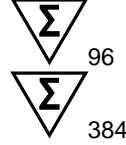


Ağustos 2015

digene® HC2 High-Risk HPV DNA Testi Kullanma Talimatı



IVD

Servikal ve vajinal örneklerde insan papillomavirüs (HPV) DNA'sının 13 yüksek riskli tipinin kalitatif saptanması için mikroparka kemiluminesans kullanarak sinyal amplifikasyonlu bir in vitro nükleik asit hibridizasyon testi

Şunlarla kullanılmak üzeredir:

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



REF

5197-1330 (1 plaka kiti)
618111 (4 plaka kiti)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
ABD

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALMANYA

1058538TR Rev. 02

Önceki kullanma talimatı revizyonundan temel değişiklikler

- SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinin QIASymphony® DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama işlemleri ilgili performans verileriyle birlikte eklendi.
- Kimyasalların Sınıflandırma ve Etiketlemesinin Global Uyumlaştırılmış Sistemi (GHS) ile uyum için güncellendi.

İçindekiler

Kullanım Amacı	8
Özet ve Açıklama	9
Patojen bilgisi.....	10
İşlemin Prensipleri	10
QIAAsymphony SP kullanarak örnek hazırlama	12
QIAAsymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama	12
QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama	12
Rapid Capture System kullanılarak test etme	13
Sağlanan Materyal	15
1 plakalı kit	15
4 plaka kiti	15
Kit içeriği.....	16
Gereken ama Sağlanmayan Malzemeler	17
In vitro diagnostik ekipman ve materyaller.....	17
Genel laboratuvar kullanımı ekipmanı ve materyalleri.....	18
PreservCyt örnek hazırlama için ek ekipman ve materyal	20
SurePath örnek hazırlama için ek ekipman ve materyal.....	20
Uyarılar ve Önlemler	21
Uyarılar	21
Numuneler.....	21
Sodyum azit.....	22
Tampon N2.....	22
RCS otomatik testi.....	22
Bileşenler için güvenlik ve risk ifadeleri	23
Önlemler.....	24
Reaktif Saklama ve Muamele.....	25
Kit bileşenleri	25

Hazırlanan reaktifler.....	25
Numune Toplama ve Hazırlama	26
STM'de servikal ve vajinal numuneler.....	26
Servikal biyopsiler	27
PreservCyt Solüsyonu içinde servikal numuneler.....	27
SurePath Koruyucu Sıvısında servikal numuneler.....	28
SurePath numunelerinden otomatik örnek hazırlama	29
SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden otomatik örnek hazırlama	29
SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden manuel örnek hazırlama	30
İşlem	31
Reaktif hazırlama	31
Denatürasyon Reaktif 1	33
Denatürasyon Reaktif 2.....	34
Prob Karışımı.....	34
Yıkama Tamponu.....	36
Plaka düzenini oluşturun	37
Örnek hazırlama.....	39
PreservCyt numuneleri için QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama	39
QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numuneleri ve SurePath post-gradyent hücre peletlerinden örnek hazırlama	40
PreservCyt numuneleri için QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama	40
PreservCyt numuneleri için manuel örnek hazırlama.....	41
SurePath post-gradyent hücre örneklerinden manuel örnek hazırlama.....	41
QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin denatürasyonu ve hibridizasyonu.....	43
Manuel test için kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütlerinin denatürasyonu.....	43
DNA elütleri için isteğe bağlı durma noktası	44
DNA elütlerinin hibridizasyonu.....	45
STM numunelerinin ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin denatürasyonu ve hibridizasyonu	45
Kalibratörler, kalite kontroller ve STM numunelerinin denatürasyonu	46

Hazırlanmış STM örnekleri ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin isteğe bağlı durma noktası	47
Hazırlanmış STM örnekleri ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin hibridizasyonu.....	48
Bir mikrolaka ve Microplate Heater I kullanarak Hibridizasyon	49
Mikrotüpler ve su banyosu kullanarak Hibridizasyon	50
Hibrid yakalama	51
Hibrid saptama.....	53
Yıkama.....	54
Otomatik Plaka Yıkayıcı yöntemi.....	54
Manuel yıkama yöntemi	55
Sinyal amplifikasyonu	56
Yakalama mikrolakasını ölçme ve sonuç oluşturma.....	57
Sonuçların Yorumlanması	58
STM numune testi sonuçları	58
SurePath numune testi sonuçları	58
PreservCyt numune testi sonuçları	58
RLU/CO değeri 1,0'a yakın	59
Diğer HPV tipleri.....	59
Test Kalibrasyonu Doğrulama	59
Negatif kalibratör	59
Pozitif kalibratör.....	60
Pozitif kalibratör ortalaması / negatif kalibratör ortalaması	60
Kesme Noktası Hesaplama	60
Kalite Kontroller.....	60
Sınırlamalar	62
Performans Özellikleri	64
Hasta yönetimi için risk değerlendirmesine yardımcı olarak normal Pap yayma sonuçları olan hastaları tararken klinik performans.....	64
Kolposkopiye sevk gereksinimini belirlemek için ASC-US Pap smear sonuçlarıyla hastaları tararken klinik performans.....	68

LSIL veya HSIL Pap Smearlı kadınlarda yüksek evre hastalık riskinin belirlenmesi için klinik hassasiyet ve özgüllük	70
Vajinal veya Kendi Kendine Numune Alma Performansı	74
Analitik Hassasiyet	74
Numune tipleri arasında eşdeğerlik	75
STM ve PreservCyt numunelerinin eşdeğer olması	75
PreservCyt numunelerinin manuel örnek hazırlaması ve QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinin örnek hazırlamasının eşdeğerliliği	76
PreservCyt numunelerinin manuel örnek hazırlaması ve QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinin örnek hazırlamasının eşdeğerliliği	76
SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin STM ve manuel örnek hazırlamanın eşdeğer olması	77
QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numunelerinden örnek hazırlama ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin manuel örnek hazırlamanın eşdeğerlilik durumu	78
QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden örnek hazırlama ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden manuel örnek hazırlamanın eşdeğerlilik durumu	79
Test yöntemleri arasında anlaşma	80
Tekrar Üretilbilirlik	83
Manuel testin genel tekrar üretilebilirliği	83
Klinik STM numuneleriyle tekrar üretilebilirlik	84
Klinik PreservCyt numuneleriyle tekrar üretilebilirliği	87
Klinik SurePath numuneleriyle tekrar üretilebilirliği	97
Çapraz reaktivite	102
Çapraz hibridizasyon	104
Kan ve diğer maddelerin STM numunelerine etkisi	105
Kan ve diğer maddelerin PreservCyt numunelerine etkisi	105
Manuel örnek hazırlama	105
QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama	105
QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama	106
Kan ve diğer maddelerin SurePath numunelerine etkisi	107

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath örneklerinden örnek hazırlama	107
QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath örneklerinden örnek hazırlama	108
QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinden örnek hazırlama.....	108
Bulaşma	109
Cihaz içi reaktif stabilitesi	110
Referanslar	113
Semboller	118
Sorun Giderme Kılavuzu	119
DR2 Kontaminasyon kontrolü	127
Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu	127
Automated Plate Washer kontaminasyon kontrolü	128
İrtibat Bilgisi	128

Kullanım Amacı

İn vitro diagnostik (IVD) kullanım içindir.

Hybrid Capture® 2 (HC2) teknolojisi kullanan *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi servikal ve vajinal numunelerde 13 yüksek risk HPV DNA tipinin kalitatif saptanması için mikrolakla kemiluminesans kullanarak sinyal amplifikasyonlu bir nükleik asit hibridizasyon testidir.

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile test edilebilecek servikal ve vajinal numuneler arasında şunlar vardır:

- Bir doktor tarafından *digene* HC2 DNA Toplama Cihazıyla toplanan servikal numuneler
- Hasta tarafından *digene* HC2 DNA Toplama Cihazıyla toplanan vajinal numuneler
- Biopsies collected in *digene* Specimen Transport Medium (STM)
- *digene* Specimen Transport Medium'da (Numune Nakil Ortamı, STM) toplanan biyopsiler
- Süpürge tipi bir toplama cihazı veya fırça/spatül kombinasyon toplama cihazıyla toplanıp sonra PreservCyt Solüsyonu veya SurePath Koruyucu Sıvısına yerleştirilen örnekler

Bu testin kullanımı aşağıdaki durumlarda endikedir:

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

Özet ve Açıklama

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

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

Tarihsel olarak HPV tipleri 16 ve 18 yüksek riskli kanserle ilişkili olarak görülmüştür (8–10). HPV tipleri 31, 33 ve 35'in kanserle orta derecede ilişkisi olduğu gösterilmiştir (2,11–14). Bu orta derece ilişki bu tiplerin kanserler yerine yüksek dereceli skamöz intrapitelyal lezyonlarda daha sık saptanması nedeniyledir. Bu nedenle bu tiplerin varlığında kanser indüksiyonu yüksek risk HPV DNA tiplerinin varlığında olandan daha az olasıdır (15). Bu 5 HPV tipi birlikte HPV enfeksiyonlarının %73'ünden sorumludur (16, 17). Tip 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 dahil ek HPV DNA tipleri kalan lezyonlarda saptanabilir temel HPV'ler olarak tanımlanmıştır (17–27). Bu HPV tipleri de çeşitli histopatolojik tanı kategorilerindeki relatif dağılımları temelinde orta ve yüksek risk gruplarına sınıflandırılabilir (16, 17, 24–28).

HPV DNA'nın normal servikal epitel bulunan kadınların yaklaşık %10'unda bulunduğu gösterilmiştir ama spesifik kadın gruplarındaki fiili prevalans yaş ve diğer demografik değişkenlerden güçlü şekilde etkilenir (2, 10, 16, 29). Prospektif çalışmalar HPV DNA pozitif kadınların %15–28'inde 2 yıl içinde skamöz intraepitelyal lezyonlar (SIL) gelişirken bu rakamın HPV DNA negatif kadınlarda sadece %1–3 olduğunu göstermiştir (30, 31). Özellikle HPV tipi 16 ve 18 için ilerleme tipi (yaklaşık %40) diğer HPV tipleri için olandan daha yüksek bulunmuştur (30).

Patojen bilgisi

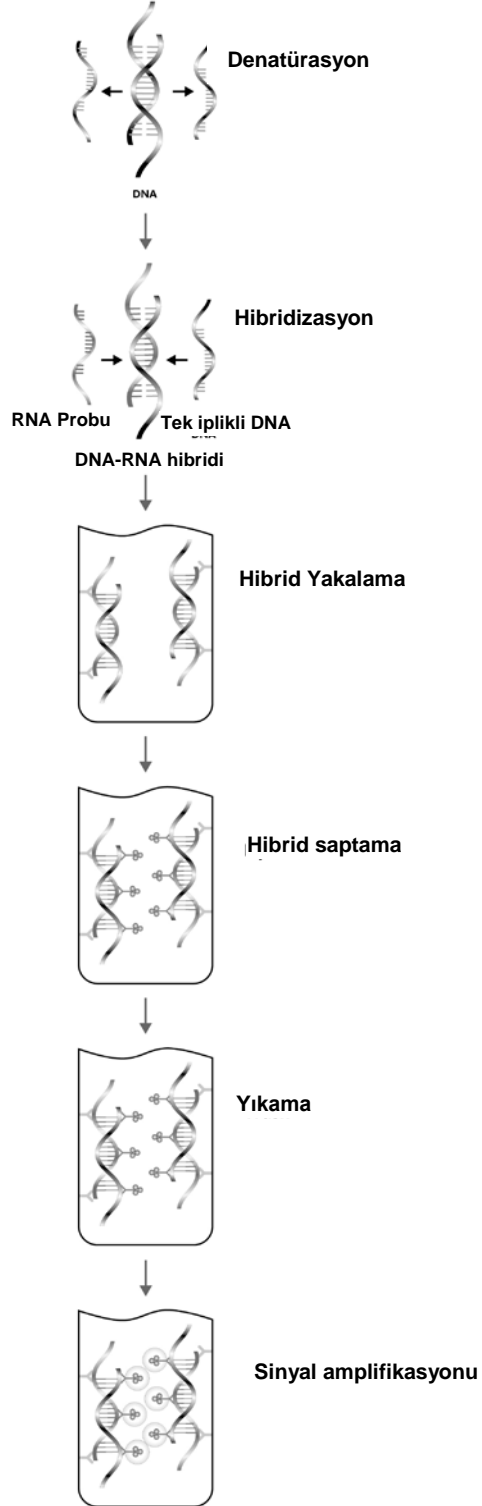
İnsan papillomavirüsleri bir protein kapsidiyle sarılı 8000 baz çiftlik, çift iplikli dairesel bir DNA molekülü içeren ikozahedral bir viral partikülden (virion) oluşur. Epitelyal hücrelerin enfeksiyonundan sonra viral DNA epitelin tüm kalınlığı boyunca yerleşir ama sağlam virionlar sadece dokunun üst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

İşlemin Prensibi

HC2 teknolojisi kullanan *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi mikropilaka kemiluminesan saptama kullanan sinyal amplifikasyonlu bir nükleik asit hibridizasyon testiidir. Hedef DNA içeren numuneler spesifik bir HPV RNA probuna hibridize olur. Oluşan RNA–DNA hibridleri RNA–DNA hibridlerine spesifik antikorlarla kaplı bir mikropilaka kuyusunun yüzeyine yakalanır. İmmobilize edilmiş hibridler sonra RNA–DNA hibridlerine spesifik alkalen fosfatazla konjüge antikorlarla reaksiyona girer ve bir kemiluminesan substratla saptanır. Her antikora birkaç alkalen fosfataz molekülü konjüge olur. Çok sayıda konjüge antikör her yakalanan hibride bağlanıp önemli ölçüde sinyal amplifikasyonu ile sonuçlanır. Substrat, bağlı alkalen fosfataz ile yarıldığında ışık saçılır ve bu ışık bir *digene* Microplate Luminometer (DML) aletinde bağlı ışık üniteleri (RLU'lar) olarak ölçülür. Saçılan ışığın şiddeti numunede hedef DNA varlığı veya yokluğuna işaret eder.

Test kesme noktasına (CO) eşit veya üzerinde bir RLU ölçümü numunede yüksek risk HPV DNA dizileri varlığına işaret eder. Test kesme noktasının altındaki bir RLU ölçümü test edilen spesifik yüksek risk HPV DNA dizilerinin yokluğuna veya testin saptama limiti altında HPV DNA düzeylerine işaret eder.

Hibrid Yakalama İş Akışı



QIASymphony SP kullanarak örnek hazırlama

PreservCyt numuneleri için otomatik olarak örnek hazırlama QIASymphony DSP HPV Media Kitiyle veya QIASymphony DSP AXpH DNA Kitiyle QIASymphony SP kullanılarak yapılabilir.

QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama

QIASymphony DSP HPV Media Kiti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile Rapid Capture® System (RCS) kullanılarak otomatik test için hazır hibridizasyon mikropalakasında örnek ekstraları sağlar. QIASymphony SP tek bir çalışmada 24'lük gruplar halinde 88 örneğe kadar örnek hazırlama işleminin tüm adımlarını gerçekleştirir.

QIASymphony SP alet örneklerle yüklendikten sonra 2 saat 15 dakikada kullanıcı girişi gereksinmeden 88 PreservCyt örneğini işler

QIASymphony SP alet örneklerle yüklendikten sonra 1 saat 45 dakikada kullanıcı girişi gereksinmeden 88 SurePath örneğini işler. QIASymphony SP kullanılarak örnek hazırlamanın hemen sonrasında bir mikropalaka ısıtıcı üzerinde hibridizasyon mikropalakasında örnek ekstralarının 90 dakikalık inkübasyonu gelir. Örnek ekstresi inkübasyonu sırasında kalibratörler ve kalite kontroller bir su banyosunda ayrı olarak denatüre edilir ve sonra örnek ekstresi inkübasyonunun tamamlanmasının ardından manuel olarak hibridizasyon mikropalakasının birinci sütununa pipetlenir. SurePath numunelerinden QIASymphony SP ve QIASymphony DSP HPV Ortam Kitiyle örnek hazırlama, sitoloji işlemesine başlamadan önce veya sitoloji işlemesi tamamlandıktan sonra yapılabilir.

Önemli: PreservCyt ve SurePath numunelerinden QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlanmasının sonucunda oluşan örnek ekstraları sadece RCS kullanılarak test edilebilir. Testin örnek ekstralarıyla manuel olarak yapılması doğrulanmamıştır.

QIASymphony kullanarak otomatik örnek hazırlama yapılırken gerekli işlemsel ve tanımlayıcı bilgi için bu kullanma talimatına ek olarak geçerli QIASymphony kullanıcı el kitapları ve QIASymphony DSP HPV Media Kiti Kullanma Talimatına (El Kitabına) başvurun (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti hibridizasyon plakasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle manuel veya RCS otomatik testi için hazır DNA elütleri sağlar. QIASymphony SP tek bir

çalışmada 24'lük gruplar halinde 88 örneğe kadar örnek hazırlama işleminin tüm adımlarını gerçekleştirir. QIASymphony SP, alet örneklerle yüklendikten sonra 4 saat 30 dakikada kullanıcı girişimi gerekmeden 88 örneği işler.

QIASymphony kullanarak otomatik örnek hazırlama yapılırken gerekli işlemsel ve tanımlayıcı bilgi için bu kullanma talimatına ek olarak geçerli QIASymphony kullanıcı el kitapları ve QIASymphony DSP AXpH DNA Kit El Kitabına (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) başvurun.

Rapid Capture System kullanılarak test etme

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test ile RCS kullanılarak yüksek hacimli numune çıktılı testler yapılabilir. 4 plakalı kit (kat. no. 618111) sadece RCS ile kullanılabilir ve manuel test için kullanılamaz.

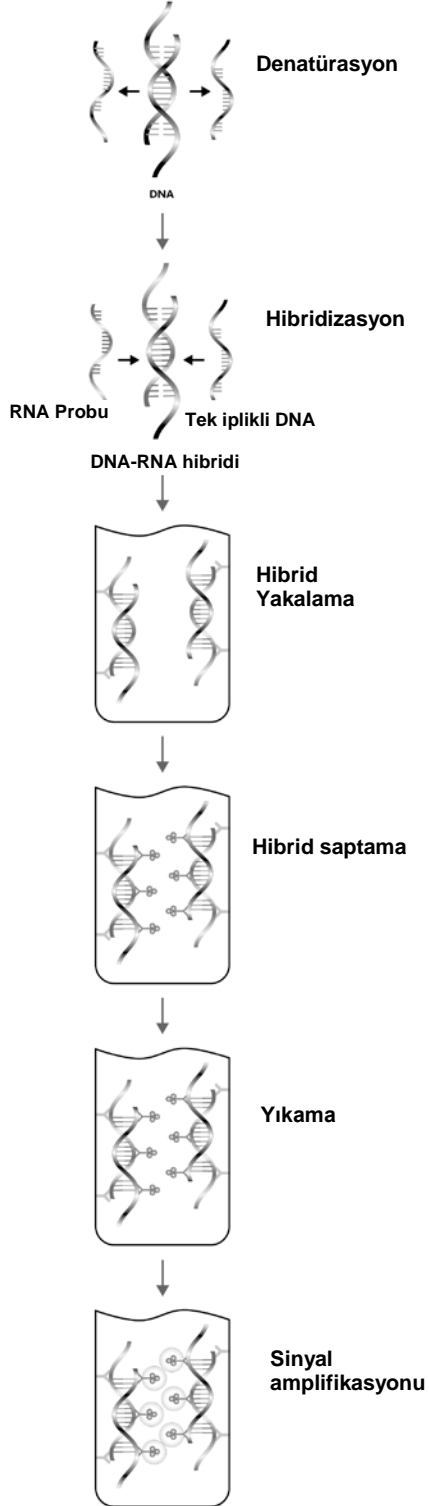
RCS, yüksek hacimli örnek çıktı testi için *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ile kullanılabilen bir genel kullanımlık otomatik pipetleme ve seyreltme sistemidir. Bu sistem kullanıcı girişiminin gerekmediği 3,5 saatlik bir dönem dahil 8 saatte 352 adete kadar numuneyi alabilir; 13 saatte 704 adete kadar numune sonucu oluşturulabilir.

Numune hazırlama RCS kısmı üzerine yerleştirme öncesinde RCS'den bağımsız olarak yapılır. Ayrıca hem manuel hem RCS otomatik testleri için ortak bir çevrim dışı DML cihazı kullanılarak kemiluminesan sinyal saptama ve sonuç bildirimini gerçekleştirilir.

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testi adımlarının her biri manuel test işlemiyle tam olarak aynı sırada yapılır. RCS 4 adede kadar mikropolanın arka arkaya işlenmesini mümkün kılar ve her mikropolaka örnekler ile gerekli test kalibratörleri ve kalite kontrolleri içerir.

RCS otomatik testini yaparken gerekli işlemsel ve tanımlayıcı bilgi için bu kullanma talimatına ek olarak Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı (*Rapid Capture System User Manual*) ve Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı — QIASymphony SP İşlenmiş Örnekleri kullanarak digene HC2 DNA Testleri Yapma (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) belgelerine başvurun.

Hibrid Yakalama İş Akışı



Ruční příprava vzorků

Automatizováno na systému Rapid Capture

Sağlanan Materyal

1 plakalı kit

1 plakalı *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Test kitinde (kat. no.5197-1330) 96 test vardır.

1 plakalı kit kullanılarak manuel test yaparken, her kullanım için önerilen en küçük test sayısı 24'tür. Kullanım başına 24 testten azı isteniyorsa kit başına toplam test sayısı sınırlı reaktif hacimleri nedeniyle azalabilir. Hasta sonucu sayısı aşağıda belirtildiği gibi kit başına kullanım sayısına göre değişir:

Kullanım sayısı	Hasta sonucu sayısı
1	88
2	80
3	72
4	64

1 plakalı kit kullanılarak RCS otomatik testi yaparken tam kit kullanımı her RCS çalışması başına tam bir mikrolaka (88 örnek) test edilmesini gerektirir. Kısmi mikrolakanın test edilmesi kabul edilebilir; ancak aletin çalışması nedeniyle ölü hacim yüzünden tüm kit kullanılır.

4 plaka kiti

4 plakalı *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Test kitinde (kat. no. 618111) 384 test vardır.

4 plakalı kit sadece RCS otomatik testi için kullanılabilir. 384 test yapmak için 4 plakalı kit, 1 veya 2 RCS çalışmasında kullanılmalıdır. 2'den fazla çalışma isteniyorsa sınırlı reaktif hacimleri nedeniyle kit başına toplam test sayısı azalabilir.

Kit içeriği

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Katalog no.	5197-1330	618111
Test	96	384
Indicator Dye (Gösterge Boya) %0,05 (a/h) sodyum azit içerir	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (Denatürasyon Reaktifi) Seyreltilmiş sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* (Prob Seyreltici) %0,05 a/h sodyum azitli tamponlanmış solüsyon	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (Yüksek Risk HPV Probu) HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 RNA probu, tamponlanmış solüsyonda (kırmızı kapak)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Düşük Risk HPV Kalite Kontrol) 5 pg/ml (500.000 kopya/ml) klonlanmış HPV 6 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azit ile STM içinde.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Yüksek Risk HPV Kalite Kontrol) 5 pg/ml (500.000 kopya/ml) klonlanmış HPV 16 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azit ile STM içinde	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negatif Kalibratör) Taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azitli STM içinde	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (Yüksek Risk HPV Kalibratör) 1 pg/ml klonlanmış HPV 16 DNA ve taşıyıcı DNA, %0,05 a/h sodyum azitle STM içinde	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Yakalama Mikroplakası) Keçi poliklonal anti-RNA–DNA hibrid antikorlarla kaplanmış	1	4
Detection Reagent 1 (Saptama Reaktifi 1) RNA–DNA hibridlerine alkale fosfataz konjüge antikorlar, %0,05 a/h sodyum azitle tamponlanmış solüsyonda	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Saptama Reaktifi 2) CDP-Star [®] , Emerald II (kemiluminesan substrat) ile	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate* (Yıkama Tamponu Konsantresi) %1,5 a/h sodyum azit içerir	100 ml	2 x 100 ml

* Sağlık ve güvenlik bilgisi için bakınız "Uyarılar ve Önlemler," sayfa 21.

Gereken ama Sağlanmayan Malzemeler

Önemli: Bu işlemde kullanılan aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edildiği ve kalibre edildiğinden emin olun.

İn vitro diagnostik ekipman ve materyaller

QIAGEN'den sadece *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testleriyle kullanımı onaylanmış ekipman ve materyaller sağlanabilir

- *digene* Hybrid Capture 2 Sistemi ("*digene* HC2 Sistemi"); bir QIAGEN onaylı luminometer ("DML aleti"), QIAGEN onaylı kişisel bilgisayar ve bilgisayar periferalleri (monitör, klavye, fare, yazıcı ve yazıcı kablosu), *digene* HC2 System Software (HC2 Sistem Yazılımı) ("*digene* assay analysis software" (test analiz yazılımı)), *digene* HC2 System Assay (HC2 Sistem Testi) HPV Protokolleri, LumiCheck Plate Software (LumiCheck Plaka Yazılımı) ve *digene* HC2 Sistem Kullanıcı El Kitabı (*digene HC2 System User Manual*) kısımlarından oluşur
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (isteğe bağlı)*
- Dönüştürme Askısı ve Kapağı (isteğe bağlı)*
- *digene* Numune Askısı ve Kapağı (isteğe bağlı)*
- EXPAND-4 pipet ve standı (isteğe bağlı)†
- Tüp Mühürleyici Dispenser ve kesme cihazı (isteğe bağlı, MST Vortexer 2 ile kullanılır)
- Rapid Capture System (4 plakalı kit kullanımı için gereklidir; 1 plakalı kit kullanımı için isteğe bağlıdır)
- Yıkama Aygıtı
- Hibridizasyon mikrolakaları
- Mikrolaka kapakları
- RCS mikrolaka kuyu stripleri*
- RCS reaktif olukları*
- RCS reaktif oluğu kapakları*

* RCS otomatik testi yapmak için gerekli.

