pipetowaniem próbek i rozpoczęciem programu   | Mieszaniny do reakcji PCR mogą być przechowywane w aparacie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ , w ciemności, przez 30 minut od czasu pipetowania próbek do próbek do momentu rozpoczęcia programu. |

## Komentarze i wskazówki

---

### Kontrola bez matrycy (ang. no template control, NTC) jest nieważna

- |    |   |  |
|----|---|--|
| a) | Błąd pipetowania lub pominięcie odczynników. Patrz „Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki”, strona 21 | Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć badanie próbkki. |
|----|---|--|
















### Brak sygnału lub niski sygnał w próbce pomimo prawidłowej kontroli

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Efekty hamujące  | Zawsze należy się upewnić, że w trakcie izolacji DNA nie zostały resztki buforów.<br>Powtórzyć izolację DNA. |
| b) | Błąd pipetowania. Patrz „Reakcja PCR w aparatach Rotor-Gene Q MDx z rotorem na 72 probówki”, strona 21 | Należy sprawdzić schemat pipetowania i przygotowanie reakcji. Powtórzyć reakcję PCR.                         |

Jeśli problem będzie się utrzymywał, należy skontaktować się z serwisem technicznym QIAGEN.

# Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
	Termin ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Oznaczono symbolem CE-IVD
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Składniki
	Zawiera
	Numer
Rn	R oznacza wydanie instrukcji użycia (instrukcji obsługi), a n to numer wydania
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Producent
	Chronić przed światłem słonecznym
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Przeostroga

## Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić witrynę naszego centrum pomocy technicznej dostępną pod adresem [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się z jednym z działów serwisu technicznego firmy QIAGEN lub lokalnych dystrybutorów (patrz tylna okładka lub strona [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
QIAscreen HPV PCR Test	Na 72 reakcje, zawiera: Mieszanina Master Mix, Kontrola Pozytywna, Kontrola Negatywna, Instrukcja użycia	617005
QIAsymphony SP	Moduł do przygotowania próbek QIAsymphony (opcjonalnie do izolacji)	9001297
<b>Rotor-Gene Q MDx</b>		
Rotor-Gene Q MDx HRM System	Cyklar do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robocizną, instalację i przeszkolenie	9002035
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklar do reakcji real-time PCR i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria; obejmuje roczną gwarancję na części i robocizną, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia	9002032

## Akcesoria do aparatu Rotor-Gene Q MDx

Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji jednokanałową pipetą w układzie 72 probówek o pojemności 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 1000 reakcji	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki i zatyczki na 10 000 reakcji	981106

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika odpowiedniego zestawu firmy QIAGEN. Instrukcje obsługi i podręczniki użytkownika zestawów QIAGEN są dostępne pod adresem [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w serwisie technicznym firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora.

# Historia zmian dokumentu

Data	Zmiany
R2, sierpień 2018 r.	Zaktualizowano sekcję Ostrzeżenia i środki ostrożności; dodano informację dotyczącą podłoża CellSolutions® w sekcji Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami oraz Znaki towarowe; zmieniono treść sekcji Przygotowanie próbki, zastępując wartości ułamkowe wartościami procentowymi; zaktualizowano protokół: Test QIAScreen HPV PCR Test w aparacie RGQ MDx; zmieniono treść kolumny 3 w Tabeli 1 dotyczącej protokołu: Test QIAScreen HPV PCR Test w aparacie RGQ MDx; zaktualizowano sekcję Reakcja PCR w aparacie RGQ MDx z rotorem na 72 próbki, dodając treść Ważna uwaga oraz zmieniając nazwę okna New experiment (Nowy eksperyment) na New Run (Nowy program); zaktualizowano sekcję Parametry skuteczności; skorygowano numer katalogowy dla testu QIAScreen HPV PCR Test; poprawiono układ.
R3, czerwiec 2023 r.	Zaktualizowano sekcję dotyczącą przechowywania próbek i sposobu postępowania z nimi; zaktualizowano sekcję dotyczącą przygotowania próbek obejmującego wstępne przygotowanie próbek zebranych do podłoża SurePath oraz instrukcje izolacji DNA przy użyciu zestawu QIAamp DSP Virus Spin Kit oraz izolacji DNA w aparacie QIASymphony przy użyciu zestawu QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit; zaktualizowano informacje dotyczące skuteczności klinicznej dla próbek zebranych w podłożu SurePath i dodano odniesienia dotyczące walidacji próbek zebranych w podłożu SurePath.

## Umowa ograniczonej licencji dla testu QIAScreen HPV PCR Test

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być używany wyłącznie zgodnie z protokołami dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją obsługi i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania tego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw stron trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy panel i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Panel oraz jego składniki są na mocy licencji przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku i nie można ich ponownie używać, regenerować lub sprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela żadnych innych licencji, wyrażonych ani dorozumianych, poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik panelu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo żądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); PreservCyt® (Hologic, Inc.); CellSolutions®; Pathtztz® (Pathtztz); SurePath® (Becton Dickinson and Company). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały wyraźnie oznaczone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

**Firma Self-screen B.V. jest oficjalnym producentem testu QIAScreen HPV PCR Test.**

**Test QIAScreen HPV PCR Test jest produkowany przez Self-screen B.V. dla firmy QIAGEN.**

1132289PL.06/2023 HB-2579-004 © 2023 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.