† STM örneklerinin hibridizasyon mikrolakasına aktarılması için kullanılan özel madde. Genişlediğinde 3,2 cm uç aralığının elde edilebilmesi şartıyla diğer özel genişletilebilir çoklu kanal pipetleri kullanılabilir.

- RCS tek kullanımlık uçları*
- RCS üstte bırakılan kapakları*
- Tampon N2[†]
- Tampon D2[†]
- Mavi RCS Yıkama Kabı[‡]
- Ekstra uzun pipet uçları
- Numune toplama tüpleri
- Numune toplama tüpü askısı
- Numune toplama tüpü vidalı kapakları
- Tek kullanımlık reaktif rezervuarları
- DuraSeal™ tüp mühürleyici film
- Hibridizasyon mikrotüpleri[§]
- Mikrotüp askısı[§]
- Plaka mühürleyiciler[§]

Genel laboratuvar kullanımı ekipmanı ve materyalleri

- Bir numune askısını (21 cm genişlik x 32 cm derinlik x 18 cm yükseklik) tutmak için yeterli büyüklükte 65 ± 2°C su banyosu
- Mikrosantrifüj
- Kap ataşmanlı vorteksleyici
- Tek kanallı pipet; 20–200 µl ve 200–1.000 µl hacimler için değişken ayarlar
- Eppendorf® Repeater® pipet gibi tekrarlayan pozitif displasman pipeti
- 8 kanallı pipet: 25–200 µl hacimler için değişken ayarlar
- Süre Ölçer
- Sodyum hipoklorür çözeltisi, %0,5 h/h
- Parafilm® veya eşdeğeri
- Tek kanallı pipet (20–200 µl ve 200–1.000 µl) için tek kullanımlık aerosol bariyerli pipet uçları
- Tekrarlayan pozitif displasman pipeti (12,5, 5, 2,5 ve 1,25 ml) için tek kullanımlık uçlar
- 8 kanallı pipet (25–200 µl) için tek kullanımlık uçlar

* RCS otomatik testi yapmak için gerekli.


† QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak hazırlanan örneklerle test yapılması için gereklidir.


‡ QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak işlenen örneklerin RCS otomatik testi için gereklidir.


§ Mikrotüpler ve su banyosu kullanılarak hibridizasyon yapmak için gereklidir.

-
- Kimtowels® kağıt havluları veya eşdeğeri az tiftikli kağıt havlular
 - Tek kullanımlık tezgah örtüsü
 - Pudrasız tek kullanımlık eldivenler
 - 5 ml ve/veya 15 ml tıklamalı kapaklı, yuvarlak altlı, polipropilen tüpler
 - 10 ml veya 15 ml tüpleri tutmak için tüp rafı
 - 50 ml propilen konik tüpler


PreservCyt örnek hazırlama için ek ekipman ve materyal

 QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama için QIASymphony DSP HPV Media Kiti Kullanma Talimatı (El Kitabı) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) belgesine başvurun.

 QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama için QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti El Kitabı (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) belgesine başvurun.

 Manuel örnek hazırlama açısından *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına başvurun.

SurePath örnek hazırlama için ek ekipman ve materyal

 QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama için QIASymphony DSP HPV Media Kiti Kullanma Talimatı (El Kitabı) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) belgesine başvurun.

Manuel SurePath örnek hazırlama şu ek ekipman ve materyalleri gerektirir:

- 800 ± 15 x g değerine ulaşabilen ve 15 ml konik polipropilen santrifüj tüplerini tutabilen sallanan kova santrifüj
- *digene* HC2 Sample Conversion Tüpleri veya 15 ml VWR® veya Corning® polipropilen tüpleri
Önemli: QIAGEN tarafından sağlanan *digene* HC2 Örnek Dönüştürme Tüpleri MST Vortexer 2 veya RCS ile kullanılmalıdır.
- 7 ml standart uçlu transfer pipetleri veya eşdeğeri
- *digene* Specimen Transport Medium

Uyarılar ve Önlemler

In vitro diagnostik kullanım içindir.

Testi kullanmadan önce tüm talimatı dikkatle okuyun.

Uyarılar

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrim içi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve kullanıcılar burada her QIAGEN kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilir.

Numuneler

DİKKAT Enfeksiyöz ajanlar riski



Numuneler enfeksiyöz ajanlar içerebilir ve uygun şekilde muamele edilmelidir. Tüm numuneleri enfeksiyöz olabilir olarak kabul edin.

Bilinen hiçbir test yöntemi numunelerin enfeksiyon bulaştırmayacağı konusunda tam güvence veremez. İnsan numunelerine, geçerli ulusal ve yerel biyogüvenlik uygulamalarına göre muamele edilmesi önerilir. Enfeksiyöz ajanlar içeren veya içermesinden şüphelenilen materyal ile bu biyogüvenlik uygulamalarını kullanın.

Bu önlemler arasında verilenlerle sınırlı olmamak üzere şunlar vardır:

- Ağızla pipetlemeyin.
- Reaktifler veya numunelerin kullanıldığı yerlerde sigara içmeyin ve bir şey yiyip içmeyin.
- Reaktifler veya numuneleri kullanırken tek kullanımlık pudrasız eldivenler kullanın.- Testi yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Tüm numune döküntülerini %0,5 h/h sodyum hipoklorür gibi tüberkülosit bir dezenfektan veya başka uygun bir dezenfektanla temizleyin ve dezenfekte edin (32, 33).
- Tüm numuneler, reaktifler ve diğer kontamine olmuş olabilecek materyalleri ulusal ve yerel düzenlemelerle uyumlu olarak dekontamine edin ve atın.

Denatürasyon ve inkübasyon sonrasında numuneler artık enfeksiyöz kabul edilmez (34); ancak laboratuvar personeli halen ulusal ve yerel önlemlere uymalıdır.

Sodyum azit

Bazı reaktifler sodyum azit içerir. Sodyum azitin laboratuvar su borularında kurşun veya bakır azit oluşturduğu bildirilmiştir. Bu azitler çekiçle vurma gibi perküsyon durumunda patlayabilir. Kurşun veya bakır azit oluşumunu önlemek için sodyum azit içeren solüsyonları attıktan sonra lavabolardan iyice su akıtın. Azit biriktiğinden şüphelenilen eski lavabolardan kontaminasyonu gidermek için A.B.D. Mesleki Güvenlik Sağlık İdaresi şunları önerir:

1. Alt kısımdan sıvıyı bir lastik veya plastik hortum kullanarak boşaltın.
2. %10 h/h sodyum hidroksit solüsyonuyla doldurun.
3. 16 saat bekleyin.
4. İyice su akıtın.

Tampon N2

DİKKAT Yüksek ölçüde reaktif bileşenler riski



Tampon N2 içeren herhangi bir solüsyon veya atığa doğrudan çamaşır suyu veya asidik solüsyonlar eklemeyin.

Tampon N2 çamaşır suyu kombine olduğunda yüksek ölçüde reaktif bileşenler oluşturabilen guanidin hidroklorür içerir.

Eğer bu tamponları içeren sıvı dökülürse uygun laboratuvar deterjanı ve suyla temizleyin. Dökülen sıvı enfeksiyöz olabilecek ajanlar içeriyorsa etkilenmiş bölgeyi önce laboratuvar deterjanı ve suyla ve sonra %1 (h/h) sodyum hipokloritle temizleyin.

RCS otomatik testi

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

Bileşenler için güvenlik ve risk ifadeleri

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

Wash Buffer Concentrate (Yıkama Tamponu Konsantresi)



İçerir: Sodium azide. Uyarı! Yutulması halinde zararlıdır. Uzun süreli etkilerle sudaki yaşam için zararlıdır. Çevreye yayılmasını önleyiniz. İçerik/ kabı onaylanmış atık atım tesisine atınız.

Denaturation Reagent (Denatürasyon Reaktifi)



İçerir: sodium hydroxide. Tehlike! Ciddi derecede deri yanıkları ve göz hasarına neden olur. Metaller için aşındırıcı olabilir. İçerik/ kabı onaylanmış atık atım tesisine atınız. GÖZE KAÇMIŞSA: Birkaç dakika iyice suyla durulayınız. Eğer mevcut ve kolaysa kontak lensleri çıkarınız. Durulamaya devam ediniz. DERİYE BULAMIŞSA (ya da saça): Hemen tüm bulaşmış giysisileri çıkarınız. Deriyi suyla yıkayınız. Hemen ZEHİR MERKEZİ veya doktora başvurunuz. Kilit altında saklayınız. Koruma eldiveni/ koruyucu giysi/ göz koruması/ yüz koruması kullanınız.

Probe Diluent (Prob Seyreltici)



İçerir: acetic acid; Polyacrylic acid. Tehlike! Ciddi derecede deri yanıkları ve göz hasarına neden olur. İçerik/ kabı onaylanmış atık atım tesisine atınız. GÖZE KAÇMIŞSA: Birkaç dakika iyice suyla durulayınız. Eğer mevcut ve kolaysa kontak lensleri çıkarınız. Durulamaya devam ediniz. DERİYE BULAMIŞSA (ya da saça): Hemen tüm bulaşmış giysisileri çıkarınız. Deriyi suyla yıkayınız. Hemen ZEHİR MERKEZİ veya doktora başvurunuz. Kilit altında saklayınız. Koruma eldiveni/ koruyucu giysi/ göz koruması/ yüz koruması kullanınız.

High-Risk HPV Calibrator (Yüksek Risk HPV Kalibratör)

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

High-Risk HPV Quality Control (Yüksek Risk HPV Kalite Kontrol)

Uyarı! Hafif derecede deri tahrişine neden olur. Deride tahriş olursa: Tıbbi yardım alınız.

Low-Risk HPV Quality Control (Düşük Risk HPV Kalite Kontrol)


Uyarı! Hafif derecede deri tahrişine neden olur. Deride tahriş olursa: Tıbbi yardım alınız.

Negative Calibrator (Negatif Kalibratör)

Uyarı! Hafif derecede deri tahrişine neden olur. Deride tahriş olursa: Tıbbi yardım alınız.

Önlemler

Kullanıcı *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testini yaparken şu önlemlere daima uymalıdır:

- Reaktifleri dış kutu etiketinde  sembolü yanında belirtilen son kullanma tarihi veya hazırlanmış reaktiflerin son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Testi süre ve sıcaklık aralıklarının dışında gerçekleştirmek geçersiz sonuçlara neden olabilir. Belirlenmiş süre ve sıcaklık aralıklarına girmeyen testler geçersizdir ve tekrarlanmalıdır.
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test işlemi, test kalibrasyonu, kalite kontrol ve numune sonuçlarının yorumlanmasına güvenilir test sonuçları elde etmek açısından kesin olarak uyulmalıdır.
- Tam reaktif hacmini pipetlemek ve her reaktif eklendikten sonra iyice karıştırmak önemlidir. Aksi halde hatalı test sonuçları oluşabilir. Belirtilen renk değişikliklerinin olmasını sağlamak bu koşulların karşılandığını doğrular.
- Yıkama Tamponu Konsantresi dışında kit bileşenleri bir ünite olarak test edilmiştir. Başka kaynaklardan veya farklı lotlardan bileşenleri birbirleriyle değiştirmeyin. Ancak, tek bir RCS çalışmasında çok sayıda mikropalakayı test etmek üzere gerekli reaktif hacimlerini elde etmek için aynı lot numarasına sahip kitlerden bileşenleri kombine etmek kabul edilebilir.

- Nükleik asitler çevresel nükleaz degradasyonuna çok duyarlıdır. İnsan cildinde ve insanların kullandığı materyal yüzeylerinde nükleazlar bulunur. Çalışma yüzeylerini temizleyip tek kullanımlık tezgah örtüsüyle örtün ve tüm test adımlarını yaparken pudrasız eldivenler kullanın.
- Test yapılırken yakalama mikropakası ve Saptama Reaktifi 2'nin (DR2) eksojen alkalen fosfatazla kontaminasyonunu önlediğinizden emin olun. Alkalen fosfataz içerebilen maddeler arasında Saptama Reaktifi 1 (DR1), bakteriler, tükrük, saç ve ciltten yağlar vardır. Yakalama mikropakasını yıkama adımından sonra ve DR2 inkübasyonu sırasında örtmek, eksojen alkalen fosfataz DR2 ile reaksiyona girebilip yalancı pozitif sonuçlar verebileceğinden özellikle önemlidir.
- DR2'yi doğrudan ışığa uzun süreli maruz kalmadan koruyun. DR2'yi bölüntü oluşturmadan hemen sonra kullanın ve doğrudan güneş ışığından kaçının.
- Tekrarlayan pipetten reaktif iletiminden önce sıvı geçirin ve düzenli olarak büyük hava kabarcıkları açısından kontrol yapın. Pipet ucunda fazla miktarda büyük hava kabarcığı hatalı iletme neden olabilir ve tekrarlayan pipeti doldurup tüm sıvıyı dışarı verip tekrar doldurmakla bundan kaçınılabılır. Spesifik kullanma talimatı için pipet kullanıcı el kitabına başvurun.
- DR1 ve DR2 vermek için ters pipetleme tekniğini kullanarak çoklu-kanal pipetleme yapın (bakınız “Hibrid saptama,” sayfa 53). Çoklu kanal pipetinde her pipet ucunu uygun oturma ve dolma açısından kontrol edin.
- Her yakalama mikropakası kuyusunun iyice yıkandığından emin olun (bakınız “Yıkama,” sayfa 54). Yetersiz yıkama artmış arka alan bulgularına yol açar ve yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir. Yakalama mikropakası kuyularında kalan Yıkama Tamponu azalmış sinyal veya zayıf tekrar üretilebilirliğe yol açabilir.

Reaktif Saklama ve Muamele

Kit bileşenleri

Alındığında kiti 2–8°C'de saklayın. Yıkama Tamponu Konsantresi, Denatürasyon Reaktifi ve Gösterge Boya istendiği şekilde 2–30°C'de saklanabilir. Denatürasyon Reaktifi (DNR), Prob Karışımı ve Yıkama Tamponu hariç tüm reaktifler kullanıma hazır bir şekilde sağlanır.

Hazırlanan reaktifler

Hazırlandıktan sonra DNR 2–8°C'de 3 ay stabildir.

Hazırlandıktan sonra Yıkama Tamponu 2–30°C'de 3 ay stabildir.

QIAsymphony DSP HPV Media Kiti veya QIAsymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanarak işlenen PreservCyt örnekleri test ediliyorsa açılmış, denatüre olmamış kalibratörler ve kalite kontroller 2–8°C'de 3 ay stabildir.

QIAsymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak işlenmiş örnekler test ediliyorsa hazırlanmış Denaturation Reagent 2 (DNR2) 15–30°C'de 8 saat stabildir.

Numune Toplama ve Hazırlama

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testi için test yapılmak üzere servikal ve vajinal numuneleri aşağıdaki numune toplama cihazlarından birini kullanarak toplayın ve nakledin:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (DNA Toplama Cihazı) (bir servikal fırça ve STM'den oluşur)
- *digene* STM toplanan biyopsiler
- PreservCyt Solüsyonuna veya SurePath Koruyucu Sıvısına yerleştirilen süpürge tipi bir toplama cihazı veya fırça/spatül kombinasyon toplama cihazı

Diğer örnekleme cihazlarıyla toplanan numuneler veya başka taşıma ortamlarında taşınan numuneler bu testte kullanılmak üzere doğrulanmamıştır. Bu testin performans özellikleri sadece belirtilen toplama kitiyle belirlenmiştir.

digene HC2 DNA Collection Device (DNA Toplama Cihazı) hamile kadınlarda kullanılmamalıdır. Servikal numuneler kolposkopik muayene yapılıyorsa asetik asit veya iyodür uygulanmasından önce alınmalıdır. Ek numune toplama ve muamele işlemleri için *digene* HC2 DNA Collection Device (DNA Toplama Cihazı) kullanma talimatına başvurun.

STM içinde toplanan servikal ve vajinal numuneler için *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test yapılması öncesinde örnek hazırlığı gerekmez. PreservCyt ve SurePath örnekler *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test yapılması öncesinde örnek dönüştürme gerektirir.

STM'de servikal ve vajinal numuneler

Önemli: Bir STM servikal veya vajinal numunesini yüksek konsantrasyonlarda antifungal krem, kontraseptif jöle veya vajinal yıkama sıvısı bulunursa kullanmayın.

STM numuneleri oda sıcaklığında 2 haftaya kadar tutulabilir ve test laboratuvarına buzdolabına konmadan gönderilebilir. Numuneler yalıtımlı bir kap içinde bir gecede veya 2 günde ileten bir kurye kullanarak gönderin.

Test laboratuvarında numuneleri eğer test 1 hafta içinde yapılacaksa 2–8°C'de saklayın. Eğer test 1 haftadan daha geç yapılacaksa, numune tüp kapaklarını Parafilmle örtün ve numuneleri 3 aya kadar –20°C'de saklayın. Numuneleri test yapmak için dondurucudan çıkarırken kapaklar yerine numune toplama tüpü vidalı kapakları takın.

STM'yi bakteriyel üremeyi geciktirmek ve DNA bütünlüğünü korumak için bir koruyucu eklenmiştir. Bunun organizmalar veya hücrelerin canlılığın koruması amaçlanmamıştır.

Servikal biyopsiler

Yeni toplanmış ve 2–5 mm çapraz kesite sahip servikal biopsilerde *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle analiz edilebilir. Çapı 2 mm'den az biyopsiler kullanılmamalıdır. Biyopsi örneğini hemen 1,0 ml STM içine yerleştirin, numune tüpü kapağını kapağın fırlamasını önlemek için Parafilm ile örtün ve –20°C'de dondurarak saklayın. Biyopsi örneklerini test laboratuvarına bir gecede göndermek için 2–30°C'de gönderin.

Test laboratuvarında işleninceye kadar –20°C'de saklayın. Numuneleri test yapmak için dondurucudan çıkarırken kapaklar yerine numune toplama tüpü vidalı kapakları takın

PreservCyt Solüsyonu içinde servikal numuneler

- **Önemli** Yüksek konsantrasyonda antifungal krem, vajinal kayganlaştırıcı jöle veya kan mevcutsa QIASymphony DSP HPV Media Kitiyle örneği hazırlama için bir PreservCyt servikal numunesi almayın.
- **Önemli** Kontraseptif jöle mevcutsa QIASymphony DSP AXpH DNA Kitiyle örneği hazırlama için bir PreservCyt servikal numunesi almayın.

Numuneleri rutin şekilde alın ve ThinPrep® Pap Testi lamalarını üretici tarafından sağlanan kullanma talimatına göre hazırlayın.

Toplama sonrasında PreservCyt numunelerini *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi için örnek hazırlama öncesinde 2–30°C'de 3 aya kadar saklayın. PreservCyt numuneleri dondurulamaz

Örnek hazırlama için şu yöntemler kullanılabilir:

- QIASymphony SP ve QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama.

Sonuç, testin denatürasyon adımına ilerlemeye hazır bir örnek ekstresidir (manyetik partiküller STME ve DNR içeren).

- QIASymphony SP ve QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama.
- Sonuç testin denatürasyon adımına ilerlemeye hazır bir DNA elütüdür.
digene HC2 Sample Conversion Kiti kullanılarak manuel örnek hazırlama. Manuel örnek hazırlamanın sonucu testin hibridizasyon adımına ilerlemeye hazır bir denatüre edilmiş örnektir

Numune hacmi gereklilikleri şu şekilde örnek hazırlama yöntemini temel alır:

- QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama 3 ml numune gerektirir.
- QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama 4 ml numune gerektirir.
- *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanılarak manuel örnek hazırlama en az 4 ml numune gerektirir

Pap Test hazırlandıktan sonra gereken numune hacminin altında kalan numuneler yetersiz materyal içerebilir ve *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi ile yalancı negatif sonuç verebilir.

SurePath Koruyucu Sıvısında servikal numuneler

Önemli: Kontraseptif jöle, antifungal krem veya antienflamatuar krem varsa QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama için bir SurePath servikal numunesi almayın.

Numuneleri SurePath Koruyucu Sıvıda ilgili kullanma talimatına göre toplayın.

SurePath numunelerinden örnek hazırlama, sitoloji işlemesine başlamadan önce veya sitoloji işlemesi tamamlandıktan sonra yapılabilir.

Sitoloji işlemesine başlamadan önce yapılırsa BD PrepMate® Sistemi ve BD PrepStain® Lam İşlemcisi dahil başka herhangi bir diagnostik yöntemle işlenmemiş orijinal SurePath numunesinden bir örnek kullanın. Bu kullanma talimatında bu örneklere karışıklığı önlemek açısından "SurePath örnekleri" denir.

Sitoloji işlemesi tamamlandıktan sonra yapılırsa bir SurePath numunesi BD PrepMate Sistemi ve BD PrepStain Lam İşlemcisi için uygun talimata göre hazırlandıktan sonra kalan post-gradyent hücre peletinden bir örnek kullanın. Bu kullanma talimatında bu örneklere karışıklığı önlemek açısından "SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri" denir.

Örnek hazırlama için şu yöntemler kullanılabilir:

- QIASymphony SP ve QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath örneklerinden otomatik örnek hazırlama.
Sonuç, testin hibridizasyon adımına ilerlemeye hazır bir denatüre örnek ekstresidir (manyetik partiküller STM ve DNR içeren).
- Sure Path post-gradiyent hücre peleti örneklerinin QIASymphony SP ve QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama.
Sonuç, testin hibridizasyon adımına ilerlemeye hazır bir denatüre örnek ekstresidir (manyetik partiküller STM ve DNR içeren).
- SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinden manuel örnek hazırlama
Manuel örnek hazırlamanın sonucu testin hibridizasyon adımına ilerlemeye hazır bir denatüre edilmiş örnektir.

Örnek hacim gereklilikleri aşağıda şekilde örnek hazırlama yöntemine bağlıdır:

- QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama 950 µl gerektirir
- Manuel örnek hazırlama 2,8 ml SurePath post-gradiyent hücre peleti örneği gerektirir

Gereken hacimden azını kullanmak *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinde yalancı negatif sonuç verebilir.

SurePath numunelerinden otomatik örnek hazırlama

Toplama sonrasında SurePath numunelerinden QIASymphony SP ve QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanarak örnek hazırlama öncesinde 5–25°C'de 4 haftaya kadar saklayın. Kullanılan SurePath numunesinin BD PrepMate ve BD PrepStain Lam İşlemcisi dahil olmak üzere başka herhangi bir diagnostik yöntemle işlenmemiş olması gerekir. Otomatik örnek hazırlama 950 µl SurePath numunesi gerektirir.

SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinden otomatik örnek hazırlama

Önemli: SurePath Pap lamı hazırlanmasından hemen sonra post-gradiyent hücre peletini içeren santrifüj tüpüne 2,0 ml SurePath Koruyucu Sıvısı pipetleyin. Bu işlem *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinin performansı için post-gradiyent hücre peletinin bütünlüğünü korur.

SurePath Koruyucu Sıvılı post-gradiyent hücre peleti *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testiyle örnek hazırlama öncesinde 5–25°C'de 4 haftaya kadar saklanabilir. Otomatik örnek hazırlama 950 µl SurePath post-gradiyent hücre peleti gerektirir.

SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden manuel örnek hazırlama

Önemli: SurePath Pap lamı hazırlanmasından hemen sonra rezidüel hücre peletini içeren santrifüj tüpüne 2,0 ml SurePath Koruyucu Sıvısı pipetleyin. Bu işlem *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinin performansı için post-gradyent hücre peletinin bütünlüğünü korur.

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

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

İşlem

Başlamadan önce yapılacaklar

- Manuel test için, soğuk durumdan başlandığında Microplate Heater I ürününün 65°C ± 2°C sıcaklığa dengelenmesi için en az 60 dakika bekleyin. Bu ısınma süresini beklememek hibridizasyon mikroplokasının erimesine yol açabilir. Daha ileri talimat için Microplate Heater I Kullanıcı El Kitabına (Microplate Heater I User Manual) başvurun.
- Denatürasyon ve hibridizasyon adımları sırasında bir su banyosu kullanılıyorsa su banyosunun 65°C'de ve su seviyesinin tüp içindeki tüm numune hacmini batırmaya yeterli olduğunu doğrulayın.

Reaktif hazırlama

- Numuneleri ve tüm gerekli reaktifleri buzdolabından teste başlamadan önce çıkartın. 15–30 dakika boyunca 20–25°C'ye gelmelerini bekleyin. Herhangi bir önceden denatüre edilmiş örnek ve reaktif oda sıcaklığına dengelemeden önce PreservCyt ve SurePath numunelerini hazırlayın.
- Kullanıma hazır reaktifler bir çoklu plaka PCS çalışması için kombine ediliyorsa, ayrı şişeleri iyice karıştırın ve sonra uygun hacimde reaktif temiz, tek kullanımlık, polipropilen bir konik tüpe koyun.
- Manuel test için, Yıkama Tamponu ve Prob Karışımı reaktifleri testin belirli adımları sırasında hazırlanır. RCS otomatik testi için tüm reaktifler RCS çalışması öncesinde hazırlanır ve RCS kısmı üzerine konur.
- DNR ve DNR2'yi geçerli olduğu şekilde diğer reaktifleri hazırlamadan önce hazırlayın.
- Tüm hazırlanmış reaktifleri (aksi belirtilmedikçe) ve reaktif bölüntülerini test sonunda atın.
- Test/mikroploka sayısı ve test yöntemine bağlı olarak her reaktif için gerekli hacmi belirlemek için aşağıda Tablo 1–5 kısmını kullanın. RCS otomatik testi için hacimlere aletin gerektirdiği reaktif ölü hacmi dahildir

Tablo 1. STM numunelerinin ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin manuel testi için hazırlanmış ve kullanıma hazır reaktiflerin gerekli hacimleri

Test/strip sayısı	Prob Karışımı	Yıkama Tamponu	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tablo 2. QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak hazırlanan SurePath ve SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri, manuel olarak hazırlanan PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri ve STM numunelerinin RCS ile otomatik hale getirilmiş testi için hazırlanmış ve kullanıma hazır reaktiflerin gereken hacimleri

Mikroplaka sayısı	Prob Karışımı	Yıkama Tamponu	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Tablo 3. STM numuneleri, manuel hazırlanmış PreservCyt ve SurePath örnekleri ve QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak hazırlanan SurePath örneklerinin RCS otomatik testi için hazırlanmış ve kullanıma hazır reaktiflerin gerekli hacimleri

Mikroplaka sayısı	DNR	Prob Karışımı	Yıkama Tamponu	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Tablo 4. QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak hazırlanan PreservCyt örneklerinin manuel testi için hazırlanmış ve kullanıma hazır reaktiflerin gerekli hacimleri

Test/strip sayısı	DNR	DNR2	Prob Karışımı	Yıkama Tamponu	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tablo 5. QIAasympphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak hazırlanan PreservCyt örneklerinin RCS otomatik testi için hazırlanmış ve kullanıma hazır reaktiflerin gerekli hacimleri

Mikroplaka sayısı	DNR	DNR2	Prob Karışımı	Yıkama Tamponu	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Denatürasyon Reaktifi

1 plakalı kit 50 ml Denatürasyon Reaktifi ve 4 plakalı kit 2 x 100 ml Denatürasyon Reaktifiyle gelir. DNR'yi ilgili kitle sağlanan hacme göre hazırladığınızdan emin olun.

Notlar:

- Hazırlandıktan sonra DNR 2–8°C'de 3 ay stabildir.
- Renk solarsa 3 damla daha Gösterge Boya ekleyin ve kullanmadan önce iyice karıştırın.

50 ml şişe

1. 50 ml Denatürasyon Reaktifi şişesine 5 damla Gösterge Boyası ekleyin.
2. İyice karıştırın.
DNR homojen koyu mor bir renge sahip olmalıdır.
3. DNR'yi yeni son kullanma tarihiyle etiketleyin.

100 ml şişe

1. 100 ml Denatürasyon Reaktifi şişesine 10 damla Gösterge Boyası ekleyin.
2. İyice karıştırın.
DNR homojen koyu mor bir renge sahip olmalıdır.
3. DNR'yi yeni son kullanma tarihiyle etiketleyin.

Denatürasyon Reaktifi 2

Not: DNR2 sadece QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak hazırlanan PreservCyt örneklerinin test edilmesi için gereklidir.

1. Temiz, tek kullanımlık polipropilen bir konik tüpü “DNR2” olarak etiketleyin.
2. Gerekli Tampon N2 hacmini (bakınız aşağıda Tablo 6) etiketli kaba ekleyin

Tablo 6. DNR2 hazırlanması

Gerekli DNR2 hacmi	Tampon N2 Hacmi	Tampon D2 Hacmi	Indicator Dye (Gösterge Boya)
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 damla
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1–2 damla
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 damla
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1–2 damla
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 damla
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1–2 damla
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 damla
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1–2 damla
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 damla
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1–2 damla

3. Gerekli Tampon D2 hacmini (bakınız yukarıda Tablo 6) etiketli kaba ekleyin.
4. Gerekli Gösterge Boyayı (bakınız yukarıda Tablo 6) etiketli kaba ekleyin.

Not: digene HC2 High-Risk HPV DNA Test kitiyle sağlanan Gösterge Boyayı kullanın.

5. 10 saniyeden az olmamak üzere vorteksleyin.

Not: Hazırlandıktan sonra DNR2 15–30°C’de 8 saat stabildir.0.

Prob Karışımı

- Manuel testler için Prob Karışımını numune denatürasyonu inkübasyonu sırasında hazırlayın (geçerli olduğu şekilde, bakınız “Kalibratörler, kalite kontroller ve STM numunelerinin denatürasyonu,” sayfa 46 veya “Manuel test için kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütlerinin denatürasyonu,” sayfa 43).
- RNaz kontaminasyonunu önlemek için çok dikkatli olun. Probu pipetlerken aerosol bariyeri pipet uçları kullanın.

- Prob Seyreltici visközdür. Prob Karışımını hazırlarken görünür bir vorteks elde edildiğinden emin olun; tam olmayan karıştırma azalmış sinyale neden olabilir.
 - RCS otomatik testi için probun çok sayıda flakon kombine ediliyorsa probu bir flakonda biriktirin ve pipetlemeyle karıştırın.
1. Probun flakon kapağına sıkışmasını önlemek için her prob flakonunu flakon alt kısmına sıvı getirmek üzere kısa süre santrifüje edin.
 2. Karıştırmak için flakona hafifçe vurun.
 3. Gerekli Prob Karışımı miktarını belirleyin:
Öneri: Flakon yanında veya pipet uçlarında kaybedilebilecek hacim için ekstra Prob Karışımı hazırlayın. Yukarıda Tablo 1–5 içinde belirtilen hacimlere önerilen ekstra hacim dahildir.
Manuel test: Prob Karışımını hazırlamak üzere Prob Seyrelticide probun 1:25 dilüsyonu için gerekli hacimleri belirleyin (25 µl/test). Hacimler Tablo 1, sayfa 31 ve Tablo 4, sayfa 32 içinde geçerli olduğu şekilde verilmiştir.
RCS otomatik testi: Tablo 2, sayfa 32, Tablo 3, sayfa **Error! Bookmark not defined.** veya Tablo 5 sayfa **Error! Bookmark not defined.** içinde belirtilen hacimleri geçerli olduğu şekilde kullanın.
 4. Yeni, tek kullanımlık bir kabı “Yüksek Risk HPV Prob Karışımı” olarak etiketleyin.
Test sayısına bağlı olarak 5 ml veya 15 ml tıklamalı kapaklı, yuvarlak altlı polipropilen bir tüp önerilir.
 5. Gereken miktarda Prob Seyrelticiyi (bakınız aşağıda Tablo 7) etiketli tüpe ekleyin.
 6. Gereken miktarda High-Risk HPV Probunu Prob Seyrelticiye (bakınız aşağıda Tablo 7) pipet ucunu tüpün iç duvarına karşı menisküsün hemen üzerine yerleştirip içindekileri dışarı vererek pipetleyin.
Önemli: Ucu Prob Seyrelticiye batırmayın.

Tablo 7. Prob Karışımı Hazırlama

Gereken Prob Karışımı Hacmi	Prob Seyreltici Hacmi	High-Risk HPV Probe (Yüksek Risk HPV Probu) Hacmi
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. İyice karıştırmak için maksimum hızda en az 5 saniye vorteksleyin.
Görünür bir vorteks oluşmalıdır.

Yıkama Tamponu

- Manuel test için, Yıkama Tamponunu hibrid yakalama adımına göre hazırlayın (bakınız "Hibrid yakalama," sayfa 51).
 - Maruz kalmayı minimuma indirmek üzere hazırlarken Yıkama Tamponu Konsantresine su ekleyin.
 - Manuel mikropilaka yıkama yöntemi için Yıkama Aygıtında 3 litre Yıkama Tamponu hazırlayın.
Öneri: Bakteri ve küflerde bulunan alkalin fosfatla olası kontaminasyonu önlemek için 3 ayda bir Yıkama Aygıtı ve tüpü %0,5 sodyum hipoklorür solüsyonuyla yıkayın ve distile veya deiyonize suyla iyice durulayın.
 - Automated Plate Washer için Yıkama Tamponunu hazırlayıp kapaklı bir kaptaki saklayın veya 1 litre hazırlayıp Automated Plate Washer yıkama rezervuarına yerleştirin.
 - RCS otomatik testi için, RCS Yıkama Şişesinde belirtilen miktarı hazırlayın (geçerli olduğu şekilde, bakınız Tablo 2, sayfa 32, Tablo 3, sayfa **Error! Bookmark not defined.** veya Tablo 5, sayfa **Error! Bookmark not defined.**).
1. Yıkama Tamponu Konsantresini iyice karıştırın ve gerekli Yıkama Tamponu Konsantresi hacmini belirtilen kaba ekleyin (bakınız aşağıda Tablo 8).
 2. Gerekli distile veya deiyonize su hacmini (bakınız aşağıda Tablo 8) belirtilen kaba ekleyin.

Tablo 8. Yıkama Tamponu Hazırlama

Gerekli Yıkama Tamponu Hacmi	Yıkama Tamponu Konsantresi Hacmi	Distile veya deiyonize su hacmi
1 litre	33.3 ml	966.7 ml
2 litre	66.6 ml	1933.4 ml
3 litre	100.0 ml	2900.0 ml
6 litre	200.0 ml	5800.0 ml

3. Kabın herhangi bir açıklığı üzerine temiz, az tiftikli kağıt havlu yerleştirin ve iyice karıştırın.
4. Kabı kontaminasyon veya buharlaşmayı önlemek için geçerli olduğu şekilde mühürleyin veya ilgili alete yerleştirin.
5. Yıkama Tamponunu yeni son kullanma tarihiyle etiketleyin.

Not: Hazırlandıktan sonra Yıkama Tamponu 2–30°C'de 3 ay stabildir.

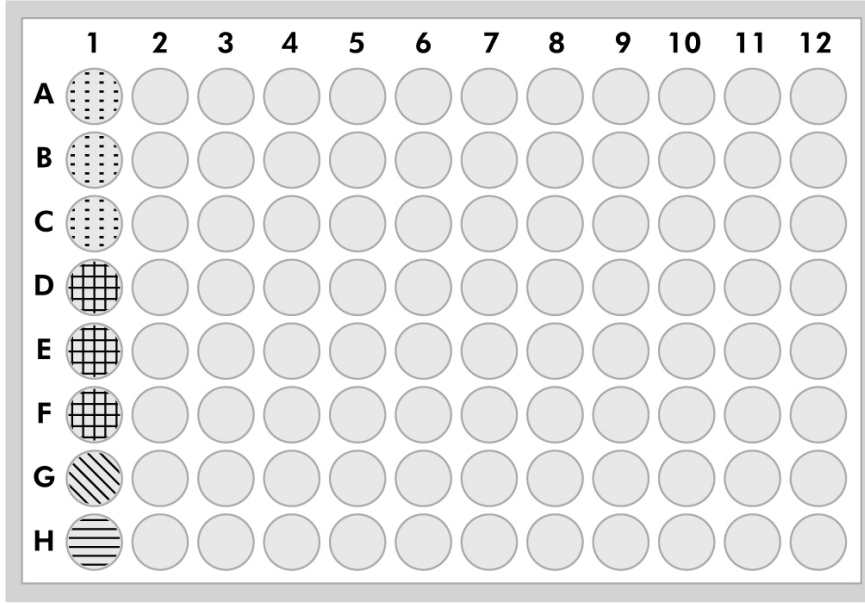
Plaka düzenini oluşturun

1. Plaka düzenini HPV için digene testi protokolleri ile digene test analizi yazılımını kullanarak oluşturun.

Kalibratörler, kalite kontroller ve numuneler için uygun pozisyonlarla bir plaka düzeni oluşturma talimatı için geçerli yazılım kullanıcı el kitabına başvurun.

Notlar:

- Kalibratörler, kalite kontroller ve numuneler bir 8 kuyulu sütun konfigürasyonunda çalışılır.
- Her test için kontroller mikrolakada şu pozisyonlarda test edilmelidir (bakınız Şekil 1, sayfa 38):
 - Negatif Kalibratör (NC) replikatları mikrolaka kuyuları A1, B1, C1 içinde
 - Yüksek Risk HPV Kalibratörü (HRC) replikatları mikrolaka kuyuları D1, E1, F1 içinde
 - Düşük Risk HPV Kalite Kontrol (QC1-LR) mikrolaka kuyusu G1 içinde
 - Yüksek Risk HPV Kalite Kontrol (QC2-HR) mikrolaka kuyusu H1 içinde



Şekil 1. Mikropalakada kalibratörler, kalite kontroller ve örneklerin pozisyonu.

Önemli: RCS otomatik testi yaparken, plaka düzenini oluşturmak ve sonuçları üretmek üzere RCS'ye spesifik test protokolleri kullanın. RCS'ye spesifik test protokollerinin tanımlanmış parametreleri manuel test analiz protokollerinden farklıdır (bakınız “Kesme Noktası Hesaplama,” sayfa 60).

2. Kalibratörler, kalite kontroller ve test edici numuneleri test edilecekleri sırayla bir numune toplama tüpü askısı veya numune askısına yerleştirin.

Önemli: RCS otomatik testi yaparken hatalı numune sonuçları bildirmeyi önlemek üzere plaka düzeninin test edilen doğru numunelere karşılık gelmesi çok önemlidir. Kullanılan her numune askısı ve kapağı için seri numaralarının eşleştiğini doğrulayın ve geçerli olduğu şekilde her numune askısı ve kapağı RCS'de test edileceği sırayla etiketleyin. 65°C su banyosunda silinmeyecek bir gazlı kalem ve etiket kullanın.


Örnek hazırlama

PreservCyt ve SurePath numuneleri *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test yapılması öncesinde örnek hazırlama gerektirir. Yapılan örnek hazırlığı tipine bağlı olarak hazırlanan örnekler *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin farklı adımları için hazırdır.

Mevcut örnek hazırlama yöntemleri şu şekildedir:


- PreservCyt numuneleri için QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama.
- QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numuneleri ve post-gradyent hücre peletlerinden otomatik örnek hazırlama.
- PreservCyt numuneleri için QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama.
- PreservCyt numuneleri için manuel örnek hazırlama
- SurePath post-gradyent hücre peletlerinden manuel örnek hazırlama

PreservCyt numuneleri için QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama


 PreservCyt örneklerini QIASymphony DSP HPV Media Kitini kullanarak hazırlama talimatı için QIASymphony DSP HPV Media Kiti Kullanma Talimatına (El Kitabı) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) başvurun.

Önemli: PreservCyt numunelerinden QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlanmasının sonucunda oluşan örnek ekstreleri sadece RCS kullanılarak test edilebilir. Testin örnek ekstreleriyle manuel olarak yapılması doğrulanmamıştır.

QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak PreservCyt numuneleri için örnek hazırlamanın sonucu ilk sütun boş olarak bir hibridizasyon mikropakasında örnek ekstreleridir. Örnek ekstreleri manyetik partiküller, STM ve DNR içerir ve RCS otomatik testinin denatürasyon adımına hazırdır. Kalibratörler, kalite kontroller ve örnek ekstreleri RCS otomatik testi sırasında hibridizasyon mikropakasında aynı anda denatüre edilir (bakınız “QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin denatürasyonu ve hibridizasyonu,” sayfa 43).


 QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin RCS otomatik testini yaparken tam test talimatı için Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı — QIASymphony SP İşlenmiş Örnekleri kullanarak *digene* HC2 DNA Testleri Yapma (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) belgesine başvurun.

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numuneleri ve SurePath post-gradyent hücre peletlerinden örnek hazırlama.


 QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath örnekleri ve SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri hazırlamak için *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)* (*QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti Kullanma Talimatına (El Kitabı)*) başvurun.

Önemli: SurePath numunelerinden QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlanmasının sonucunda oluşan örnek ekstraları sadece RCS kullanılarak test edilebilir. Testin örnek ekstralarıyla manuel olarak yapılması doğrudanmamıştır.

SurePath numunelerinin ve SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri ile QIASymphony DSP HPV ortam kiti kullanılarak örnek hazırlanmasının sonucu testin hibridizasyon adımı RCS otomatik testi için hazır bir hibridizasyon plakasında kalibratörler, kontroller ve örnek ekstralarıdır.


 QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin RCS otomatik testini yaparken tam test talimatı için Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı — QIASymphony SP İşlenmiş Örnekleri kullanarak *digene HC2 DNA Testleri Yapma (Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples)* belgesine başvurun.

PreservCyt numuneleri için QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama

 PreservCyt numuneleri için örnek hazırlama talimatı için QIASymphony DSP AXpH DNA Kit El Kitabına (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) bakın.

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak PreservCyt numuneleri için örnek hazırlamanın sonucu ilk sütun boş olarak bir hibridizasyon mikropakasında DNA elütleridir. DNA elütleri testin denatürasyon adımı için hazırdır. Kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütleri, hibridizasyon mikropakası üzerinde aynı zamanda denatüre edilir (bakınız “QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin denatürasyonu ve hibridizasyonu,” sayfa 43).

PreservCyt numuneleri için manuel örnek hazırlama

 PreservCyt numuneleri için manuel örnek hazırlama açısından *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına başvurun.

digene HC2 Sample Conversion Kiti kullanılarak PreservCyt numuneleri için manuel örnek hazırlama testin hibridizasyon adımı için hazır örneklerle sonuçlanır. Kalibratörler ve kalite kontrolleri ayrı hazırlayın (bakınız “Kalibratörler, kalite kontroller ve STM numunelerinin denatürasyonu,” sayfa 46)

SurePath post-gradiyent hücre örneklerinden manuel örnek hazırlama

SurePath post-gradiyent hücre peletlerinden manuel örnek hazırlama testin hibridizasyon adımı için hazır örneklerle sonuçlanır. Kalibratörler ve kalite kontrolleri ayrı hazırlayın (bakınız “Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens,” sayfa **Error! Bookmark not defined.**).

Önemli: SurePath numunesinin post-gradiyent hücre peleti 1 ml'den küçük gibiyse post-gradiyent hücre peleti *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi ile test edilmeye uygun olmayacaktır çünkü sitoloji sonrasında SurePath Koruyucu Sıvısı eklenmemiştir.

1. SurePath post-gradiyent hücre peletlerini oda sıcaklığına dengeleyin ve gözlenen sıvı hacminin yaklaşık 2,8 ml'ye eşit olduğunu doğrulayın.
2. SurePath post-gradiyent hücre peletlerini bir sallanan kova rotor içinde 10 ± 1 dakika boyunca $800 \pm 15 \times g$ hızında santrifüje edin
3. Tüpleri santrifüjden çıkarın.
4. Santrifügasyondan hemen sonra supernatanda dikkatle dekantasyon yapın ve fazla sıvıyı gidermek için her tüpü Kimtowels kağıt mendilleri veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havlulara yaklaşık 3 kez dokundurarak yavaşça kurutun. Her tüpteki peleti izleyin.
Önemli: Hücre peletlerinin havluya dokunma sırasında tüpte aşağı kaymasına izin vermeyin.
5. Tüpleri askıya yerleştirin.
6. Her pelete bir tekrarlayan veya tek kanallı pipet kullanarak 200 µl STM ekleyin.

7. Her peleti her tüpü ayrı olarak yüksek hızda 15 saniye vorteksleyerek tekrar süspansiyon haline getirin.

Peletin tekrar süspansiyon haline getirilmesi zorsa ek 5–30 saniye veya pelet tüp altından gevşeyip yüzer hale gelinceye ve çözünüyor gibi görününceye kadar vorteksleyin.

Not: Tüpler kapak kapatılmadan karıştırılabilir.

8. Her SurePath numunesine bir tekrarlayan veya tek kanallı pipet kullanarak 100 µl DNR pipetleyin.

Önemli: Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden tüpün kenarlarına dokunmamaya dikkat edin.

9. Her tüpü yüksek hızda 5 saniye ayrı olarak vorteksleyerek iyice karıştırın.

Not: Tüpler kapak kapatılmadan karıştırılabilir.

10. *digene* HC2 Sample Conversion Tüpleri veya 15 ml konik tüpleri geçerli numune tanımlamasıyla ve tipiyle etiketleyin (örneğin SurePath numune tipi için "SP") ve tüpleri bir tüp askısına yerleştirin.

Not: RCS otomatik testi için, *digene* HC2 Sample Conversion Tüpleri kullanılmalıdır.

11. Tüm hacmi geçerli bir 15 ml konik tüpe tek kullanımlık, 7 ml, standart uçlu bir transfer pipeti veya eşdeğeri kullanarak aktarın.

12. Konik tüplerin kapağını kapatın ve bir tüp askısına yerleştirin.

13. Tüpleri $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ su banyosunda 90 ± 5 dakika inkübe edin.

Not: Bu inkübasyon süresi diğer onaylı numune tipleri için gerekenden daha uzundur.

Eğer test aynı gün tamamlanacaksa, kalibratörler ve kalite kontrolleri denatüre edin (bakınız "Kalibratörler, kalite kontroller ve STM numunelerinin denatürasyonu," sayfa 46).

14. İnkübasyondan sonra tüp askısını su banyosundan çıkarın.

Bir numune askısı kullanılıyorsa, askı kapağını çıkarmadan önce soğumasına izin vermeyin.

Testle hemen devam edin veya askı kapağını ve DuraSeal tüp mühürleyici filmi çıkarın.

Not: Numune askısı soğursa tüpler askı kapağına yapışabilir ve daha sonra dökülebilir.

Hazırlanan SurePath örnekleri:

- Hemen test edilen ("Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sayfa 48 kısmına ilerleyin)
- Saklanan ("Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sayfa 47 kısmına bakınız)


QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin denatürasyonu ve hibridizasyonu

QIASymphony SP ile örnek hazırlamanın sonucu en azından hazırlanmış örnekleri içeren bir hibridizasyon mikropakasıdır.

Eğer PreservCyt örnekleri QIASymphony SP kullanılarak hazırlanmışlarsa hibridizasyon mikropakasının ilk sütunu boştur. Mikropakanın içeriği testin denatürasyon adımı için hazırdır. Kalibratörler ve kalite kontroller hibridizasyon mikropakasına manuel olarak veya RCS otomatik testi sırasında eklenir ve sonra denatürasyon adımı yapılır.

SurePath örnekleri veya SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri QIASymphony SP kullanılarak hazırlandıysa plakada hibridizasyon mikropakasının birinci sütununa pipetlenen kalite kontroller ve denatüre kalibratörler ile hazırlanmış örnekler vardır Mikropakanın içeriği testin hibridizasyon adımı RCS otomatik testi için hazırdır.

Önemli: QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlamanın bir sonucu olarak üretilen örnek ekstraları sadece RCS kullanılarak test edilebilir. Testin örnek ekstralarıyla manuel olarak yapılması doğrudanmamıştır.

 QIASymphony SP kullanılarak hazırlanan örneklerin RCS otomatik testini yaparken tam test talimatı için Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı — QIASymphony SP İşlenmiş Örnekleri kullanarak *digene* HC2 DNA Testleri Yapma (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) belgesine başvurun

Manuel test için kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütlerinin denatürasyonu

- Bu işlem QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak hazırlanan PreservCyt numunesi örneklerinin manuel test edilmesi için gereklidir. RCS otomatik testi yapılıyorsa tam test talimatı için Rapid Capture Sistemi Kullanıcı El Kitabı — QIASymphony SP İşlenmiş Örnekleri kullanarak *digene* HC2 DNA Testleri Yapma (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) belgesine başvurun.
 - Kalibratörler ve kalite kontrollerin denatürasyonu DNR kullanılarak yapılırken, DNA elütlerinin denatürasyonu DNR2 kullanılarak yapılır.
1. Her kalibratör ve kalite kontrolü maksimum ayarda 10 saniye vorteksleyin.

2. Her tüpü tüp kapağından materyali geri almak üzere ters çevirin.
3. Kalibratörden ve kalite kontrol tüplerinden kapakları çıkarın ve atın.
4. Tek kanallı bir pipet kullanarak boş hibridizasyon mikrolaka kuyusunun alt kısmına oluşturulan plaka düzenine göre geçerli kalibratör veya kalite kontrolden 50 µl miktarını ekleyin.

Kalibratör ve kalite kontroller ek testler için kullanılacaksa tüplere yeni numune toplama tüpü vidalı kapakları takın, yeni son kullanma tarihiyle etiketleyin ve 2–8°C sıcaklıkta saklayın.

Not: Açıldığında denatüre olmamış kalibratörler ve kalite kontroller 2–8°C'de 3 ay stabildir.

5. Hazırlanmış DNR ve DNR2'yi iyice vorteksleyin ve her birini uygun şekilde etiketlenmiş tek kullanımlık reaktif rezervuarına bölüntüleyin.

Önemli: Elüt mikrolakasının doğru sütununa doğru reaktif eklediğinizden emin olun.

6. 8 kanallı bir pipet kullanarak, kalibratörler ve kalite kontroller içeren hibridizasyon mikrolakasının ilk sütununa 25 µl DNR ekleyin.
7. 8 kanallı bir pipet kullanarak, bir DNA elütü içeren her hibridizasyon mikrolaka kuyusuna 25 µl DNR2 ekleyin.
8. Hibridizasyon mikrolakasını bir mikrolaka kapağı ile örtün ve Rotary Shaker I aletinde 1.100 ± 100 devir/dk hızında 30 saniye sallayın.
9. Mikrolakayı 65 ± 2°C sıcaklığa dengelenmiş Microplate Heater I içine yerleştirin ve sıçratmamaya dikkat edin. Hibridizasyon mikrolakasını 45 ± 5 dakika inkübe edin.
Bu inkübasyon sırasında Prob Karışımlarını hazırlayın (bakınız “Prob Karışımı,” sayfa 34).
10. Hibridizasyon mikrolakasını Microplate Heater I aletinden çıkarın.

Kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütleri denatürasyonu:

- Saklanabilirler (bakınız “DNA elütleri için isteğe bağlı durma noktası,” sayfa 44)
- Hemen test edilebilirler (“DNA elütlerinin hibridizasyonu,” sayfa 45 kısmına ilerleyin)

DNA elütleri için isteğe bağlı durma noktası

Denatüre edilmiş DNA elütleri, kalibratörler ve kalite kontroller dahil olarak ve mikrolaka kapağıyla kaplı şekilde 2–8°C'de 2 hafta saklanabilir.

DNA elütlerinin hibridizasyonu

1. Denatüre kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütlerini içeren hibridizasyon mikrolakası saklanmışsa mikrolaka kapağını çıkarın ve hibridizasyon mikrolakasının 20–25°C'ye dengelenmesini bekleyin.
2. Prob Karışımını iyice vorteksleyin ve tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına bölüntüleyin.
3. Prob Karışımından 25 µl miktarını 8 kanallı bir pipet ve her Prob Karışımı ekleme için yeni uçlar kullanarak her hibridizasyon mikrolaka kuyusuna dikkatle pipetleyin.
Geriyeye sıçramadan ve hibridizasyon mikrolaka kuyularının kenarlarına dokunmaktan kaçının.
4. Hibridizasyon mikrolakasını bir mikrolaka kapağı ile örtün ve Rotary Shaker I aletinde 1.100 ± 100 devir/dk hızında 3 ± 2 dakika sallayın.
Sallamadan sonra, kalibratörler, kalite kontroller ve DNA elütleri sarı renge dönmelidir.
Mor kalan örnekler uygun miktarda Prob Karışımı almamış olabilir. Mor kalan numunelere ek 25 µl Prob Karışımı koyun ve tekrar sallayın. Bir örnek bu işlemde sonra mor kalırsa numuneyi tekrar test edin.
5. Mikrolakayı 65 ± 2°C sıcaklığa dengelenmiş Microplate Heater I içine yerleştirin ve sıçratmamaya dikkat edin. Hibridizasyon mikrolakasını 60 ± 5 dakika inkübe edin.
6. Teste devam etmek için "Hibrid yakalama," sayfa 51 kısmına ilerleyin.

STM numunelerinin ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin denatürasyonu ve hibridizasyonu

- Manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerini test ederken örnekler için denatürasyon adımı gerekli değildir. Ancak test için gerekli kalibratörler ve kalite kontroller aşağıdaki talimata göre denatüre edilir.
- Bazı STM örnekleri DNR eklendiğinde renk değişikliklerini maskeleyebilecek kan veya diğer biyolojik materyal içerebilir. DNR eklenmeden önce koyu renkli numuneler bu adımda uygun renk değişimini vermeyebilir. Bu durumda uygun renk değişikliğinin görülmemesi test sonuçlarını etkilemez. Uygun karışım kalibratörler ve kalite kontrollerin renk değişimi gözlenerek doğrulanabilir.

Kalibratörler, kalite kontroller ve STM numunelerinin denatürasyonu

- Numune toplama cihazını numune tüpünden hiçbir zaman çıkarmayın.
- Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için tüm numune materyalinin DNR ile temas etmesi çok önemlidir. DNR eklemekten sonra karıştırma kritik bir adımdır.
- MST Vortexer 2 yöntemi ile denatüre edilen STM numuneleri için mutlaka sayfa **Error! Bookmark not defined.** içindeki "Bir mikropilaka ve Microplate Heater I kullanılarak hibridizasyon" yöntemini kullanılmalıdır. "Mikrotüpler ve su banyosu kullanarak hibridizasyon" yöntemi (sayfa **Error! Bookmark not defined.**) MST Vortexer 2 kullanılarak denatüre edilmiş STM numuneleri ile doğrulanmamıştır.

1. Tüplerden kapakları çıkarın ve atın.

Önemli: STM numune tüplerinden çıkarılan kapakları enfeksiyöz olabilir olarak düşünün (ek bilgi için bakınız "Uyarılar ve Önlemler," sayfa 21).

2. Belirtilen DNR hacmini (aşağıda bakınız Tablo 9) tüplere bir tekrarlayan veya ayarlanabilir pipet kullanarak pipetleyin.

Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden tüplerin kenarlarına dokunmamaya dikkat edin.

Önemli: 1 plakalı ve 4 plakalı kitler High-Risk HPV Kalibratörü için farklı hacimlere sahiptir. Doğru DNR hacmini eklediğinizden emin olun.

Not: Eklenen DNR hacmi tüpteki sıvı hacminin yarısına eşdeğerdir.

Tablo 9. DNR Eklenmesi

Kalibratör, kalite kontrol veya STM numunesi	Gerekli DNR hacmi
Negatif Kalibratör, 2 ml	1000 µl
Yüksek Risk HPV Kalibratör, 1 ml	500 µl
Yüksek Risk HPV Kalibratör, 2 ml	1000 µl
Düşük Risk HPV veya Yüksek Risk HPV Kalite Kontrol, 1 ml	500 µl
STM numunesi, 1 ml	500 µl

3. Tüpleri MST Vortexer 2 yöntemi veya manuel, ayrı tüp vorteksleme yöntemini kullanarak karıştırın.

MST Vortexer 2 yöntemi

- a. Tüpleri DuraSeal tüp mühürleyici filmle filmi numune askısındaki tüpler üzerine çekerek örtün.
- b. Askı kapağını film kaplı tüpler üzerine yerleştirin ve kapağı 2 yan klipsle yerine kilitleyin. Film kesme cihazı ile kesin.
- c. Kırmızı saplı kolu yatay pozisyonda olacak şekilde UP (YUKARI) hareket ettirin.

- d. Numune askısını MST Vortexer 2 kılavuzlarının içinde ve askının en büyük çentikli köşesi sağ ön köşede yer alacak şekilde sağlamca yerleştirin. Numune askısını kırmızı saplı kolu dikey pozisyona hareket ettirerek “down” (aşağı) konuma getirerek yerine sabitleyin.
- e. Hız ayarınının 100 (maksimum hız) olduğundan emin olun ve MST Vortexer 2 gücünü ON (AÇIK) hale getirin.
- f. Tüpleri 10 saniye boyunca vorteksleyin.
- g. MST Vortexer 2 gücünü OFF (KAPALI) duruma getirin.
- h. Numune Askısını MST Vortexer 2 üzerinden kırmızı saplı kolu yukarı kaldırarak çıkarın.

Manuel, ayrı tüp vorteksleme yöntemi

- a. Tüplerin yeni numune toplama tüpü vidalı kapaklarıyla tekrar kapaklarını kapatın.
- b. Her tüpü yüksek hızda 5 saniye ayrı olarak vorteksleyerek iyice karıştırın.
Önemli: Karıştırma sırasında tüpün tüm iç yüzeyini yıkayan görünür bir sıvı vorteksi gözlenmelidir.
- c. Her tüpün tüp içi kapak ve kenarı yıkamak için bir kez ters çevirin.
- d. Tüpü tekrar askıya koyun.

Sıvıdaki tüp mora dönmelidir.

4. Tüpleri bir askıda $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ su banyosunda 45 ± 5 dakika inkübe edin.

Manuel test için bu inkübasyon sırasında Prob Karışımlarını hazırlayın (bakınız “Prob Karışımı,” sayfa 34).

5. İnkübasyondan sonra tüpleri su banyosundan çıkarın.

Bir numune askısı kullanılıyorsa, askı kapağını çıkarmadan önce soğumasına izin vermeyin. Testle hemen devam edin veya askı kapağını ve DuraSeal tüp mühürleyici filmi çıkarın.

Not: Numune askısı soğursa tüpler askı kapağına yapışabilir ve daha sonra dökülebilir.

Kalibratörler, kalite kontroller ve STM numunelerinin denatürasyonu:

- Saklanan (“Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples,” sayfa 47 kısmına bakınız)
- Hemen test edilen (“Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples,” sayfa 48 kısmına ilerleyin)

Hazırlanmış STM örnekleri ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin isteğe bağlı durma noktası


Önemli: Denatüre numuneleri kuru buzda göndermeyin veya saklamayın.

Kalibratörler ve kalite kontroller dahil tüm hazırlanan numuneler gece boyunca 2–8°C veya 3 aya kadar –20°C sıcaklıkta saklanabilir. Her çözme döngüsünde oda sıcaklığında maksimum 2 saat olmak üzere maksimum 3 dondurma/çözme döngüsü kullanılabilir.

Numune askısında gece 2–8°C'de saklama için örnekleri DuraSeal tüp mühürleyici filmle örtün ve askı kapağını tekrar koyun.

Numune askısında –20°C'de saklamak için askı kapağını ve DuraSeal tüp mühürleyici filmi çıkarın ve tüplere geçerli bir kapak yerleştirin.

Hazırlanmış STM örnekleri ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin hibridizasyonu

 STM örnekleri veya manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin RCS otomatik testi yapılırken tam test için talimat açısından *Rapid Capture System User Manual (Rapid Capture System Kullanım Kılavuzu)* kısmına başvurun.

Denatüre edilmiş kalibratörler, kalite kontroller veya numuneler saklanmışsa, 20–25°C'ye dengelenmelerini bekleyin ve bir numune askısında saklanmışsa tüplerden kapakları çıkarıp atın.

- STM örnekleri ve manuel olarak hazırlanmış PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri için iki hibridizasyon yöntemi kullanılabilir: "Mikroplaka ve Microplate Heater I kullanarak Hibridizasyon" ve "Mikrotüpler ve su banyosu kullanılarak Hibridizasyon."
- MST Vortexer 2 yöntemi ile denatüre edilen STM numuneleri mutlaka sayfa **Error! Bookmark not defined.** içindeki "Bir mikroplaka ve Microplate Heater I kullanarak hibridizasyon" yöntemini kullanmalıdır. "Mikrotüpler ve su banyosu kullanarak hibridizasyon" yöntemi (sayfa **Error! Bookmark not defined.**) MST Vortexer 2 kullanılarak denatüre edilmiş STM numuneleri ile doğrulanmamıştır.
- Prob Karışımı visközdür. Prob Karışımının iyice karıştırıldığından ve her hibridizasyon mikroplaka kuyusu veya hibridizasyon mikrotüpüne gerekli miktarın tamamen verildiğinden emin olun.
- Örneği hibridizasyon plakası veya hibridizasyon mikrotüpüne aktarıırken hibridizasyon mikroplaka kuyularının veya hibridizasyon mikrotüplerinin yanlarına dokunmaktan kaçınınız çünkü örnekler dikkatli şekilde aktarılmazsa yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir. Hava kabarcıklarının oluşumunu sınırlayın. Çapraz kontaminasyondan kaçınmak açısından her aktarma için temiz, ekstra-uzun bir pipet ucu kullanın.

Bir mikrolaka ve Microplate Heater I kullanarak Hibridizasyon

1. Bir hibridizasyon mikrolakası alıp etiketleyin.
2. Aşağıdaki yöntemlerden birini kullanarak vorteksleyin:

Kalibratörler, kalite kontroller veya STM örneklerini MST Vortexer 2 ile

- a. Geçerli olduğu şekilde tüpleri DuraSeal tüp mühürleyici filmle kapatın ve askı kapağını numune askısında sabitleyin.
- b. Numune askısını maksimum hız ayarında en az 5 saniye vorteksleyin.
- c. Numune askısını hemen tezgah üstüne koyun ve sürgüleri serbest bırakın. Askı kapağını yaklaşık 1 cm kaldırın ve DuraSeal tüp mühürleyici filme yapışmış olabilecek herhangi bir tüpü serbest bırakmak üzere hafifçe sola ve sağa hareket ettirin. Askı kapağını numune askısından açıkta oluncaya kadar düz yukarı kaldırarak çıkarın.
- d. DuraSeal tüp mühürleyici filmi askı kapağından dikkatle soyarak çıkarın ve atın.

MST Vortexer 2 ile PreservCyt veya SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri

- a. Geçerli olduğu şekilde tüpleri DuraSeal tüp mühürleyici filmle kapatın ve askı kapağını numune askısında sabitleyin.
- b. Dönüştürme Askısını maksimum hız ayarında en az 10 saniye vorteksleyin.
- c. Numune askısını hemen tezgah üstüne koyun ve sürgüleri serbest bırakın. Askı kapağını yaklaşık 1 cm kaldırın ve DuraSeal tüp mühürleyici filme yapışmış olabilecek herhangi bir tüpü serbest bırakmak üzere hafifçe sola ve sağa hareket ettirin. Askı kapağını numune askısından açıkta oluncaya kadar düz yukarı kaldırarak çıkarın.
- d. DuraSeal tüp mühürleyici filmi askı kapağından dikkatle soyarak çıkarın ve atın.

Vorteksleyici ile herhangi bir örnek tüpü

- a. Her tüpü en az 5 saniye ayrı ayrı vorteksleyin.

3. EXPAND-4 pipetini veya ekstra uzun pipet uçlu tek kanallı bir pipet kullanarak her kalibratör, kalite kontrol veya örnekten 75 µl miktarını oluşturulan plaka düzenine göre boş bir hibridizasyon mikrolaka kuyusunun alt kısmına aktarın.

Örnekler saklanacaksa denatüre edilmiş kalibratörler ve kalite kontroller ve STM post-gradyent hücre peleti örneklerini yeni numune toplama tüpü vidalı kapaklarıyla kapatın ve her örnek için orijinal kapağı PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerine yerleştirin.

Not: Örnekleri "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", sayfa 47 içinde ayrıntıları verilen sınırlara göre saklayın

4. Son örneği aktardıktan sonra hibridizasyon mikrolakasını bir mikrolaka kapağıyla örtün ve 20–25°C'de 10 dakika inkübe edin.
5. Prob Karışımını iyice vorteksleyin ve tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına bölüntüleyin.
6. Prob Karışımından 25 µl miktarını 8 kanallı bir pipet ve her Prob Karışımı ekleme için yeni uçlar kullanarak her hibridizasyon mikrolaka kuyusuna dikkatle pipetleyin.
Geriye sıçramadan ve hibridizasyon mikrolaka kuyularının kenarlarına dokunmaktan kaçının.
7. Hibridizasyon mikrolakasını bir mikrolaka kapağı ile örtün ve Rotary Shaker I aletinde 1.100 ± 100 devir/dk hızında 3 ± 2 dakika sallayın.
Salladıktan sonra kalibratörler, kalite kontroller, STM örnekleri ve SurePath örnekleri sarıya dönmeli ve PreservCyt örnekleri pembeye dönmelidir.
Mor kalan örnekler uygun miktarda Prob Karışımı almamış olabilir. Mor kalan numunelere ek 25 µl Prob Karışımı koyun ve tekrar sallayın. Bir örnek bu işlemden sonra mor kalırsa numuneyi tekrar test edin.
8. Mikrolakayı 65 ± 2°C sıcaklığa dengelenmiş Microplate Heater I içine yerleştirin ve sıçratmamaya dikkat edin. Hibridizasyon mikrolakasını 60 ± 5 dakika inkübe edin.
9. Teste devam etmek için "Hibrid yakalama," sayfa 51 kısmına ilerleyin.

Mikrotüpler ve su banyosu kullanarak Hibridizasyon

1. Gereken miktarda temiz hibridizasyon mikrotüpünü etiketleyip mikrotüp askısına yerleştirin.
2. Her kalibratör, kalite kontrol ve örnek tüpünü örneği almadan önce ayrı ayrı en az 5 saniye vorteksleyin.
3. Ekstra uzun pipet uçlu tek kanallı bir pipet kullanarak her kalibratör, kalite kontrol veya örnekten 75 µl miktarını oluşturulan plaka düzenine göre geçerli bir hibridizasyon mikrotüpünün alt kısmına aktarın.
Örnekler saklanacaksa denatüre edilmiş kalibratörler ve kalite kontroller ve STM post-gradyent hücre peleti örneklerini yeni numune toplama tüpü vidalı kapaklarıyla kapatın ve her örnek için orijinal kapağı PreservCyt ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerine yerleştirin.
Not: Örnekleri "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", sayfa 47 içinde ayrıntıları verilen sınırlara göre saklayın.
4. Son numuneyi aktardıktan sonra hibridizasyon mikrotüplerini 20–25°C'de 10 dakika inkübe edin.
5. Prob Karışımını iyice vorteksleyin ve tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına bölüntüleyin.

6. Prob Karışımından 25 µl miktarını 8 kanallı bir pipet ve her sıra için yeni bir uç kullanarak her hibridizasyon mikrotüpüne dikkatle pipetleyin.

Geriyeye sıçramadan ve hibridizasyon mikrotüplerinin kenarlarına dokunmaktan kaçının.

Askıyı tüm hibridizasyon mikrotüplerinin doğru miktarda Prob Karışımı aldığından emin olmak için alttan inceleyin.

7. Hibridizasyon mikrotüplerini bir plaka mühürleyici ile örtün. Askı kapağını askının üstüne yerleştirin. Mikrotüp askısını 1.100 ± 100 devir/dk olarak ayarlanmış bir Rotary Shaker I cihazında 3 ± 2 dakika üzerinde sallayın.

Salladıktan sonra kalibratörler, kalite kontroller, STM örnekleri ve SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri sarıya dönmeli ve PreservCyt örnekleri pembeye dönmelidir..

Mor kalan örnekler uygun miktarda Prob Karışımı almamış olabilir. Mor kalan numunelere ek 25 µl Prob Karışımı koyun ve tekrar sallayın. Bir örnek bu işlemde sonra mor kalırsa numuneyi tekrar test edin.

8. Mikrotüp askısını 65 ± 2°C su banyosunda 60 ± 5 dakika inkübe edin.

Su banyosundaki su seviyesinin tüm hibridizasyon mikrotüp hacmini örtmeye yeterli olduğundan emin olun.

Not: Mikrotüp askısı su banyosunda yüzer.

9. Teste devam etmek için "Hibrid yakalama," sayfa 51 kısmına ilerleyin.

Hibrid yakalama

1. Plaka çerçevesinden gereken sayıda yakalama mikroplakası kuyusu dışında tümünü çıkarın.

2. Kullanılmamış yakalama mikroplaka kuyularını orijinal torbaya koyup tekrar mühürleyin.

3. Bir gazlı kalemle yakalama mikroplakasında geçerli bir tanımlayıcıyla her sütuna sırayla numara yazın ve etiketleyin.

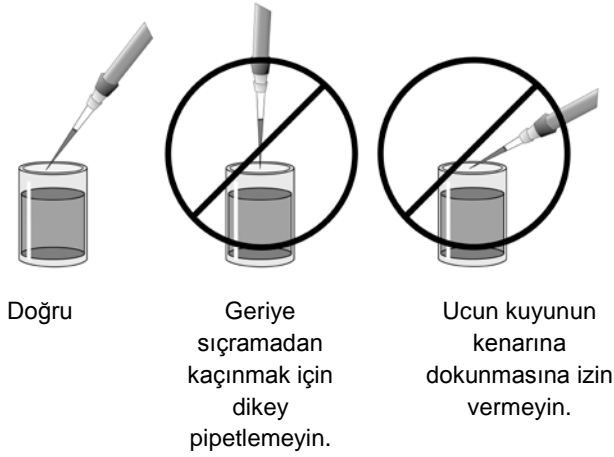
Numuneler yakalama mikroplaka kuyularına oluşturulan plaka düzenine göre eklenecektir.

4. Geçerli olduğu şekilde hibridizasyon mikroplakasını Microplate Heater I cihazından veya mikrotüp askısını su banyosundan dikkatle çıkarın.

Mikroplaka askısını hemen çıkarın ve temiz bir yüzeye yerleştirin veya askı kapağını çıkarın ve plaka mühürleyiciyi yukarıya ve mikrotüp askısı üzerine doğru yavaşça çekin.

5. 8 kanallı bir pipet kullanarak hibridizasyon mikroplaka kuyularının veya hibridizasyon mikrotüplerinin tüm içeriğini (yaklaşık 100 µl) karşılık gelen yakalama mikroplakası kuyularının alt kısmına aktarın.

Her transfer için yeni pipet uçları kullanın ve tam örnek transferi sağlamak üzere her pipet ucunun boşalmasını bekleyin. İsterseniz pipeti pipet uçlarının ortasını yakalama mikrolaka kuyularının üst kenarına dayayarak sabitleyin (bakınız Şekil 2, aşağıda).



Şekil 2. Doğru pipetleme

6. Yakalama mikrolakasını bir mikrolaka kapağı veya yeni bir plaka mühürleyici ile örtün ve Rotary Shaker I aletinde 20–25°C'de 1.100 ± 100 devir/dk hızında 60 ± 5 dakika sallayın. Bu inkübasyon sırasında Yıkama Tamponu hazırlayın (bakınız “Yıkama Tamponu,” sayfa 36).
7. Inkübasyon tamamlandığında yakalama mikrolakasını Rotary Shaker I'den çıkarın ve mikrolaka kapağı veya plaka mühürleyiciyi dikkatle çıkarın.
8. Sıvıyı yakalama mikrolaka kuyularından bir lavaboya dökerek giderin; yakalama mikrolakasını lavabo üzerinde tamamen ters çevirin ve aşağıya doğru bir hareketle iyice sallayın.
Önemli: Mikrolakayı tekrar düz çevirmeyin.
Lavabonun altına çok yakından dökerek geri sıçramaya neden olmadığınızdan emin olun.
9. Temiz Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer az tiftikli kağıt havlu ile 2–3 kez sıkıca dokunarak sıvıyı giderin.
Yakalama mikrolaka kuyularından tüm sıvının giderildiğinden ve yakalama mikrolakasının üstünün kuru olduğundan emin olun.
10. Teste devam etmek için “Hibrid saptama,” sayfa 53 kısmına ilerleyin

Hibrid saptama

- 8 kanallı bir pipet kullanarak soldan sağa yönde yakalama mikroplakası boyunca reaktif eklemelerini yapın. Uçları mikroplakaya iletim öncesinde fazla reaktifi gidermek üzere tek kullanımlık reaktif rezervuarına silin.
 - 8 kanallı pipet kullanılmıyorsa, bir tekrarlayan pipet onun yerine kullanılabilir. DR1'i gerekli hacmi tutmaya yetecek büyüklükte bir polipropilen tüp içine bölüntüleyin.
 - Reaktif iletiminin tutarlılığını arttırmak üzere ters pipetleme tekniğinin kullanılması önerilir. İşlem aşağıda tanımlanmıştır.
 - İsterseniz pipeti pipet uçlarının ortasını yakalama mikroplaka kuyularının üst kenarına dayayarak sabitleyin. Numunelerin çapraz-kontaminasyonu oluşabileceğinden yakalama mikroplaka kuyularının yanlarına dokunmadığınızdan emin olun (bakınız Şekil 2, sayfa 52)
1. DR1'i iyice karıştırın ve ilgili hacmi (geçerli olduğu şekilde, bakınız Tablo 1, sayfa 31 veya Tablo 4, sayfa 32) temiz, tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına dikkatle aktarın.
 2. Her yakalama mikroplaka kuyusuna ters pipetleme tekniğini kullanarak aşağıdaki gibi 75 µl DR1'i dikkatle pipetleyin:
 - a. 8 kanallı pipete uçları takın; tüm uçların sıkıca oturduğundan emin olun.
 - b. Pipet pistonunu birinci durma noktasının ötesine ikinci durma noktasına itin.
 - c. Uçları reaktife batırın.
 - d. Pistonu yavaşça serbest bırakın ve reaktifin uçları doldurmasını bekleyin.
 - e. Reaktif mikroplaka kuyularına pistonu birinci durma noktasına iterek verin. Pistonu pipet uçları reaktif içine batmadan serbest bırakmayın.
 - f. Tüm mikroplaka kuyuları doluncaya kadar uçları tekrar doldurun ve tekrarlayın.
- Pembe renk şiddetini gözleyerek tüm yakalama mikroplaka kuyularının dolduğunu doğrulayın. Tüm yakalama mikroplaka kuyularında benzer bir pembelik şiddeti olmalıdır.
3. Yakalama mikroplakasını bir mikroplaka kapağı, temiz Parafilm veya eşdeğeriyle örtün ve 20–25°C'de 30–45 dakika inkübe edin.
 4. Teste devam etmek için "Yıkama," sayfa 54 kısmına ilerleyin.

Yıkama

Yıkama mikroplakasını aşağıdaki yöntemlerden birini kullanarak yıkayın

Otomatik Plaka Yıkayıcı yöntemi

Automated Plate Washer gücünü daima AÇIK olarak tutun. Durulama rezervuarının dolu ve atık rezervuarının boş olduğundan emin olun. Automated Plate Washer, sistemi temizlemek için rutin olarak durular. Daha ileri talimat için Automated Plate Washer Kullanıcı El Kitabına (*Automated Plate Washer User Manual*) başvurun

- Yıkama rezervuarının en az 1 litre Yıkama Tamponuyla doldurulmuş olduğunu doğrulayın. Değilse, Yıkama Tamponunu hazırlayın (bakınız “Yıkama Tamponu,” sayfa 36).
 - Durulama rezervuarının deiyonize veya distile suyla doldurulmuş olduğunu doğrulayın.
 - Atık rezervuarının boş ve kapağın sıkıca takılmış olduğunu doğrulayın.
 - Automated Plate Washer her yıkamadan önce otomatik olarak sıvı doldurur ve her yıkamadan sonra durulama yapar.
 - Sadece kısmi bir yakalama mikroplaka kuyusu stripi kullanılıyorsa, yıkama öncesinde stripi tamamlamak için boş mikroplaka kuyularını plaka çerçevesine yerleştirin
1. Mikroplaka kapağını çıkarın ve yakalama mikroplakasını Automated Plate Washer platformuna yerleştirin.
 2. Otomatik Plaka Yıkayıcının AÇIK olduğunu ve ekranın **Digene Wash Ready** (Digene Yıkamaya Hazır) veya **P1** gösterdiğini doğrulayın.
 3. Yıkanacak strip sayısını **Rows** (Sıralar) düğmesine basıp ayarlamak için seçin ve **+** veya **-** kullanın.
 4. **Digene Wash Ready** veya **P1** kısmına dönmek için **Rows** düğmesine basın.
 5. Başlamak için **Start/Stop** (Başlat/Durdur) düğmesine basın.

Automated Plate Washer yaklaşık 10 dakika sürecek şekilde 6 doldurma ve aspirasyon döngüsü gerçekleştirecektir. Program sırasında kısa süre duraklama olacaktır; mikroplakasını erken çıkarmayın.

Automated Plate Washer yıkaması bittiğinde “Digene Wash Ready” veya “P1” gösterecektir.
 6. Program bittiğinde yakalama mikroplakasını Otomatik Plaka Yıkayıcı platformundan çıkarın. Yakalama mikroplakası beyaz görünmeli ve yakalama mikroplaka kuyularında kalan pembe sıvı bulunmamalıdır.
 7. Teste devam etmek için “Sinyal amplifikasyonu,” sayfa 56 kısmına ilerleyin.

Manuel yıkama yöntemi

1. DR1'i yakalama mikropalakası kuyularından yakalama mikropalakasının üstüne temiz Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havlular koyarak giderin.
2. Kağıt havluların yakalama mikropalakasının tüm yüzey alanına temas ettiğinden emin olun ve dikkatle ters çevirin.
3. Yakalama mikropalakasının 1–2 dakika boşalmasını bekleyin.
4. Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havlular üzerinde iyice dokunarak kurutun.

Alkale fosfataz kontaminasyonundan kaçınmak için kullanılmış kağıt havluları dikkatle atın.

5. Yıkama Aygıtını kullanarak yakalama mikropalakasını manuel olarak 6 kez yıkayın.
Uygun şekilde yıkamak için her yakalama mikropalakası kuyusunu Yıkama Tamponuyla taşacak şekilde doldurun. Bu işlem yakalama mikropalaka kuyularının üstlerinden DR1'i giderecektir. Yıkama yakalama mikropalakası A1'de başlar ve sağa ve aşağıya olmak üzere yılan şeklinde devam eder. Tüm yakalama mikropalaka kuyuları dolduğunda sıvıyı lavaboya kuvvetli aşağıya doğru hareketle boşaltın. İkinci yıkama yakalama mikropalaka kuyusu H12'de başlar ve sola ve yukarıya yılan gibi hareketle devam eder. Bu 2 yıkama dizisi yakalama mikropalaka kuyusu başına toplam 6 yıkama olacak şekilde 2 kez daha tekrarlanır.
6. Yıkama sonrasında yakalama mikropalakasını temiz Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer az tiftikli kağıt havlu üzerine ters çevirerek ve 3–4 kez kuvvetle vurarak sıvıyı giderin. Kağıt havluları değiştirip tekrar sıvıyı giderin.
7. Yakalama mikropalakası ters çevrilmiş olarak 5 dakika boşalmasını bekleyin. Yakalama mikropalakasını bir kez daha bu şekilde kurutun.
Yakalama mikropalakası beyaz görünmeli ve yakalama mikropalaka kuyularında kalan pembe sıvı bulunmamalıdır.
8. Teste devam etmek için "Sinyal amplifikasyonu," sayfa 56 kısmına ilerleyin.

Sinyal amplifikasyonu

- DR2 kullanmak için yeni bir eldiven çifti kullanın.
 - 8 kanallı bir pipet kullanarak soldan sağa yönde yakalama mikroplakası boyunca reaktif eklemelerini yapın.
 - 8 kanallı pipet kullanılmıyorsa, bir tekrarlayan pipet onun yerine kullanılabilir. DR2'yi gerekli hacmi tutmaya yetecek büyüklükte bir polipropilen tüp içine bölüntüleyin.
 - DR2'yi kesintisiz olarak ekleyin. Tüm yakalama mikroplaka kuyularının inkübasyon süresi mümkün olduğunca aynı olmalıdır.
 - Numunelerin çapraz kontaminasyonu oluşabileceğinden yakalama mikroplaka kuyularının yanlarına dokunmamaya veya pipet uçlarına reaktif sıçratmamaya dikkat edin (bakınız Şekil 2, sayfa 52).
1. DR2'yi iyice karıştırın ve ilgili hacmi (geçerli olduğu şekilde, bakınız Tablo 1, sayfa 31 veya Tablo 4, sayfa 32) temiz, tek kullanımlık bir reaktif rezervuarına aktarın.
 2. Her mikroplaka kuyusuna daha önce tanımlanan ters pipetleme tekniğini kullanarak 75 µl DR2'yi dikkatle pipetleyin (bakınız "Hibrid saptama," sayfa 53).

Sarı renk şiddetini gözleyerek tüm yakalama mikroplaka kuyularının doğru şekilde doldurulduğunu doğrulayın; tüm yakalama mikroplaka kuyularının benzer bir sarılık şiddeti olmalıdır.
 3. Yakalama mikroplakasını bir mikroplaka kapağıyla örtün ve 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin (en fazla 30 dakika inkübasyon).

Önemli: Doğrudan güneş ışığından kaçının.
 4. Teste devam etmek için "Yakalama mikroplakasını ölçme ve sonuç oluşturma," sayfa 57 kısmına ilerleyin.

Yakalama mikroplokasını ölçme ve sonuç oluşturma

1. Yakalama mikroplokasını bir DML aleti kullanarak ölçün.

Bir yakalama mikroplokasını ölçmek ve test sonucu raporları oluşturmanın ayrıntıları konusunda ilgili yazılım kullanıcı kılavuzuna başvurun. *digene* test analiz yazılımı ilgili test bilgilerinin girilmesini mümkün kılar.

2. Bir tam yakalama mikroploka kullanılmadıysa, kullanılmış yakalama mikroploka kuyularını mikroploka çerçevesinden çıkarın, mikroploka çerçevesini distile veya deiyonize suyla iyice durulayın, kurutun ve sonraki test için ayırın.
3. Tüm kullanılmış bölüntüler ve hazırlanmış reaktifleri aksi belirtilmedikçe atın.
Őřede kalan DNR'yi ulusal ve yerel laboratuvar işlemlerine göre atmadan önce seyreltin.

Sonuçların Yorumlanması

digene HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi kesme noktası olan 1 pg/ml, test başına 5.000 HPV kopyası veya 100.000 HPV kopya/ml değerlerine eşdeğerdir.

STM numune testi sonuçları

RLU/CO değeri $\geq 1,0$ olan STM numuneleri HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'in biri veya birkaçı için "positive" (pozitif) kabul edilir.

RLU/CO değeri $< 1,0$ olan STM örnekleri test edilen 13 HPV tipi için "negative" (negatif) veya "no HPV DNA detected" (HPV DNA saptanmadı) kabul edilir. Yüksek risk HPV DNA dizileri yoktur veya HPV DNA seviyeleri testin saptama limitinin altındadır.

SurePath numune testi sonuçları

RLU/CO değeri $\geq 1,0$ olan SurePath numuneleri HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'in biri veya birkaçı için "positive" (pozitif) kabul edilir.

RLU/CO değeri $< 1,0$ olan SurePath örnekleri test edilen 13 HPV tipi için "negative" (negatif) veya "no HPV DNA detected" (HPV DNA saptanmadı) kabul edilir. HPV DNA sekansları yoktur veya HPV DNA düzeyleri testin saptama sınırının altındadır.

PreservCyt numune testi sonuçları

RLU/CO değeri $\geq 1,0$ olan PreservCyt numuneleri HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'in biri veya birkaçı için "positive" (pozitif) kabul edilir.

RLU/CO değeri $< 1,0$ olan PreservCyt örnekleri test edilen 13 HPV tipi için "negative" (negatif) veya "no HPV DNA detected" (HPV DNA saptanmadı) kabul edilir. HPV DNA sekansları yoktur veya HPV DNA düzeyleri testin saptama sınırının altındadır.

RLU/CO değeri $\geq 1,0$ ve $< 2,5$ olan PreservCyt numuneleri için QIAGEN numunenin aşağıdaki gibi tekrar test edilmesini önerir:

- İlk tekrar test RLU/CO $\geq 1,0$ ise numuneyi "positive" (pozitif) olarak bildirin. Başka test gerekmez.

- İlk tekrar test RLU/CO <1,0 ise ikinci bir tekrar test (üçüncü sonuç) gereklidir. İkinci sonuç son sonuçtur (<1,0 negatif, ≥1,0 pozitif) ve bildirilir.

RLU/CO değeri 1,0'a yakın

Bir numunenin RLU/CO değeri 1,0'a yakın ama daha düşükse ve yüksek risk HPV enfeksiyonundan şüpheleniliyorsa alternatif test yöntemleri ve/veya tekrarlanan bir numune kullanmayı düşünün.

Diğer HPV tipleri

Bu test sadece yüksek risk HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 saptadığında numunede diğer düşük risk HPV tiplerinin bulunabileceğine dikkat edin. Özellikle cinsel olarak bulaşan düşük risk HPV varlığı için test yapılıyorsa, düşük ve yüksek risk HPV DNA tiplerini saptayan *digene* HC2 HPV DNA Testi kullanılması gerekir.

Test Kalibrasyonu Doğrulama

Reaktifler, kalibratörler ve kalite kontrollerin doğru şekilde çalıştığı ve doğru bir şekilde test CO belirlenmesini mümkün kıldığından emin olmak üzere test kalibrasyonu doğrulaması yapılır. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA testi için her testten önce test kalibrasyonu gerekir; bu nedenle her testi doğrulamak gereklidir. Bu doğrulama işleminin dahili kalite kontrol testinin yerini alması amaçlanmamıştır. Test kalibrasyonu ve kalite kontroller için kabul edilebilir aralıklar sadece QIAGEN tarafından onaylanmış DML aletleri için belirlenmiştir.

Test kalibrasyonu *digene* test analizi yazılımı tarafından otomatik olarak yapılır ve veri analizi raporuna yazdırılır. Ancak *digene* Qualitative Yazılımı versiyon 1.03 veya öncesi bulunan kullanıcılar hasta sonuçlarının bildirilebilmesinden önce test kalibrasyonu doğrulamayı manuel olarak yapmalıdır. Daha fazla bilgi için QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun.

Test belirlenmiş test kalibrasyonu kriterlerini karşılamalıdır. Aşağıdaki kriterlerden herhangi biri geçersizse yazılım numune sonuçlarını yorumlamaz.

Negatif kalibratör

NC her test ile üçlü olarak test edilmelidir. NC ortalaması ≥10 ve ≤250 RLU ve varyasyon katsayısı (CV) ≤%25 olmalıdır. CV >%25 ise, yazılım ortalamadan en uzak RLU değerini bir

dışarıda kalan olarak kaldırır ve ortalama ve CV değerlerini kalan değerleri kullanarak tekrar hesaplar.

CV halen >%25 ise test kalibrasyonu geçersizdir ve test tüm hasta numuneleri için tekrarlanmalıdır. Bu nedenle hasta numune sonuçlarını bildirmeyin.

Pozitif kalibratör

HRC her test ile üçlü olarak test edilmelidir. HRC için CV \leq %15 olmalıdır. Eğer CV >%15 ise, yazılım ortalamadan en uzak RLU değerini bir dışarıda kalan olarak kaldırır ve ortalama ve CV değerlerini kalan değerleri kullanarak tekrar hesaplar.

CV halen >%15 ise test kalibrasyonu geçersizdir ve test tüm hasta numuneleri için tekrarlanmalıdır. Bu nedenle hasta numune sonuçlarını bildirmeyin.

Pozitif kalibratör ortalaması / negatif kalibratör ortalaması

Yazılım $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ hesaplamak için $HRC\bar{X}$ ve $NC\bar{X}$ değerlerini kullanır. Geçerli bir $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$ olarak tanımlanır.

Eğer $HRC\bar{X}/NC\bar{X} < 2,0$ veya > 15 ise test kalibrasyonu geçersizdir ve test tüm hasta numuneleri için tekrarlanmalıdır. Bu nedenle hasta numune sonuçlarını bildirmeyin

Kesme Noktası Hesaplama

digene test analizi yazılımı tüm numuneler için RLU/CO ve pozitif/negatif sonuçlar değerlerini hesaplar ve bildirir. Pozitif numuneleri belirlemek için CO, HRC'dir \bar{X} . *digene* test analizi, sonuçları numune RLU/CO olarak ifade etmek üzere numune RLU değerlerini kullanır.

RCS otomatik testi için, RCS HPV test protokolü geçerli HRC değerine 0,8 şeklinde bir kalibrasyon ayarlama faktörü (CAF) uygular. \bar{X} Bu CAF RCS otomatik testin performans özellikleri manuel teste eşdeğer kalması için gereklidir. CAF sadece RCS otomatik test sonuçlarına uygulanır; bu nedenle doğru test sonuçları oluşturmak için doğru test protokolünün seçilmesi çok önemlidir.

Kalite Kontroller

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle kalite kontrol örnekleri sağlanmıştır ve dahili kalite kontrol için kullanılmalı gerekir. Sağlanan kalite kontroller klonlanmış HPV DNA hedefleridir ve

vahşi tip HPV'den türetilmemiştir. Bu, sağlanan kalibratörler için kullanılan materyal tipiyle aynıdır. Ulusal veya yerel düzenlemeler veya akreditasyon organizasyonlarının kılavuz ilkeleri veya gerekliliklerine göre ek kalite kontroller test edilebilir. Sağlanan kalite kontroller PreservCyt Solüsyonu veya SurePath Koruyucu Sıvısı işlenmesi için uygun bir kalite kontrol görevi görmez.

Kalite kontrollerin lot numaraları ve son kullanma tarihlerini girmeye ilgili talimat için geçerli *digene* test analizi yazılımı kullanıcı el kitabına başvurun. Testin geçerli olabilmesi için her kalite kontrol RLU/CO değeri aşağıda Tablo 10'te belirtildiği gibi tanımlanmış kriterlere uymalıdır.

Kalite kontroller bu aralıklar dahilinde değilse, test geçersizdir ve tekrarlanmalıdır. Bu nedenle hasta sonuçlarını bildirmeyin.

Tablo 10. Kalite kontrol testi geçerlilik kriterleri

Kalite kontrol	Minimum (RLU/CO)	Maksimum (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Sınırlamalar

- HPV tipleri 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68 için *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin cinsel istismar şüphesinin değerlendirilmesinde kullanılması önerilmez.
- Bir popülasyonda HPV enfeksiyonu prevalansı performansı etkileyebilir. Düşük prevalanslı popülasyonlar veya enfeksiyon riski olmayan bireyler test edilirken pozitif prediktif değerler azalır.
- Negatif bir test HPV enfeksiyonu olasılığını ortadan kaldırmaz çünkü çok düşük enfeksiyon seviyeleri veya örnekleme hatası yalancı negatif bir sonuca neden olabilir. Ayrıca bu test HPV düşük risk tiplerinin (6, 11, 42, 43 ve 44) DNA'sını saptamaz.
- HPV enfeksiyonu yüksek dereceli servikal hastalık varlığının kesin bir göstergesi değildir ve ayrıca tüm durumlarda yüksek dereceli servikal hastalık veya kanser gelişeceği anlamına gelmez.
- Yüksek Risk HPV Probu ve HPV tipleri 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ve MM9 arasında az miktarda çapraz hibridizasyon vardır. Bu HPV tiplerinin yüksek seviyelerini içeren numuneleri olan hastalar yanlışlıkla kolposkopiye sevk edilebilir (15, 35).
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi 39, 58, 59 ve 68 dahil yüksek risk HPV tipleriyle saptamak üzere tasarlanmıştır. QIAGEN tarafından klonlanmış HPV plazmid DNA'sı kullanılarak yapılan analitik çalışmalar bu testin 0,62 pg/ml ile 1,39 pg/ml arasındaki konsantrasyonlarda bu tipleri saptadığını göstermiştir. Bu durum *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi tarafından hedeflenen diğer HPV tiplerinin saptama özelliklerine eşdeğerdir. QIAGEN bu HPV tiplerinin saptanmasını sadece sınırlı sayıda klinik numunede doğrulayabilmiştir. Bu tiplerin genel popülasyonda düşük prevalansı nedeniyle (28) *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin HPV tipleri 39, 58, 59 ve 68'in saptanması bakımından performans özellikleri istatistiksel olarak doğrulanmamıştır.
- Bir numune STM testi için alınırken yüksek konsantrasyonlarda antifungal krem, kontraseptif jöle ve vajinal yıkama sıvısı bulunursa bu numuneler test CO miktarına yakın RLU/CO değerleri veren HPV DNA seviyeleri içerirlerse bir yalancı negatif sonuç elde etmek olasılığı vardır.
- QIASymphony DSP HPV Media Kiti ile örnek hazırlama için bir PreservCyt servikal numunenin alındığı zamanda yüksek konsantrasyonlarda antifungal krem, vajinal kayganlaştırıcı jöle veya kan mevcutsa bu numuneler test CO miktarına yakın RLU/CO değerleri veren HPV DNA seviyeleri içerirlerse bir yalancı negatif sonuç elde etmek olasılığı vardır.
- QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti ile örnek hazırlama için bir PreservCyt servikal numunenin alındığı zamanda kontraseptif jöle mevcutsa bir yalancı negatif test sonucu oluşabilir.

-
- Eğer QIASymphony DSP HPV Ortam Kitiyle SurePath servikal numunesinin örnek hazırlama için alındığı zamanda kontraseptif jöle, antifungal krem veya antienflamatuar krem mevcutsa yalancı negatif test sonucu oluşabilir.
 - Yüksek Risk HPV Probu ile plazmid pBR322 arasında çapraz reaktivite mümkündür. pBR322 homolog sekanslarının varlığı insan genital numunelerinde bildirilmiştir ve yüksek bakteriyel plazmid seviyeleri varlığında yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir.
 - RCS otomatik testi yaparken uygun numune transferinden emin olmak üzere hibridizasyon plakasını görsel olarak incelemek ve herhangi bir yetersiz numune transferini düzeltmemek yalancı negatif sonuçlara yol açabilir.

Performans Özellikleri

Hasta yönetimi için risk değerlendirmesine yardımcı olarak normal Pap yayma sonuçları olan hastaları tararken klinik performans

Amerika Birleşik Devletleri ve dış ülkelerde önde gelen tıbbi, akademik ve resmi kurumlarda yapılan 8 bağımsız klinik çalışmanın sonuçları aşağıda tanımlanmıştır. Çalışmalar, çalışmanın yapıldığı ülkelerde kullanımda olan yerleşmiş Pap yöntemlerini kullanılmıştır. İki vaka dışında, tüm vakalarda Pap sonuçlarını yorumlamak için Bethesda Derecelendirme Sistemi kullanılmıştır. Avrupa Topluluğunda servikal kanser tarama eşdeğer terminolojisi için European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer (36) belgesine başvurun. Ayrıca yüksek dereceli servikal hastalığa her çalışma için kolposkopinin yönlendirdiği biyopsi kullanımıyla tanı konmuştur. Bu çalışmalar daha yaşlı kadınlarda (genel olarak 30 yaş üstü) Pap smear ile karşılaştırıldığında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin klinik faydasını değerlendirmiştir. Bir çalışma dışında hepsi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi kullanarak prospektif HPV testi de yapmıştır.

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

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testinin 6 çapraz kesit çalışmasında gözlenen performansı yaşı 30 ve üzerinde olan ve servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) 3 veya üstü olarak tanımlanan histolojik olarak doğrulanmış yüksek evre servikal neoplazi tanısı konmuş kadınlar için özetlenmiştir (bakınız aşağıda Tablo 11 ve 12).

Tablo 11. Performans tahminleri — hassasiyet ve özgüllük

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

* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test verileri mevcut olduğunda kullanılmıştır, aksi halde HCS verileri kullanılmıştır; veriler kombine edilmiştir.

Tablo 12. Performans tahminleri — pozitif ve negatif prediktif değer

Popülasyon	n	Pozitif prediktif değer (%)				Negatif prediktif değer (%)		
		Prevalans (%)	(n/N) %95 CI			(n/N) %95 CI		
		CIN 3	Sadece Pap	Sadece HPV	HPV + Pap	Sadece Pap	Sadece HPV	HPV + Pap
Batı Avrupa 1	7592	0.36 (27/7592) 0.23–0.52	11.1 (14/126) 6.2–17.9	8.23 (26/316) 5.5–11.8	6.77 (27/399) 4.5–9.7	99.83 (7453/7466) 99.7–99.9	99.99 (7275/7276) 99.9–100.0	100.0 (7193/7193) 99.9–100.0
Latin Amerika 1	6115	1.26 (77/6115) 0.99–1.57	37.2 (45/121) 28.6–46.4	16.5 (73/442) 13.2–20.3	15.8 (75/476) 12.6–19.4	99.47 (5962/5994) 99.3–99.6	99.93 (5669/5673) 99.8–100.0	99.96 (5637/5639) 99.9–100.0
Latin Amerika 2*	6176	1.10 (68/6176) 0.86–1.39	12.7 (53/416) 9.7–16.3	14.3 (61/427) 11.1–18.0	9.4 (64/682) 7.3–11.8	99.74 (5745/5760) 99.6–99.9	99.88 (5742/5749) 99.8–100.0	99.93 (5490/5494) 99.8–100.0
Afrika	2925	3.66 (107/2925) 3.01–4.40	19.1 (90/472) 15.6–22.9	14.5 (96/661) 11.9–17.4	12.9 (99/765) 10.6–15.5	99.31 (2436/2453) 98.9–99.6	99.51 (2253/2264) 99.1–99.8	99.63 (2152/2160) 99.3–99.8
Asya	1936	2.17 (42/1936) 1.57–2.92	8.37 (41/490) 6.1–11.2	11.5 (42/364) 8.4–15.3	6.47 (42/649) 4.7–8.7	99.93 (1445/1446) 99.6–100.0	100.0 (1572/1572) 99.8–100.0	100.0 (1287/1287) 99.7–100.0
ABD 1	1040	0.19 (2/1040) 0.02–0.69	3.85 (1/26) 0.1–19.6	4.88 (2/41) 0.6–16.5	4.08 (2/49) 0.5–14.0	99.90 (1013/1014) 99.5–100.0	100.0 (999/999) 99.6–100.0	100.0 (991/991) 99.6–100.0

* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test verileri mevcut olduğunda kullanılmıştır, aksi halde HCS verileri kullanılmıştır; veriler kombine edilmiştir.

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

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testinin özgüllüğü tek başına Pap'tan düşük olsa da olasılık oranı analizi gözlenen özgüllük azalmasının testi servikal hastalık bulunması veya geliştirme açısından riski olmayan veya çok düşük olan kadınları tanımlamak için kullanmanın klinik faydasını etkilemeye yetecek kadar anlamlı olmadığını göstermiştir. Yine de doktorun tüm klinik ve risk bilgisi ve mevcut hasta geçmişi göre bir hastayı kolposkopiye sevk etme kararı verebilmesi önemlidir. Önemli değişkenler arasında HPV enfeksiyonu ve/veya anormal Pap smear öyküsü, ilk cinsel ilişki yaşı, cinsel partner sayısı ve eşzamanlı cinsel yoldan bulaşan hastalıklar vardır (37, 38).

Yüksek evre hastalık prevalansı performansın belirlendiği çalışmalar arasında anlamlı ölçüde farklılık göstermese de bir popülasyondaki HPV enfeksiyonu prevalansı performansı etkileyebilir

ve tipik olarak hasta popülasyonuna göre değişir. Ayrıca, HPV enfeksiyonu prevalansının yaşla dramatik olarak azaldığı gösterilmiştir (17, 24–29, 38–40). Düşük prevalanslı popülasyonlar veya enfeksiyon riski olmayan bireyler test edilirken pozitif prediktif değerler azalır.

İki çalışmanın sonuçları kullanılarak bir longitudinal analiz yapılmıştır; bunlardan biri Amerika Birleşik Devletlerinde Oregon'da Portland'da National Cancer Institute (Ulusal Kanser Enstitüsü, NCI) tarafından ve diğeri Fransa'da Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims kuruluşunda yapılmıştır. Bu longitudinal analizler Pap-negatif/HPV-negatif hastaların HPV durumu bilinmeyen geleneksel olarak tanımlanmış düşük riskli kadınlar ve Pap-negatif/HPV-pozitif hastalara göre servikal hastalık bulunması riskinin daha düşük olduğunu göstermek üzere yapılmıştır (bakınız aşağıda Tablo 13 ve 14).

Tablo 13. Longitudinal analiz — yüksek evre hastalık için relatif risk

Çalışma grubu	Yaş	Düşük risk sınıflandırması	n	CIN 3+ Vakalar	Oran (100 hasta yılı için)	Relatif risk %95 CI
NCI	30 ve üstü	Pap normal, HPV negatif	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Daha sonra normal Pap'lar*	9429	19	0.048	1.000
	Hepsi	Pap normal, HPV negatif	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Daha sonra normal Pap'lar*	13,392	44	0.082	1.000
Fransa	30 ve üstü	Pap normal, HPV negatif	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Daha sonra normal Pap'lar†	2026	4	0.099	1.000
	Hepsi	Pap normal, HPV negatif	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Daha sonra normal Pap'lar†	2650	7	0.136	1.000

* Yaklaşık 2 yılda üç normal Pap.

† Yaklaşık 2 yılda iki normal Pap.

Tablo 14. Longitudinal analiz — başlangıçta HPV durumuna göre katmanlandırılmış hastalık oranları

Çalışma grubu	Yaş	Başlangıç durumu	n	CIN 3+ Vakalar	Oran (100 hasta yılı için)	Relatif risk %95 CI
NCI	30 ve üstü	Pap normal, HPV pozitif	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Pap normal, HPV negatif	12,054	28	0.043	1.00
	Hepsi	Pap normal, HPV pozitif	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Pap normal, HPV negatif	17,594	48	0.056	1.00
Fransa	30 ve üstü	Pap normal, HPV pozitif	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Pap normal, HPV negatif	1696	3	0.084	1.00
	Hepsi	Pap normal, HPV pozitif	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Pap normal, HPV negatif	2180	3	0.066	1.00

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

Kolposkopiye sevk gereksinimini belirlemek için ASC-US Pap smear sonuçlarıyla hastaları tararken klinik performans

A.B.D.'de 1996 yılında Kaiser Foundation Research Institute (Kaiser Vakfı Araştırma Enstitüsü) ve Kaiser Permanente Medical Group (Kaiser Permanente Tıbbi Grubu) yönlendirmesi altında Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears (Sınırdaki Pap Smearlı Kadınlarda Triaaj için HPV DNA Testi Kullanılması) adlı bir çalışma yapılmıştır. Rutin Pap smear ve *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi için servikal numuneler birkaç Kaiser klinik tesisine giden kadınlardan elde edilmiştir. Başlangıç Pap smearlar Bethesda Sınıflandırmasına göre değerlendirilmiştir. Avrupa Topluluğunda servikal kanser tarama eşdeğer terminolojisi için European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer (42) belgesine başvurun. Pap smear sonuçları önemi belirlenmemiş atipik hücreler (ASC-US) olan kadınlar (15 yaş ve üstü) kolposkopi ve biyopsi için geri gelmişlerdir. Kolposkopiyle yönlendirilmiş histolojik numuneler patoloğlar tarafından incelenmiş ve bir başlangıç tanısı konmuştur. Her histoloji numunesi ayrıca bağımsız bir patoloğ tarafından gözden geçirilmiş ve başlangıç gözden geçirme ile bağımsız gözden geçirme arasındaki farklılıklar durumunda üçüncü bir patoloğ hakemlik yapmıştır.

Başlangıç numune 13 HPV tipinin 11'i (HPV tip 59 ve 68 hariç) için problemler içeren bir *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test prototipi ile yapılmıştır. Bu farklılığın test için anlamlı ölçüde farklı performans profilleriyle sonuçlanması beklenmez.

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

ASC-US ile sevk edilen Pap smear ile gelenler arasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin HSIL veya üstü hastalığın kolposkopide bulunması açısından negatif prediktif değeri %99'dur (bakınız aşağıda Tablo 15).

Tablo 15. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile üzerinde anlaşılmış histolojinin karşılaştırılması; ASC-US sevk Pap popülasyonu; Kaiser çalışması, PreservCyt numuneleri

		Kolposkopi zamanında HSIL veya üstü		Toplam
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Toplam		71	814	885

Hassasiyet [TP/(TP+FN)] = %93,0 (66/71)
%95 CI = 84,3–97,7
Özgüllük [TN/(TN+FP)] = %61,1 (497/814)
%95 CI = 57,7–64,4
Hastalık prevalansı = %8,0 (71/885)
Test pozitif prediktif değeri = %17,2 (66/383)
Test negatif prediktif değeri = %99,0 (497/502)

Bir başlangıç ASC-US'nin yüksek risk HPV test sonuçları temelinde HSIL veya üstü bulunması için çeşitli prevalanslar temelinde teorik pozitif ve negatif prediktif değerleri göstermektedir (bakınız aşağıda Tablo 16).

Tablo 16. ASC-US Pap yayma sonuçlarının yüksek risk HPV testinin teorik pozitif ve negatif prediktif değerleri

Teorik HSIL prevalansı	Başlangıç ASC-US Pap smear sonucu	
	Test pozitif prediktif değeri	Test negatif prediktif değeri
5	11.2	99.4
10	21.0	98.7
15	29.7	98.0
20	37.4	97.2
25	44.3	96.3
30	50.6	95.3

Çalışmada bulunan çeşitli yaş grupları arasındaki değişiklik belirlenmiştir (bakınız aşağıda Tablo 17).

Tablo 17. Kaiser çalışma verileri: digene HC2 High-Risk HPV DNA Testi performansı ve uyum sağlanmış histoloji sonuçları (HSIL) — yaşa spesifik özellikler

	Yaş <30	Yaş 30–39	Yaş >39
n	287	233	365
Hastalık prevalansı (%)	12.2	11.2	2.7
Hassasiyet (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
%95 CI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Özgüllük (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
%95 CI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Negatif prediktif değer (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Pozitif prediktif değer (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

LSIL veya HSIL Pap Smearlı kadınlarda yüksek evre hastalık riskinin belirlenmesi için klinik hassasiyet ve özgüllük

Batı ve Güney A.B.D.'de birkaç büyük, yüksek servikal hastalık ve HPV prevalansı olan hastane ve tıbbi merkez kolposkopi kliniğinde (3 çalışma yeri) toplanan numunelerde *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi kullanılarak bir çok merkezli klinik çalışma yapılmıştır. HPV testi numunelerin toplandığı kolposkopi klinikleriyle ilişkili olmayan üç araştırma yerinde gerçekleştirilmiştir. Bu klinik çalışma için popülasyon yakın zamanlı bir Pap smear ile LSIL veya HSIL tanısı koyup takip kolposkopi için sevk edilen kadınlardan oluşmuştur. Kaydolan 702 hasta

içinde 327'sinde Pap smear sonuçları ASC-US üzerinde olup yeterli bilgi bulunurken bunların 96'sında son hastalık durumu HSIL veya üstü olmuştur.

Eksfoliasyon yapmış servikal hücre numuneleri *digene* HC2 DNA Collection Device ile alınıp STM içine yerleştirilmiş veya bir fırça cihazı ile alınıp PreservCyt Solüsyonuna konmuştur. Numuneler kolposkopi zamanında toplanmıştır. Numuneler *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile test edilmiş ve sonuçlar her hasta için hastalık durumuyla karşılaştırılmıştır. Hastalık durumu histolojik değerlendirmenin sonuçlarını temel almıştır. Ancak histoloji negatif olduğunda veya bir histoloji sonucu bulunmadığında hastalık durumu kolposkopik inceleme sırasında sitoloji ile belirlenmiştir (bakınız aşağıda Tablo 18).

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testi kolposkopi için numuneleri toplayan çalışma yerleriyle ilişkisi olmayan 3 büyük metropoliten tıbbi merkezde yapılmıştır. Sitoloji bir referans patoloji laboratuvarında yapılmış ve histoloji kolposkopi yapan kurumlarda gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları hastalık durumuyla karşılaştırılarak yüksek evre servikal neoplazi saptamak için testin hassasiyeti, özgüllüğü ve negatif ve pozitif prediktif değeri değerlendirilmiştir. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin STM ve PreservCyt Solüsyonu için performans özelliklerinin benzerlikleri nedeniyle test performansı sadece PreservCyt için sunulmuştur. STM numuneleri ve PreservCyt numuneleri için yüksek risk HPV testi sonuçları arasında bir farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 18. Hastanın hastalık durumu algoritması

Sitoloji sonucu	Histoloji sonucu	Hastalık durumu
Negatif	Negatif veya yapılmamış*	Negatif
LSIL	Negatif	LSIL
HSIL	Negatif	HSIL
Kanser	Negatif	HSIL+
Negatif	LSIL	LSIL
LSIL	Yapılmamış*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Kanser	LSIL	LSIL
Negatif	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Yapılmamış*	HSIL
Kanser	HSIL	HSIL
Negatif	Kanser	HSIL+
LSIL	Kanser	HSIL+
HSIL	Kanser	HSIL+
Kanser	Yapılmamış*	HSIL+
Kanser	Kanser	HSIL+

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

96'sı yüksek evre servikal hastalıkla tanı konmuş kadınlardan olmak üzere 327 PreservCyt numunesinde belirlenmiş *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi performansını göstermektedir (bakınız aşağıda Tablo 19 ve 20). Karşılaştırmalar anormal sevk Pap smear sonuçları olan tüm çalışma hastaları kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 19. Yüksek risk HPV testi sonuçları

Sevk Pap smear sonucu	Yüksek risk HPV sonuçları	Son hastalık durumu HSIL		Son hastalık durumu LSIL		Son hastalık durumu negatif		Toplam
		+	-	+	-	+	-	
LSIL		44	4	78	33	28	37	224
HSIL		45	3	29	14	5	7	103
Toplam		89	7	107	47	33	44	327
Toplam		96		154		77		327

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testinin LSIL, HSIL veya eşdeğeri Pap smear tanısı temelinde kolposkopi için sevk edilen popülasyonda yüksek evre neoplazi bulunan kadınları tanımlamak için yaklaşık %93 genel hassasiyet gösterdiğini ortaya koymaktadır (bakınız aşağıda Tablo 20). Test ayrıca bu popülasyonda yaklaşık %95 negatif prediktif değer göstermiştir

Tablo 20. Sevk Pap yayması LSIL veya üstü ve son hastalık durumu HSIL olan hastalarda yüksek risk HPV DNA testinin performans özellikleri

		Son hastalık durumu		Toplam
		HSIL	LSIL veya negatif	
Yüksek risk HPV DNA test sonucu	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Toplam	96	231	327

Hassasiyet [TP/(TP+FN)] = %92,7 (89/96)
 %95 CI = 85,6–97,0
 Özgüllük [TN/(TN+FP)] = %39,4 (91/231)
 %95 CI = 33,1–46,0
 Sevk LSIL'den son HSIL'ye hastalık prevalansı = %21,4
 Sevk HSIL'den son HSIL'ye hastalık prevalansı = %46,6
 Genel pozitif prediktif değer = %38,9 (89/229)
 Genel negatif prediktif değer = %92,8 (91/98)

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

Başlangıçta LSIL veya HSIL Pap yayma sonuçları olup kolposkopide HSIL veya daha şiddetli hastalık bulunanlarda *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin teorik pozitif ve negatif prediktif değerleri belirlenmiştir (bakınız aşağıda Tablo 21).

Tablo 21. Başlangıçta LSIL veya HSIL Pap yayma sonuçlarının digene HC2 High-Risk HPV DNA Testinin teorik pozitif ve negatif prediktif değerleri

Teorik HSIL prevalansı	Başlangıç LSIL veya HSIL Pap smear sonucu	
	Test pozitif prediktif değeri	Test negatif prediktif değeri
5	7.4	99.0
10	14.5	97.9
15	21.2	96.8
20	27.6	95.5
25	33.7	94.1
30	39.6	92.6
35	45.1	90.9
40	50.4	89.0
45	55.5	86.8
50	60.4	84.3

Vajinal veya Kendi Kendine Numune Alma Performansı

Hastanın kendisinin aldığı vajinal numunelerde *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi performansı için literatürde 16–54 yaşlarında 141.000'den fazla kadın kaydedilmiştir. Çalışma kohortlarına Çin (41, 42), Meksika (43, 44) ve Birleşik Krallık'tan (45) kadınlar dahil edilmiştir. Çalışma tasarımları biraz farklılık göstermiştir ama genel olarak pozitif test sonucu olan kadınlara kolposkopi ile ek inceleme teklif edilmiş ve sonuçlar karşılaştırma yöntemine göre hassasiyet ve özgüllük açısından bildirilmiştir.

Hastanın kendi aldığı ve doktorun aldığı numuneleri karşılaştırmak için verilerin mevcut olduğu iki çalışmada sonuçlar her iki yöntemle CIN2+ için yüksek hassasiyete işaret etmiştir (42, 45): hastanın aldığı numuneler için %81–85 ve doktorun aldığı numuneler için %96–100. Özgüllük sonuçları her iki yöntemde CIN2+ için benzer olmuştur (42, 45): hastanın aldığı numuneler için %81–82 ve doktorun aldığı numuneler için %83–85. Sadece hastanın kendi aldığı performans verilerinin mevcut olduğu diğer çalışmalarda *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testinin CIN2+ için hassasiyeti sitolojiden 3,4 kat yüksek (43) bulunmuş ve doğrulama yanlılığı ayarlamasından önce %98 hassasiyet saptanmıştır (44).

Analitik Hassasiyet

Klinik olmayan bir klonlanmış HPV plazmid DNA paneli 13 HPV tipinin her birinin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle saptanabilip saptanamayacağını ve testin HPV tiplerinin her biri için analitik hassasiyetini belirlemek için yapılmıştır. 13 HPV DNA tipinin (16, 18, 31, 33, 35, 39,

45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68) her HPV hedef konsantrasyonu (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml ve 0,2 pg/ml) üçlü olarak çalışılmıştır. Her HPV tipinin her konsantrasyonu için RLU ortalama olarak hesaplanmış ve Pozitif Kalibratör ile karşılaştırılmıştır.

Her HPV tipinin STM içinde saptanabilir limiti belirlenmiştir (bakınız aşağıda Tablo 22). Saptanabilir limitler test edilen HPV tipine bağlı olarak 0,62 pg/ml ile 1,39 pg/ml arasında değişmiştir. 13 HPV DNA tipinin ortalama saptanabilir limiti 0,05 pg/ml standart sapmayla 1,08 pg/ml olmuştur.

Tablo 22. STM'de her HPV DNA tipinin saptanabilir hassasiyet limitlerinin özeti

HPV DNA tipi	Saptanabilir HPV DNA konsantrasyonu (pg/ml)	Standart sapma	%95 CI
16	1.09	0.06	0.94–1.29
18	1.05	0.05	0.88–1.29
31	1.01	0.05	0.91–1.15
33	1.35	0.02	1.26–1.45
35	1.11	0.05	0.95–1.31
39	1.39	0.09	1.16–1.71
45	1.14	0.04	0.99–1.35
51	0.78	0.10	0.70–0.88
52	1.37	0.06	1.21–1.58
56	0.62	0.04	0.58–0.67
58	0.82	0.04	0.73–0.94
59	1.10	0.06	1.00–1.21
68	1.19	0.04	1.03–1.39
Ortalama (tüm tipler)	1.08	0.05	0.95–1.25

Numune tipleri arasında eşdeğerlik

STM ve PreservCyt numunelerinin eşdeğer olması

STM ve PreservCyt numuneleri arasında eşdeğerlik HPV 18 DNA'sının eşit geri alınması için incelenmiştir. STM ve bir PreservCyt hücre havuzuna entegre HPV 18 genomları içeren yaklaşık 10^6 pozitif HeLa hücresinden eklenmiştir. Her numune tipi ilgili kullanma talimatında tanımlandığı şekilde ilgili örnek hazırlama ve denatürasyon işlemlerine göre işlenmiş ve *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile test edilmiştir. Sonuçlar insan karsinom hücrelerinden HPV 18 DNA'sının geri alınmasının iki ortam için eşdeğer olduğunu ve PreservCyt Solüsyonu örnek hazırlama işleminin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin analitik hassasiyetini etkilemediğini göstermiştir.

PreservCyt numunelerinin manuel örnek hazırlaması ve QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinin örnek hazırlamasının eşdeğerliliği

Çalışmalar normal sitolojiye sahip bir kadın alt popülasyonu (n=1276) ve ASC-US veya üstü sitolojiye sahip bir kadın alt popülasyonundan (n=402) alınan PreservCyt numuneleri kullanılarak yapılmıştır. Her numune için manuel örnek hazırlama ve QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama yapıldı ve sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile RCS otomatik testi yapıldı (bakınız aşağıda Tablo 23).

Tablo 23. Manuel örnek hazırlama ile QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama arasında PreservCyt numunesi sonuç anlaşması (n=1678)

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI		Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO \geq 2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO $<$ 0,8)
96.0	97.6	96.2	99.1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak hazırlanan PreservCyt numunelerinin relatif test hassasiyeti ve özgüllüğü hem pozitif hem negatif anlaşma için %95 CI alt sınırıyla görüldüğü şekilde manuel örnek hazırlama yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon göstermektedir.

PreservCyt numunelerinin manuel örnek hazırlaması ve QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinin örnek hazırlamasının eşdeğerliliği

Çalışmalar 30 yaş ve üzerinde normal sitolojiye sahip bir kadın alt popülasyonu (n=1901) ve ASC-US sitolojiye sahip bir kadın alt popülasyonundan (n=398) alınan PreservCyt numuneleri kullanılarak yapılmıştır. Her numune için manuel örnek hazırlama ve QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama yapıldı ve sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile RCS otomatik testi yapıldı (bakınız aşağıda Tablo 24).

Tablo 24. Manuel örnek hazırlama ile QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama arasında PreservCyt numunesi sonuç anlaşması (n=2299)

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI		Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO \geq 2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO $<$ 0,8)
92.7 (281/303) 89.3–95.2	96.5 (245/254) 93.4–98.1	99.1 (1978/1996) 98.6–99.4	99.9 (1967/1969) 99.6–100.0

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak hazırlanan PreservCyt numunelerinin relatif test hassasiyeti ve özgüllüğü hem pozitif hem negatif anlaşma için %95 CI alt sınırıyla görüldüğü şekilde manuel örnek hazırlama yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon göstermektedir.

SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin STM ve manuel örnek hazırlamanın eşdeğer olması

Amerika Birleşik Devletlerinde 6 örnek alma merkezi ve 3 test etme yeri kullanılarak iki fazlı bir klinik değerlendirme yapılmıştır. Bir cinsel hastalık kliniği, obstetrik/jinekolojik klinik, kolposkopi kliniği, hastane veya aile planlama merkezine başvuran hastalar önceden belirlenmiş çalışmaya alma ve almama kriterlerine göre kaydolmaya uygun olmuştur. SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleriyle kullanılmak üzere geçerli bir *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi CO değerinin belirlenmesi amaçlanan fizibilite fazına yaklaşık 400 hasta kaydolmuştur. Fizibilitenin bir ara analizi SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri kullanılarak 1,0 RLU/CO şeklindeki bir kesme noktası değerinin STM numunesi sonuçlarıyla kabul edilebilir bir anlaşma gösterdiğini ortaya koyduktan sonra seçilen kesme noktası değerini doğrulamak için yaklaşık 1.500 hastanın kaydolduğu klinik doğrulama fazı başlamıştır

Her iki değerlendirme fazında her izin veren kadın katılımcıdan eşleşmiş SurePath ve STM servikal numuneler alınmıştır. SurePath numunesi sonra lam hazırlanması için bir sitoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Sitolojik hazırlama sonrasında kalan SurePath post-gradyent hücre peleti numunesi ve karşılık gelen STM numunesi 1,0 RLU/CO şeklinde bir CO kullanılarak *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testiyle test edilmiştir (bakınız aşağıda Tablo 25).

Tablo 25. SurePath post-gradyent hücre peleti örnek sonuçlarının STM numune sonuçlarıyla anlaşması (tüm yaşlar ve sitolojik sınıflandırma) (n=1490)

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI		Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO \geq 2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO $<$ 0,80)
93.5 (401/429) 90.7–95.6	96.4 (378/392) 94.1–98.0	95.3 (1011/1061) 93.8–96.5	96.0 (1002/1044) 94.6–97.1

SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri test etmenin relatif test hassasiyeti ve özgüllüğü, hem pozitif hem negatif anlaşma için %95 CI alt sınırıyla görüldüğü şekilde STM numunelerini test etmekle elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon göstermektedir.

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numunelerinden örnek hazırlama ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin manuel örnek hazırlamanın eşdeğerlilik durumu

Çalışmalar şu alt popülasyonlardan toplanan SurePath numuneleri kullanılarak yapılmıştır:

- Normal sitolojili kadınlar (n=1189)
- ASC-US veya üstü sitolojili kadınlar (n=199)

Her SurePath numunesi için QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numunesinden örnek hazırlama ve post-gradyent hücre peleti örneğinden manuel örnek hazırlama yapılmıştır. Hazırlanan örneklerin her biri için digene HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi ile RCS otomatik testi (bakınız aşağıda Tablo 26) yapılmıştır.

.

Tablo 26. QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath numunelerinden örnek hazırlama ve SurePath örneklerinden manuel örnek hazırlama arasında sonuç anlaşması (n=1388)

Pozitif anlaşma (%)		Negatif anlaşma (%)	
(n/N) %95 CI		(n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO \geq 2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO $<$ 0,8)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak hazırlanan SurePath numunelerinin relatif test hassasiyeti ve özgüllüğü hem pozitif hem negatif anlaşma için %95 CI alt sınırıyla görüldüğü şekilde manuel örnek hazırlama yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon göstermektedir.

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden örnek hazırlama ve SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden manuel örnek hazırlamanın eşdeğerlilik durumu

Çalışmalar şu alt popülasyonlardan toplanan SurePath numuneleri kullanılarak yapılmıştır:

- Normal sitolojili kadınlar (n=1200)
- Sitolojisi ASC-US olan veya ASC-US üzerinde olan kadınlar (n=183)

Manuel örnek hazırlama ve QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama her SurePath post-gradyent hücre peleti örneği için yapılmış ve sonrasında digene HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi yapılmıştır (bakınız aşağıda Tablo 27)

Tablo 27. Manuel örnek hazırlama ile QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama arasında SurePath post-gradyent hücre peleti örnek sonucu anlaşması (n=1383))

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI		Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge RLU/CO \geq 2,5	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge RLU/CO $<$ 0,8
92.6 (188/203) 88.2–95.5	97.4 (147/151) 93.4–99.0	94.4 (1114/1180) 92.9–95.6	99.3 (1078/1086) 98.6–99.6

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak hazırlanan SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin relatif analiz hassasiyeti ve özgülüğü, hem pozitif hem negatif anlaşma için %95 CI alt sınırıyla görüldüğü şekilde manuel örnek hazırlama yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlarla yüksek korelasyon göstermektedir.

Test yöntemleri arasında anlaşma

RCS ile klinik test sonuçlarını manuel yöntem kullanılarak test sonuçlarıyla karşılaştırmak üzere değerlendirmek için birçok merkezli çalışma (n=2.270) yapılmıştır. Test QIAGEN dışında 3 çalışma yerinde 5 örnek alma yerinden gönderilen hasta numuneleriyle yapılmıştır. Veri seti PreservCyt Solüsyonuna alınan 1269 servikal numune ve STM'ye alınan 1001 numuneden oluşmuştur.

RCS ve manuel testle test edilen eşleşmiş numuneler arasındaki istatistiksel anlaşmalar bu hasta popülasyonu için hesaplanmıştır (bakınız aşağıda Tablo 28 ve 29).

Tablo 28. RCS otomatik ve manuel testler arasında anlaşma yüzdesi — STM numuneleri (n=1001)

Sitolojik sınıflandırma	HPV prevalansı (%)	Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI		Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	
		Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO >2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO <0,8)
WNL* <30 yıl	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥30 yıl	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Diğer	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Tüm STM numuneleri	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = normal limitler dahilinde.

Tablo 29. RCS otomatik ve manuel testler arasında anlaşma yüzdesi — PreservCyt numuneleri (n=1269)

Sitolojik sınıflandırma	HPV Prevalans(%)	Pozitif anlaşma (%)		Negatif anlaşma (%)	
		Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO >2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO <0,8)
WNL <30 yıl	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL ≥30 yıl	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Diğer sitoloji	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Tüm PreservCyt numuneleri*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

* WNL = normal limitler dahilinde.

† 4 hastadan sitoloji verileri mevcut değildi.

HPV prevalansı %4,8 olan normal sitolojiye sahip 30 yaş ve üzerindeki kadın popülasyonundan toplanan arşivlenmiş kalan PreservCyt numuneleriyle ek bir klinik çalışma yapılmıştır (bkz. aşağıda Tablo 30).

Tablo 30. RCS otomatik ve manuel testler arasında anlaşma yüzdesi — 30 yaş ve üzerinde WNL kadın (n=2077)

Pozitif anlaşma (%)		Negatif anlaşma (%)	
(n/N) %95 CI		(n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO >2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO <0,8)
92.0 (92/100) 84.84–96.48	91.8 (78/85) 83.77–96.62	99.3 (1964/1977) 98.88–99.65	99.7 (1944/1949) 99.40–99.92

Kuvvetli pozitif bölgede manuel RCS otomatik test sonuçları arasında 7 uyumsuz sonuç bulunmuştur. Bu 7 örnek için başlangıç manuel test sonuçları önerilen PreservCyt numune tekrar test algoritması dışındadır; ancak çalışma tasarımı tüm numuneleri üçlü olarak test etmeyi gerektirdiğinden uyumsuzluğun çözümlenmesi için tekrarlanan sonuçlar mevcuttur.

Uyumsuz 7 numunenin hepsi için tekrarlanan test verileri uyumsuz numunelerin tümünün HPV DNA için negatif olduğunu düşündürmektedir (bakınız aşağıda Tablo 31). Her iki kopya için elde edilen tekrarlanan negatif sonuçlar temelinde başlangıçtaki pozitif manuel test sonuçlarının her biri olasılıkla yalancı pozitif.

Tablo 31. 30 yaş ve üzerinde WNL kadın için uyumsuz PreservCyt numuneleri (n=7)

Örnek	Merkez	Manuel test (RLU/CO)			RCS otomatik testi (RLU/CO)		
		Başlangıç	Tekrar 1	Tekrar 2	Başlangıç	Tekrar 1	Tekrar 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Bu klinik çalışmanın sonuçları STM veya PreservCyt numuneleri kullanarak RCS otomatik ve manuel testleri arasında genel bir anlaşmaya işaret etmektedir.

Tekrar Üretilirlik

Manuel testin genel tekrar üretilebilirliği

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

Harici laboratuvarlar testleri eşdeğer tekrar üretilebilirlik paneliyle 3 farklı günde aynı *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kiti lotunu kullanarak yapmıştır. Tekrar üretilebilirlik paneli şu numuneleri içermiştir:

- 12 denatüre klinik STM numune havuzu
- 3 denatüre edilmemiş klinik PreservCyt numune havuzu

- Negatif Kalibratör
- 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml ve 10 pg/ml konsantrasyonlarında Pozitif Yüksek Risk HPV Kalibratör.

Tüm panel üyeleri *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi kullanılarak her gün üçlü olarak test edilmiştir. Sonuçlar klinik numunelerle *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testinin tekrar üretilebilirliğini çok iyi olduğuna işaret etmektedir (bakınız aşağıda Tablo 32).

Tablo 32. Genel tekrar üretilebilirlik — çok merkezli tekrar üretilebilirlik (tüm çalışma yerlerinde tüm çalışmalar)

İstatistiksel ölçüt	Sonuç
Beklenen pozitif sonuçlu beklenen pozitifler (%95 GA)	100.0% (99.0–100.0)
Beklenen negatif sonuçlu beklenen negatifler (%95 GA)	99.0% (97.49–99.73)
Anlaşma (%95 GA)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Klinik STM numuneleriyle tekrar üretilebilirlik

Manuel test

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle klinik STM numunelerini manuel testinin tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere bir çalışma yapılmıştır. Önceden test edilmiş STM numunelerini kombine ederek klinik havuzlardan oluşan 20 üyeli bir panel oluşturulmuştur (10 pozitif ve 10 negatif). Numuneler numune başına toplam 20 replikat olacak şekilde 5 günün her birinde 4 replikat olarak çalışılmıştır. Testler bir düşük risk HPV probu ve Yüksek Risk HPV Probunda oluşan bir kombine Prob Karışımı kullanılarak yapılmıştır. Testin tekrar üretilebilirliğinin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile sadece Prob Karışımı kullanıldığında farklı olması beklenmez. Ortalama RLU/CO ve ortalama etrafında %95 CI hesaplanmıştır (bakınız aşağıda Tablo 33).

Tablo 33. STM numunelerinin tekrar üretilebilirliği — manuel test (ortalama RLU/CO değerine göre azalan sıra)

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

Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla üzerinde olan 5 numune için 100 replikatın 100'ü (%100,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin en fazla %20 üzerinde veya altında olan 5 numune için 100 replikatın 60'ı (%60; %95 CI = 49,7–69,6) pozitif bulunmuştur ve 100'de 40'ı (%40) negatiftir. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla altında olan 10 numune için 200 replikatın 200'ü (%100) negatif bulunmuştur.

Sonuçlar CO değerinden %20 veya daha fazla uzakta olan numunelerin tutarlı sonuçlar vermesinin bekleneceğine işaret eder. CO'ya yakın olan numuneler yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler STM numunelerinin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle manuel testinin tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

RCS otomatik testi

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle STM numunelerinin RCS otomatik testinin çalışma içi, gündün güne ve laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere bir çalışma

yapılmıştır. Tek bir reaktif lotu kullanılarak 3 farklı günde, günde iki kez olmak üzere birleştirilmiş klinik numunelerin 16 üyeli bir paneli (bakınız aşağıda Tablo 34) test edilmiştir. Her panel üyesi dörtlü olarak test edilmiştir.

Tablo 34. STM numunelerinin tekrar üretilebilirliği — RCS otomatik test panel bileşimi

Panel üyesi	Yaklaşık RLU/CO	Beklenen test sonucu
1N	<0.4	Negatif
2N	0.4–0.8	Negatif
3P	0.8–1.2	Yüksek negatif/düşük pozitif
4P	0.8–1.2	Yüksek negatif/düşük pozitif
5P	0.8–1.2	Yüksek negatif/düşük pozitif
6P	1.2–2.0	Düşük pozitif
7P	1.2–2.0	Düşük pozitif
8P	1.2–2.0	Düşük pozitif
9P	2.0–5.0	Düşük pozitif
10P	5.0–10.0	Orta pozitif
11N	<0.4	Negatif
12N	<0.4	Negatif
13N	<0.4	Negatif
14XR	STM klinik negatif havuzunda düşük risk HPV DNA pozitif klinik materyal	Yüksek negatif/düşük pozitif
15XR	STM klinik negatif havuzunda düşük risk HPV DNA plazmidi	Yüksek negatif/düşük pozitif
16XR	STM klinik negatif havuzunda plazmid vektörü DNA kontrolü	Yüksek negatif/düşük pozitif

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testinin Prob Karışımının sadece düşük risk HPV DNA tipleri 6, 11, 42, 43, ve 44 içeren numunelerle çapraz hibridizasyon potansiyelini değerlendirmek üzere iki panel üyesi (14XR ve 15XR) dahil edilmiştir. Panel üyesi 16XR 1,49 ng/ml konsantrasyonunda pGEM® DNA'sından oluşmuş ve panel üyesi 15XR için vektör kontrolü görevi yapmıştır. Bu testin sonuçları klinik numunelerde düşük risk HPV DNA tiplerinin varlığı nedeniyle herhangi bir yalancı pozitif test sonucu olmadığına işaret etmiştir. Bu sonuçlar manuel testlerle tutarlıdır.

Tekrar üretilebilirlik NCCLS E5-A* tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak hesaplanmıştır (bakınız aşağıda Tablo 35). Bu yöntem her değişkenlik kaynağı için varyans bileşenlerinin

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS document E5-A (1999).

hesaplanmasını gerektirir: laboratuvar, gün, çalışma ve hata (analiz arası ve analiz içi değişkenlik olarak tanımlanır)..

Tablo 35. STM numunelerinin tekrar üretilebilirliği — RCS otomatik test; kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Ortalama RLU/CO	Standart sapma				Toplam	Total CV (%)
			Çalışma içi	Çalışmalar arası	Günler arası	Lab arası		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P [†]	70	1.95	N/A [‡]	N/A [‡]	N/A [‡]	N/A [‡]	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

[†] Negatif varyans bileşenleri sıfıra eşit olarak ayarlanmıştır.

[‡] Panel üyesi 8P için iki geçersiz replikat karşılaştırılan eşit olmayan büyüklükte gruplar nedeniyle varyans bileşeni analizini önlemiştir.

[§] N/A: varyans analizi diğer panel üyelerinden daha az replikat nedeniyle mümkün olmamıştır.

Klinik PreservCyt numuneleriyle tekrar üretilebilirliği

Manuel test.

PreservCyt numunelerinin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle manuel testinin tekrar üretilebilirliği çeşitli HPV DNA konsantrasyonlarında 24 oluşturulmuş numune ile bir çalışmada belirlenmiştir. Numuneler HPV 16 plazmidi içeren bakteriler ile veya olmadan PreservCyt Solüsyonu ve akyuvarlardan oluşmuştur.

Numuneler numune başına toplam 20 replikat olacak şekilde 5 günün her birinde 4 replikat olarak çalışılmıştır. Çalışmanın 5 gününün her birinde her numuneden 8 ml'lik bir örnek *digene* HC2 Sample Conversion Kiti talimatına göre hazırlanmış ve test edilmiştir. Ortalama ve %95 CI hesaplanmıştır (bakınız aşağıda Tablo 36).

Tablo 36. PreservCyt numunelerinin tekrar üretilebilirliği — manuel örnek hazırlama ile manuel test; kalitatif tekrar üretilebilirlik (ortalama RLU/CO'ya göre azalan sıra)

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

Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla üzerinde olan 6 numune için 114 replikatın 120'ü (%95,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin en fazla %20 üzerinde veya altında olan 7 numune için 139 replikatın 88'i (%63,3; %95 CI = 54,3–70,9) pozitif bulunmuştur ve 139'da 51'i (%36,7) negatiftir. CO değerinin %10 üzerinde veya altında olan 4 numune için 79 replikatın 41'i (%51,9) pozitif bulunmuştur ve 79'da 38'i (%48,1) negatiftir. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla altında olan 11 numune için 220 replikatın 220'ü (%100) negatif bulunmuştur.

Sonuçlar CO değerinden %20 veya daha fazla uzakta olan numunelerin tutarlı sonuçlar vermesinin bekleneceğine işaret eder. CO'ya yakın olan numuneler yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler PreservCyt numunelerinin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle manuel testinin tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

Manuel örnek hazırlama ile RCS otomatik testi.

Temel olarak sitoloji sonucu ASC-US veya üstü olan (HPV prevalansı %57) kadınlardan elde edilmiş klinik PreservCyt numuneleri kullanılarak RCS otomatik testinin dahili bir çalışması yapılmıştır. Numuneler 2 bölüntüye bölünmüştür; her bölüntü sonra *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanılarak ayrı olarak işlenmiş ve *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle ikili olarak test edilmiştir.

Diğer kalitatif IVD testleriyle olduğu gibi klinik numunelerden elde edilen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test sonuçlarının değişkenliği temel olarak aşağıdakilerden biri veya bir kombinasyonu ile ilişkilidir: örnek toplama, örnek hazırlama ve test işlemi. Karşılaştırılan test sonuçları aynı klinik numuneden elde edildiğinden deneysel tasarım numune toplama nedeniyle değişkenlik açısından kontrollü olmuştur. Aynı klinik numuneden 2 ayrı olarak hazırlanmış örnek bölüntüsünden elde edilmiş sonuçların tekrarlanabilirliği (aşağıda hazırlanmış "bölüntüler arasında" olarak geçer) örnek hazırlama ve test işleminin kombinasyonu nedeniyle varyasyonu yansıtır. Aynı örnek bölüntüsünden elde edilmiş sonuçların tekrarlanabilirliği (aşağıda "hazırlanmış bölüntü içinde" olarak geçer) sadece test işleminden varyasyona işaret eder (bakınız aşağıda Tablo 37).

Tablo 37. PreservCyt numunelerinin tekrar üretilebilirliği — Manuel örnek hazırlamaya RCS otomatik testi; kalitatif tekrar üretilebilirlik

Analiz	Pozitif anlaşma (%)	Negatif anlaşma (%)	Genel anlaşma (%)	
	(n/N) %95 CI	(n/N) %95 CI	(n/N) %95 CI	
Hazırlanan bölüntü içinde	Tüm veriler	99.62 (261/262) 97.9–100.0	94.7 (160/169) 90.1–97.5	97.7 (421/431) 95.8–98.9
	Kuvvetli pozitif ve kuvvetli negatif bölgeler	100.0 (249/249) 98.5–100.0	98.2 (160/163) 94.7–99.6	99.3 (409/412) 97.9–99.9
	Tüm veriler	99.6 (264/265) 97.9–100.0	98.2 (163/166) 94.8–99.6	99.1 (427/431) 97.6–99.8
Hazırlanan bölüntüler arasında	Kuvvetli pozitif ve kuvvetli negatif bölgeler	100.0 (249/249) 98.5–100.0	99.4 (161/162) 96.6–100.0	99.8 (410/411) 98.7–100.0

Simüle edilmiş PreservCyt numunelerinin RCS otomatik testiyle elde edilen sonuçların kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere ek bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya QIAGEN dahil üç test bölgesi katılmıştır.

Het test laboratuvarı sağlanan 6 üyeli tekrar üretilebilirlik paneliyle 5 farklı günde iki kez *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik ve manuel test yapmıştır. Her panel üyesi yaklaşık bir RLU/CO değeri vermek üzere PreservCyt Solüsyonuna eklenmiş kültürde üretilmiş hücrelerden oluşmuştur (bakınız aşağıda Tablo 38).

HPV DNA-pozitif panel üyeleri değişik miktarlarda HPV DNA pozitif SiHa hücreleri eklenmesiyle (bir laboratuvar hücre hattından) hazırlanmıştır. Negatif panel üyesi HPV negatif Jurkat hücrelerinden (farklı bir laboratuvar hücre hattından) oluşmuştur. 6 panel üyesinin hepsinin son hücre konsantrasyonu yaklaşık 5×10^4 hücre/ml olmuştur.

Tablo 38. PreservCyt numunelerinin tekrar üretilebilirliği — Manuel örnek hazırlamayla RCS otomatik testi; kantitatif tekrar üretilebilirlik panel üyeleri

Panel üyesi	Hücre tipi	Yaklaşık RLU/CO	Beklenen sonuç
1N	Jurkat	<1,0	Negatif
2N	Jurkat	<1,0	Negatif
3P	SiHa ve Jurkat	5,0–8,0	Düşük pozitif
4P	SiHa ve Jurkat	5,0–8,0	Düşük pozitif
5P	SiHa	30,0–50,0	Orta pozitif
6P	SiHa	200,0	Yüksek pozitif

Tekrar üretilebilirlik NCCLS E5-A* tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak hesaplanmıştır (bakınız aşağıda Tablo 39). Bu yöntem her değişkenlik kaynağı için varyans bileşenlerinin hesaplanmasını gerektirir: laboratuvar, gün, çalışma ve hata (analiz arası ve analiz içi değişkenlik olarak tanımlanır). 6 panel üyesinin her biri 10 çalışmanın hepsinde 3 test eden laboratuvarında dördü olarak test edilmiştir (5 gün test boyunca günde 2 çalışma).

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS document E5-A (1999).

Tablo 39. PreservCyt numunelerinin tekrar üretilebilirliği — Manuel örnek hazırlamayla RCS otomatik testi; kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Ortalama RLU/CO	Standart sapma					Toplam	Total CV (%)
			Çalışma içi	Çalışmalar arası	Günler arası	Lab arası			
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4	
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2	
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1	
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8	
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5	
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0	

† Negatif varyans bileşenleri sıfıra eşit olarak ayarlanmıştır.

Bu başlangıç tekrar üretilebilirlik çalışmasını analiz kesme noktasına çok yakın numunelerden verilerle desteklemek için QIAGEN dışındaki bir çalışma yerinde RCS kullanılarak ek bir kesinlik çalışması yapılmıştır.

Panel 1 negatif, 2 negatif veya düşük pozitif ve 2 düşük pozitif üyeden oluşmuştur. Her panel üyesi hedef RLU/CO değerlerini vermek üzere PreservCyt Solüsyonuna kültürde üretilmiş Jurkat ve SiHa hücrelerinin eklenmesiyle oluşmuştur (bakınız aşağıda Tablo 40).

Bu harici çalışma yeri RCS otomatik testini her test çalışması için tek bir *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi reaktifleri lotu kullanarak, testi 3 farklı günde, günde 2 kez yaparak, ve simüle edilmiş PreservCyt numunelerinden 5 üyeli sağlanan paneli kullanarak yapmıştır. Her panel üyesi 4 örneğe bölünmüş ve 4 örneğin hepsi aynı mikropkaya kullanılarak test edilmiştir (bakınız aşağıda Tablo 41).

Tablo 40. PreservCyt numunelerinin tekrar üretilebilirliği — Manuel örnek hazırlamayla RCS otomatik testi; analiz CO değerine yakın panel üyelerinin kantitatif tekrar üretilebilirliği

Panel üyesi	Yaklaşık RLU/CO değeri	Beklenen sonuç
1N	0.2	Negatif
2N	0.8–1.2	Yüksek negatif/düşük pozitif
3P	0.8–1.2	Yüksek negatif/düşük pozitif
4P	1.2–2.0	Düşük pozitif
5P	1.2–2.0	Düşük pozitif

Tablo 41. PreservCyt numunelerinin tekrar üretilebilirliği — Manuel örnek hazırlamayla RCS otomatik testi; test CO değerine yakın kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Ortalama RLU/CO	Standart sapma			Toplam	CV (%)
			Çalışma içi	Çalışmalar arası	Günler arası		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Negatif varyans bileşenleri sıfıra eşit olarak ayarlanmıştır.

QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama.

Şu iki sitoloji sonucundan biri bulunan kadınlardan elde edilen klinik PreservCyt numunelerinde QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlamasının dahili bir çalışması yapılmıştır:

- ASC-US veya üstü
- intraepithelial lezyon veya malignansi için negatif (NILM)

Her numuneden iki örnek alınmıştır. Her örnek QIASymphony DSP HPV Media Kitiyle ayrı olarak hazırlanmış ve sonuçlar *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi kullanılarak belirlenmiştir.

Diğer kalitatif IVD testleriyle olduğu gibi klinik numunelerden elde edilen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test sonuçlarının değişkenliği temel olarak aşağıdakilerden biri veya bir kombinasyonu ile ilişkilidir: örnek toplama, örnek hazırlama ve test işlemi. Karşılaştırılan test sonuçları aynı klinik numuneden (bakınız “örnekler arası”) elde edildiğinden deneysel tasarım numune toplama nedeniyle değişkenlik açısından kontrollü olmuştur. Aynı klinik numuneden 2 ayrı olarak hazırlanmış örnekten elde edilmiş sonuçların tekrarlanabilirliği örnek hazırlama ve test işleminin kombinasyonu nedeniyle varyasyonu yansıtır (bakınız aşağıda Tablo 42).

Tablo 41. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama; örnekler arasında kalitatif tekrar üretilebilirlik

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	Genel anlaşma (%) (n/N) %95 CI
99.0 (95/96) 94.3–99.8	96.4 (161/167) 92.4–98.3	97.3 (256/263) 94.6–98.7

Simüle edilmiş PreservCyt numunelerinin sonuçlarının kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere ek bir çalışma yapılmıştır. QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi yapılmıştır. Sekiz pozitif panel üyesi PreservCyt Solüsyonunda HPV-DNA-negatif C-33 A hücrelerine HPV-DNA-pozitif SiHa veya HeLa hücreleri eklenerek hazırlanmıştır ve iki HPV-DNA-negatif panel üyesi sadece HPV-DNA-negatif C-33 A hücreleri içermiştir.

Testi üç farklı kullanıcı tek bir günde üç farklı QIASymphony SP aleti ve üç farklı QIASymphony DSP HPV Media Kiti lotu kullanarak panel üyeleri 2N, 3E, 5P, 7P ve 9P ile yapmıştır. Panel üyeleri 2N, 3E, 5P ve 7P 3 farklı çalışmada 18 kopya olarak test edilmiş ve böylece her panel üyesi için 54 veri noktası elde edilmiştir. Panel üyesi 9P 3 farklı çalışmada 16 kopya ile test edilmiş ve böylece 48 veri noktası elde edilmiştir.

Bir kullanıcı *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testini üç farklı günde üç farklı QIASymphony SP aletinde ve bir QIASymphony DSP HPV Media Kiti lotu kullanarak panel üyeleri 1N, 4E, 6P, 8P ve 10P ile yapmıştır. Panel üyeleri 1N, 4E, 6P ve 8P 8 farklı çalışmada 18 kopya olarak test edilmiş ve böylece her panel üyesi için 144 veri noktası elde edilmiştir. Panel üyesi 10P 8 farklı çalışmada 16 kopya ile test edilmiş ve böylece 128 veri noktası elde edilmiştir.

Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla üzerinde olan panel üyeleri içinden 572 replikatın 572'ü (%100,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin en fazla %20 üstünde veya altında olan panel üyeleri içinden 198'te 98'i (%49,5) pozitif ve 198'te 100'u (%50,5) negatif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla altında olan panel üyeleri içinden 198'de 198'i (%100,0) negatif bulunmuştur (bakınız aşağıda Tablo 43).

Tablo 43. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama; kalitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	Hücre tipi	Ortalama RLU/CO	Standart sapma	Pozitif test sonucu (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa ve C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa ve C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa ve C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa ve C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa ve C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa ve C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa ve C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa ve C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Sonuçlar CO değerinden %20 veya daha fazla uzakta olan numunelerin tutarlı sonuçlar vermesinin bekleneceğine işaret eder. CO'ya yakın olan numuneler yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinden örnek hazırlanması ve sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test etmenin tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

Dahili çalışmanın sonuçları ayrıca QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinden örnek hazırlanmasıyla elde edilen sonuçların kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır (bakınız aşağıda Tablo 44 ve Tablo 45).

Tablo 44. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama; aynı kullanıcıyla kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Ortalama RLU/CO	Standart sapma			Tahmini toplam standart sapma	Tahmini total CV (%)
			Çalışmalar içinde	Çalışmalar arası	Kombinasyonlar arasında*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Between combinations of QIASymphony SP instruments and different days.

Tablo 45. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama; aynı günde kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Ortalama RLU/CO	Standart sapma			Tahmini total CV (%)
			Çalışmalar içinde	Çalışmalar arası [†]	Tahmini toplam standart sapma	
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†] Bir çalışma QIASymphony DSP HPV Media Kiti, bir QIASymphony SP aleti ve bir kullanıcı kombinasyonundan oluşmaktadır.

Kantitatif tekrar üretilebilirlik %25 altında kalan tüm CV değerleriyle gösterildiği şekilde çok yüksektir. Çalışmalar arasında standart sapmalar çalışmalar içinde karşılık gelen değere benzerdir ve bu durum kullanılan alet veya kit lotuna bakılmaksızın tutarlı sonuçlara işaret eder.

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama.

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlamanın ASC-US veya NILM sitolojili kadınlardan elde edilen klinik PreservCyt numuneleri kullanılarak dahili bir çalışması yapılmıştır: Her numuneden iki örnek alınmıştır. Her örnek QIASymphony DSP AXpH DNA Kitiyle ayrı olarak hazırlanmış ve sonuçlar *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi kullanılarak belirlenmiştir.

Diğer kalitatif IVD testleriyle olduğu gibi klinik numunelerden elde edilen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test sonuçlarının değişkenliği temel olarak aşağıdakilerden biri veya bir kombinasyonu ile ilişkilidir: örnek toplama, örnek hazırlama ve test işlemi. Karşılaştırılan test sonuçları aynı klinik numuneden (bakınız “örnekler arası”) elde edildiğinden deneysel tasarım numune toplama nedeniyle değişkenlik açısından kontrollü olmuştur. Aynı klinik numuneden 2 ayrı olarak hazırlanmış örnekten elde edilmiş sonuçların tekrarlanabilirliği örnek hazırlama ve test işleminin kombinasyonu nedeniyle varyasyonu yansıtır (bakınız aşağıda Tablo 46).

Tablo 46. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama; örnekler arasında kalitatif tekrar üretilebilirlik

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	Genel anlaşma (%) (n/N) %95 CI
95.3 (101/106) 89.4–98.0	96.7 (176/182) 92.3–98.5	96.2 (277/288) 93.3–97.9

Simüle edilmiş PreservCyt numunelerinin sonuçlarının kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere ek bir çalışma yapılmıştır. QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi yapılmıştır.

Üç farklı kullanıcı *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testini 9-üyelik bir panelde farklı günlerde farklı aletler ve farklı reaktif lotları kullanarak yapmıştır. Her panel üyesi 24 farklı çalışmada ikili olarak test edilmiş ve her panel üyesi için 48 veri noktası sağlamıştır. Sekiz pozitif panel üyesi PreservCyt Solüsyonunda HPV-DNA-negatif H9 hücrelerine HPV-DNA-pozitif SiHa veya HeLa hücreleri eklenerek hazırlanmıştır ve iki HPV-DNA-negatif panel üyesi sadece HPV-DNA-negatif H9 hücreleri içermiştir.

Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla üzerinde olan panel üyeleri içinden 237 replikatın 240'ı (%98,8) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin en fazla %20 üstünde veya altında olan panel üyeleri içinden 144'te 95'i (%66,0) pozitif ve 144'te 49'u (%34,0) negatif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla altında olan panel üyeleri içinden 48'de 48'i (%100,0) negatif bulunmuştur (bakınız aşağıda Tablo 47).

Tablo 47. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama; kalitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	Hücre tipi	Ortalama RLU/CO	Standart sapma	Pozitif test sonucu (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 ve HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 ve HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 ve SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 ve SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 ve HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 ve SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 ve HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 ve SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Sonuçlar CO değerinden %20 veya daha fazla uzakta olan numunelerin tutarlı sonuçlar vermesinin bekleneceğine işaret eder. CO'ya yakın olan numuneler yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinden örnek hazırlanması ve sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test etmenin tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

Dahili çalışmanın sonuçları ayrıca QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak PreservCyt numunelerinden örnek hazırlanmasıyla elde edilen sonuçların kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır (bakınız aşağıda Tablo 48).

Tablo 48. PreservCyt numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama; kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Ortalama RLU/CO	Standart sapma			Tahmini toplam standart sapma	Tahmini total CV (%)
			Çalışmalar içinde	Çalışmalar arası	Kombinasyonlar arasında*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

**digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kitleri, QIASymphony DSP AXpH DNA Kitleri, kullanılan RCS, kullanılan QIASymphony SP ve kullanıcı kombinasyonları arasında

Klinik SurePath numuneleriyle tekrar üretilebilirliği

Manuel test

SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinin *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testiyle manuel testinin tekrar üretilebilirliği bir çalışmada 3 farklı laboratuvar kullanılarak belirlenmiştir. Panel üyeleri, bilinen pozitif veya negatif HPV durumu olan aynı panel üyesi seti kullanılarak farklı günlerde ve çalışmalarda 1,0 RLU/CO şeklinde bir CO değeri kullanılarak test edilmiştir. Panel, 5 pozitif, 2 yüksek negatif/düşük pozitif ve 5 negatif üyeden oluşmuştur.

Her panel üyesi istenen hedef RLU/CO değerlerini elde etmek üzere bilinen negatif ve pozitif HPV durumu olan benzersiz SurePath Koruyucu Sıvısı içinde toplanmış klinik numunelerin kombine edilmesiyle hazırlanmıştır. Her panel üyesi üç katılımcı laboratuvarın her birinde beş günlük bir dönem boyunca günde iki kez olmak üzere ikili olarak test edilmiştir (bakınız aşağıda Tablo 49).

Tablo 49. SurePath numunelerinin tekrar üretilebilirliği — manuel test; kalitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	Ortalama RLU/CO	Pozitif test sonucu (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

RCS otomatik testi

SurePath post-gradyent hücre peleti örneği sonuçlarının RCS otomatik testiyle tekrar üretilebilirliği manuel test ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Aynı işlenmiş SurePath post-gradyent hücre peleti örneğinden (aynı numuneden) iki ayrı bölüntü test edilmiştir (bakınız aşağıda Tablo 50).

Tablo 50. SurePath post-gradyent hücre peletlerinin tekrar üretilebilirliği — RCS otomatik testi; RCS otomatik ve manuel testler arasında sonuç anlaşması

Pozitif anlaşma (%) (n/N) %95 CI		Negatif anlaşma (%) (n/N) %95 CI	
Hepsi pozitif	Güçlü pozitif bölge (RLU/CO \geq 2,5)	Hepsi negatif	Güçlü negatif bölge (RLU/CO $<$ 0,80)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

SurePath numunelerinden QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama

Simüle edilmiş SurePath numunelerinin sonuçlarının kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere bir çalışma yapılmıştır. QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi yapılmıştır. Dört pozitif panel üyesi SurePath Koruyucu Sıvısı HPV-DNA-negatif H-9 hücrelerine HPV-DNA-pozitif SiHa hücreleri eklenerek hazırlanmıştır ve iki HPV-DNA-negatif panel üyesi sadece SurePath Koruyucu Sıvısında HPV-DNA-negatif H-9 hücreleri içermiştir.

Testi 3 farklı kullanıcı 6 farklı günde 3 farklı QIASymphony SP aleti ve üç farklı QIASymphony DSP HPV Media Kiti lotu kullanarak panel üyeleri 1N, 2E, 3P, 4P ve 5P ile kullanarak test yapmıştır. Panel üyeleri 1N, 2E, 3P ve 4P 37 farklı çalışmada 18 kopya olarak test edilmiş ve panel üyeleri 2E ve 3P için 666 veri noktası ve panel üyeleri 1N ve 4P için 665 veri noktası elde edilmiştir. Panel üyesi 5P 37 farklı çalışmada 16 kopya ile test edilmiş ve böylece 590 veri noktası elde edilmiştir. Dört veri noktası örnek hazırlama sırasında QIASymphony SP tarafından ikaz edildiği şekilde yetersiz hacim nedeniyle hariç bırakılmıştır.

Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla üzerinde olan panel üyeleri içinden 1921 replikatın 1921'i (%100,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin en fazla %20 üstünde veya altında olan panel üyeleri içinden 666'da 410'u (%61,6) pozitif ve 666'da 256'sı (%38,4) negatif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla altında olan panel üyeleri içinden 664'de 665'i (%99,8) negatif bulunmuştur (bakınız aşağıda Tablo 51).

Tablo 51. SurePath numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama; kalitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	Hücre tipi	Ortalama RLU/CO	Standart sapma	Pozitif test sonucu (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa ve H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa ve H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa ve H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa ve H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Sonuçlar CO değerinden %20 veya daha fazla uzakta olan SurePath numunelerinin tutarlı sonuçlar vermesinin bekleneceğine işaret eder. CO'ya yakın olan SurePath numuneleri yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. . Bu veriler QIASymphony DSP HPV

Media Kiti kullanılarak SurePath numunelerinin örnek hazırlaması ve sonrasında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test etmenin tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

Dahili çalışmanın sonuçları ayrıca QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak SurePath numunelerinin örnek hazırlamasıyla elde edilen sonuçların kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır (bakınız aşağıda Tablo 51).

Testi 3 farklı kullanıcı 6 farklı günde 3 farklı QIASymphony SP aleti ve üç farklı QIASymphony DSP HPV Media Kiti lotu kullanarak panel üyeleri 1N, 2E, 3P, 4P ve 5P ile kullanarak test yapmıştır. Panel üyeleri 1N, 2E, 3P ve 4P 18 kopya olarak test edilmiş ve böylece her panel üyesi için 162 veri noktası elde edilmiştir. Panel üyesi 5P 16 kopya ile test edilmiş ve böylece 144 veri noktası elde edilmiştir (bakınız aşağıda Tablo 52).

Tablo 52. SurePath numuneleri tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama; kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Standart sapma				Tahmini toplam standart sapma	Tahmini total CV (%)
		Ortalama RLU/CO	Çalışmalar içinde	Günler arası	Kombinasyonlar arasında*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

* Bir çalışma belirli bir günde QIASymphony DSP HPV Media Kiti, bir QIASymphony SP aleti ve bir kullanıcı kombinasyonundan oluşmaktadır.

Kantitatif tekrar üretilebilirlik %26 altında kalan tüm CV değerleriyle gösterildiği şekilde çok yüksektir. Çalışmalar arasında standart sapmalar çalışmalar içinde karşılık gelen değere benzerdir ve bu durum kullanılan alet veya kit lotuna bakılmaksızın tutarlı sonuçlara işaret eder.

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradyent hücre örneklerinden örnek hazırlama

Simüle edilmiş SurePath post-gradyent hücre peleti örnekleri kullanılarak sonuçların tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek üzere bir çalışma yapılmıştır. QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama sonrasında *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi yapılmıştır. SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerini taklit etmek üzere %70 SurePath Koruyucu Sıvısındaki hücre kültürü materyali kullanılmıştır. 4 pozitif panel üyesi SurePath Koruyucu Sıvısında HPV DNA negatif H-9 hücrelerine HPV DNA-pozitif SiHa hücreleri

eklenerek hazırlanırken HPV DNA negatif panel üyesi SurePath Koruyucu Sıvısında sadece HPV DNA negatif H-9 hücreleri içermiştir.

Dört farklı operatör 3 farklı QIASymphony SP cihazı ve 3 farklı QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti lotları kullanarak panel üyeleri 1, 2, 3, 4 ve 5 ile 6 farklı günde test yapmıştır. Panel üyeleri 1, 2, 3 ve 4 toplam 37 farklı çalışmada 18 replikatla test edilmiş ve panel üyeleri 1 ve 3 için 666 veri noktası ve panel üyeleri 2 ve 4 için 665 veri noktası ortaya çıkmıştır. İki veri noktası örnek hazırlama sırasında QIASymphony SP tarafından işaretlendiği şekilde yetersiz hacim nedeniyle hariç bırakılmıştır. Panel üyesi 5, 37 farklı çalışmada 16 replikatla test edilmiş ve 592 veri noktası ortaya çıkmıştır.

Ortalama RLU/CO değeri CO değerinin %20 veya daha fazla üzerinde olan panel üyeleri içinden 1923 replikatın 1923'ü (%100,0) pozitif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri, CO değerinin %20 üstü ve altı arasında olan panel üyeleri içinden 665'te 416'sı (%62,6) pozitif ve 665'te 249'u (%37,4) negatif bulunmuştur. Ortalama RLU/CO değeri, CO değerinin %20 veya daha fazla altında olan panel üyeleri içinden 666'da 666'sı (%100) negatif bulunmuştur (bakınız aşağıda Tablo 53).

Tablo 53. SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinin tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama, kalitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	Hücre tipi	Ortalama RLU/CO	Standart sapma	CV (%)	Pozitif test sonucu (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa ve H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa ve H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa ve H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa ve H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

Sonuçlar CO değerinden %20 veya daha fazla uzakta olan SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinin tutarlı sonuçlar vermesinin bekleneceğine işaret eder. CO'ya yakın olan SurePath post-gradiyent hücre peleti örnekleri yaklaşık eşit miktarlarda pozitif ve negatif sonuçlar vermişlerdir. Bu veriler QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinden örnek hazırlama ve sonrasında *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi ile test yapılmasının tekrar üretilebilir sonuçlar verdiğini gösterir.

Dahili çalışmanın sonuçları ayrıca QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinden örnek hazırlamayla elde edilen sonuçların kantitatif tekrar üretilebilirliğini değerlendirmek için kullanılmıştır.

Dört farklı operatör 3 farklı QIASymphony SP cihazı ve 3 farklı QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti lotları kullanarak panel üyeleri 1, 2, 3, 4 ve 5 ile 6 farklı günde test yapmıştır. Panel üyeleri 1, 2, 3 ve 4 toplam 18 replikatla test edilmiş ve her panel üyesi için 162 veri noktası sağlamıştır. Panel üyesi 5, 16 replikatla test edilmiş ve 144 veri noktası ortaya çıkmıştır (bakınız aşağıda Tablo 54).

Tablo 54. SurePath post-gradiyent hücre peleti örneklerinin tekrar üretilebilirliği — QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak örnek hazırlama, kantitatif tekrar üretilebilirlik

Panel üyesi	n	Standart sapma				Tahmini toplam standart sapma	Tahmini total CV (%)
		Ortalama RLU/CO	Çalışmalar içinde	Günler arası	Kombinasyonlar arasında*		
1	162	0.12	0.02	0.00	0.01	0.02	19.80
2	162	1.00	0.08	0.02	0.06	0.10	10.27
3	162	4.99	0.37	0.13	0.38	0.55	11.00
4	162	9.78	0.61	0.23	0.54	0.85	8.72
5	144	26.40	2.19	0.70	1.51	2.75	10.41

* Farklı günler, operatörler, QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti lotları ve QIASymphony SP cihazlarının kombinasyonları arasında.

Kantitatif tekrar üretilebilirlik tüm CV değerlerinin %20 altında kalmasıyla gösterildiği şekilde çok yüksektir. Çalışmalar arasında standart sapmalar çalışmalar içinde karşılık gelen değere benzerdir ve bu durum kullanılan alet veya kit lotuna bakılmaksızın tutarlı sonuçlara işaret eder.

Çapraz reaktivite

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

Aşağıdaki bakterilerin tümü test edilmiş ve hepsi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle negatif test sonucu vermiştir:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*

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

Aşağıdaki viral veya plazmid DNA veya insan serumları test edilmiş ve hepsi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle negatif test sonucu vermiştir:

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

- Adenovirüs 2
- Sitomegalovirüs
- Epstein-Barr virüsü
- Hepatit B yüzey antijeni pozitif serum
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- İnsan immünyetmezlik virüsü (HIV, RT DNA)
- HPV tipleri 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 ve 30
- Simian virüsü tip 40 (SV40)

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle çapraz reaktivite gösteren tek plazmid pBR322 olmuştur. pBR322 ile Prob Karışımı arasındaki çapraz reaktivite beklenmedik değildir çünkü HPV inserti izole edilirken tüm vektör pBR322 DNA'sının çıkarılması zordur. pBR322 homolog sekanslarının varlığı insan genital numunelerinde bildirilmiştir ve yüksek bakteriyel plazmid seviyeleri varlığında yalancı pozitif sonuçlar oluşabilir. Ancak *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile pozitif sonuç veren 298 klinik numune bir pBR322 probu ile test edildiğinde pozitif sonuçların hiçbirinin pBR322'ye bağlı olmadığını göstermiştir. Böylece bir *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi yalancı pozitif sonucunun klinik numunelerde homolog pBR322 sekanslarına bağlı olması olasılığı düşük görülmektedir.

Çapraz hibridizasyon

On sekiz farklı HPV tipi (yüksek risk ve düşük risk) 4 ng/ml HPV DNA konsantrasyonlarında *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test edilmiştir. Tüm yüksek risk HPV hedeflerinin hepsi pozitif bulunmuştur. Bu çalışma ayrıca HPV tip 6 ve 42 ile *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi arasında az miktarda çapraz hibridizasyon olduğunu göstermiştir. Yüksek seviyelerde (4 ng/ml veya üstü) HPV tip 6 veya HPV 42 bulunan hasta numuneleri *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile yalancı pozitif sonuç verebilir. Bunun klinik önemi 4 ng/ml veya üzerinde bulunduğu hastaların HPV tip 6 veya 42 bulunan hastaların gereksiz yere kolposkopiye sevk edilebileceğidir.

digene HC2 High-Risk HPV DNA Testinin ayrıca HPV tipleri 40, 53 ve 66 ile çapraz reaksiyon gösterdiği gösterilmiştir. Bu tipler nadirdir ve bu tiplerle enfeksiyon ile yüksek evre hastalık gelişmesi arasındaki tam korelasyonu belirlemek için bulgular yeterli değildir (15). Literatürde ayrıca bu testte kullanılan benzer kompleks problemlerin HPV tip 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 veya MM9 ile çapraz hibridizasyon nedeniyle çapraz pozitif sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (35). Bu HPV tiplerinin birkaçı nadir veya yüksek evre hastalıkla sık görülmeyen yeni

tipler olsa da bu HPV DNA tiplerinin yüksek seviyelerini içeren numuneleri bulunan hastalar yanışlılıkla kolposkopiye sevk edilebilir.

Kan ve diğer maddelerin STM numunelerine etkisi

Kan ve diğer olası enterferans yapan tanımlanmış veya tanımlanmamış maddelerin etkisi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle değerlendirilmiştir. Tam kan, vajinal yıkama sıvısı, antifungal krem ve kontraseptif jöle (servikal numunelerde sıklıkla bulunabilen ajanlar) STM negatif ve STM pozitif numunelere (klinik numune havuzları ve klinik olmayan numuneler) servikal numunelerde bulunabilecek konsantrasyonlarda eklenmiştir.

Bu dört ajanın herhangi biriyle herhangi bir konsantrasyonda yalancı pozitif sonuçlar gözlenmemiştir. Ancak HPV DNA seviyeleri test için CO değerine (1 pg/ml) yakın olan klinik numunelerle yüksek konsantrasyonlarda antifungal krem veya kontraseptif jöle mevcutsa yalancı negatif bir sonuç bildirilebilir. Yine de bir klinik numunenin tamamen bu maddelerden herhangi birinden oluşma olasılığı çok düşüktür çünkü Pap smear ve HPV testi için numune almadan önce serviks rutin olarak temizlenir

Kan ve diğer maddelerin PreservCyt numunelerine etkisi

Manuel örnek hazırlama

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

QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak örnek hazırlama

PreservCyt numunelerinde kan ve diğer olası enterferans yapıcı maddelerin etkileri örnek hazırlama için QIASymphony DSP HPV Media Kiti kullanılarak ve *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi ile RCS otomatik testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Aşağıdaki olası enterferans yapısı maddelerin etkileri test edilmiştir:

- Anti fungal krem

- Antienflamatuar krem
- Kan
- Kontraseptif jöle
- Vajinal yıkama sıvısı
- Kadın koku giderici fitilleri
- Kayganlaştırıcı jöle
- Spermisid

Her madde negatif ve pozitif klinik havuzlara eklenmiştir. Servikal numunelerde bulunabilecek bir konsantrasyonda maddelerin hiçbirisiyle yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçlar izlenmemiştir. Ancak HPV DNA seviyeleri test için CO değerine yakın olan klinik numunelerde yüksek konsantrasyonlarda antifungal krem, vajinal kayganlaştırıcı jöle veya kan mevcutsa yalancı negatif bir sonuç bildirilebilir. Yine de bir klinik numunenin tamamen bu maddelerden herhangi birinden oluşma olasılığı çok düşüktür çünkü Pap smear ve HPV testi için numune almadan önce serviks rutin olarak temizlenir.

QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak örnek hazırlama

PreservCyt numunelerinde tam kanın etkisi QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti örnek hazırlama kullanımı ve sonra *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle test yapma ile değerlendirilmiştir. Görünür olarak kanlı klinik numuneler seçilmiş ve hem manuel örnek hazırlama yöntemi hem QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar 238 numune için karşılaştırılmış ve elde edilen toplam %94,12 anlaşma ve 0,2850 McNemar p değeri manuel örnek hazırlama ile QIASymphony DSP AXpH DNA Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama yöntemi arasında klinik performans açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığına işaret etmiştir.

Aşağıdaki olası enterferans yapısı maddelerin etkileri test edilmiştir:

- Vajinal yıkama sıvısı
- Antifungal krem
- Kontraseptif jöle
- Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC)
- Kayganlaştırıcı jöle
- Cinsel bölge spreyi
- Spermisid
- Manyetik partiküller

- TopElute Sıvısı

Her madde servikal numunelerde bulunabilecek veya örnek hazırlama sırasında eklenebilecek konsantrasyonlarda negatif ve pozitif hücrel havuzlara eklenmiştir. Herhangi bir maddeyle herhangi bir konsantrasyonda yalancı pozitif sonuç elde edilmemiştir. Kontraseptif jöle dışında herhangi bir yalancı negatif sonuç gözlenmemiştir. Kontraseptif jöle mevcutsa QIASymphony DSP AXpH DNA Kitini kullanarak otomatik örnek hazırlama için bir PreservCyt servikal numunesi almayın.

Kan ve diğer maddelerin SurePath numunelerine etkisi

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath örneklerinden örnek hazırlama

SurePath örneklerinde kan ve diğer enterferans yapabilecek maddelerin etkileri örnek hazırlama için QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti ile ve *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi kullanılarak RCS otomatik testiyle değerlendirilmiştir.

Aşağıdaki olası enterferans yapısı maddelerin etkileri test edilmiştir:

- Antifungal krem
- Antienflamatuar krem
- Kan
- Kontraseptif jöle
- Vajinal yıkama sıvısı
- Kadın koku giderici fitilleri
- Kayganlaştırıcı jöle
- Spermid

Her madde negatif ve pozitif klinik havuzlara eklenmiştir. Servikal numunelerde bulunabilecek bir konsantrasyonda maddelerin hiçbirisiyle yalancı pozitif sonuçlar izlenmemiştir.

Aşağıdaki maddeler dışında herhangi bir yalancı negatif sonuç gözlenmemiştir:

- Kontraseptif jöle çok düşük konsantrasyonda yalancı negatif sonuçlara neden olmuştur.
- Numunede yüksek konsantrasyonda antifungal krem mevcutsa HPV DNA seviyeleri test için CO noktasına yakın klinik numunelerle yalancı negatif bir sonuç bildirilebilir. Yine de bir klinik numunenin tamamen antifungal kremden oluşma olasılığı çok düşüktür çünkü Pap smear ve HPV testi için numune almadan önce serviks rutin olarak temizlenir.
- Kontraseptif jöle veya antifungal krem mevcutsa SurePath servikal numunesini QIASymphony DSP HPV Media Kitiyle otomatik örnek hazırlama için almayın.

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath örneklerinden örnek hazırlama

SurePath örneklerinde kan ve diğer enterferans yapabilecek maddelerin etkileri örnek hazırlama için QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti ile ve *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi kullanılarak RCS otomatik testiyle değerlendirilmiştir.

Antifungal krem veya kontraseptif jöle varsa QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama için bir SurePath servikal numunesi almayın.

QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinden örnek hazırlama

SurePath post-gradyent hücre peleti örneklerinde kan ve diğer enterferans yapabilecek maddelerin etkileri örnek hazırlama için QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti ile ve *digene* HC2 Yüksek Risk HPV DNA Testi kullanılarak RCS otomatik testiyle değerlendirilmiştir.

Aşağıdaki olası enterferans yapısı maddelerin etkileri test edilmiştir:

- Antifungal krem
- Antienflamatuar krem
- Kan
- Kontraseptif jöle
- Vajinal yıkama sıvısı
- Kadın koku giderici fitilleri
- Kayganlaştırıcı jöle
- Spermisid

Her madde bir SurePath post-gradyent hücre peleti örneğini taklit etmek üzere BD PrepMate Sisteminde işlenen negatif ve pozitif klinik havuzlara eklenmiştir. Hem kan hem antifungal krem için tek bir yalancı pozitif sonuç gözlenmiştir; ancak istatistiksel analiz önemli bir enterferans göstermemiştir. Servikal numunelerde bulunabilecek konsantrasyonlarda diğer maddelerin hiçbirisiyle yalancı pozitif sonuç elde edilmemiştir.

Antifungal krem, antienflamatuar krem ve kontraseptif jöle için yalancı negatif sonuçlar gözlenmiştir. Antifungal krem, antienflamatuar krem veya kontraseptif jöle varsa QIASymphony DSP HPV Ortam Kiti kullanılarak otomatik örnek hazırlama için bir SurePath servikal numunesi almayın

Bulaşma

RCS reaktif ve numune aspirasyonu için tek kullanımlık pipet uçlarının kullanımı yoluyla rezidüel alkali fosfatın bulaşması veya numune kontaminasyonunu minimuma indirmek üzere tasarlanmıştır. Bu tasarım özelliğini doğrulamak üzere QIAGEN, RCS kullanımının manuel yöntemle karşılaştırıldığında numunelerde çapraz kontaminasyon veya bulaşma olasılığını artırıp artırmadığını değerlendirmek üzere birkaç çalışma yapmıştır. Sistemden sisteme bulaşma potansiyelini değerlendirmek için çok sayıda RCS aleti kullanılmıştır.

Bir çalışmada yüksek pozitif STM numuneleri hazırlamak üzere Negatif Kontrole 2 ng ve 20 ng HPV DNA plazmidi eklenmiştir. 20 ng/ml konsantrasyonu rutin klinik testler sırasında gözlenmesi beklenen en yüksek pozitif klinik numuneden yaklaşık 3-5 kat daha yüksek RLU değerleri verir. Bu simüle edilmiş yüksek pozitif numuneler mikropkaya boyunca sadece Negatif Kontrol içeren kuyularla alternasyon gösterecek şekilde bir dama tahtası paterninde yerleştirilmiştir (test kuyuları). Bu tasarım dizisel yüksek pozitif numunelerin olası aditif etkilerini dikkate alır. Mikropkalar sonra hem manuel hem RCS otomatik test yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. İşlendikten sonra yalancı test pozitif kuyularının sayısı karşılaştırılmıştır. RCS otomatik testi bu simüle edilmiş STM numuneleriyle mikropkaya üzerinde son derece yüksek bir pozitif numune sekansı bulunduğu zaman bile manuel teste göre daha fazla yalancı pozitif test kuyusu vermemiştir.

İkinci bir bulaşma değerlendirmesinde HPV pozitif hasta PreservCyt numuneleri rutin klinik RCS otomatik testi sırasında beklenen aralığı temsil edecek RLU/CO değerleri vermek üzere farklı kemilüminesans düzeylerine sahip numuneler paneli oluşturmak için kombine edilmiştir. Pozitif numuneler yaklaşık 200-1800 RLU/CO aralığında bulunmuştur. Bulaşma potansiyelini, arka arkaya yüksek pozitiflerin olası aditif etkileri dahil olarak değerlendirmek üzere bu pozitif panel üyeleri negatif kontrol kuyularına komşu olarak mikropkalar üzerine bir dama tahtası paterninde yerleştirilmiştir. Bu plakalar sonra RCS otomatik test yöntemleri kullanılarak test edilmiştir.

Birleştirilmiş hasta numunelerini kullanan bu bulaşma değerlendirmesinin sonuçları *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle RCS otomatik testi yaparken bulaşma etkileri nedeniyle %0,3 olası yalancı pozitif oranına işaret eder.

QIAGEN'in birleştirilmiş PreservCyt numuneleri ile yaptığı testlerle deneyimleri hasta PreservCyt numunelerini birleştirmenin tek hasta numunelerine benzer özelliklere sahip olmayan numuneler oluşturduğu şeklindedir. Bu birleştirmenin RCS otomatik testinin bulaşma potansiyeli üzerine etkileri bilinmese de RCS otomatik testinin ek prelinik testleri bulaşma nedeniyle yalancı pozitif sonuçlar için artmış potansiyelle işaret etmemiştir. Bu değerlendirmeler klinik ortamda

gözlenenin yaklaşık 5 katı DNA konsantrasyonlarıyla yapay plazmid numuneleri kullanılarak yapılmıştır.

Üçüncü bir bulaşma değerlendirmesi *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test reaktifleri ve klinik numunelerin viskozitesine yakın olan arka alan matriksleri için testin dinamik RLU aralığını temsil edecek konsantrasyonlarda floresan boya ekleyerek test numuneleri oluşturmuştur. Bu test numuneleri sonra 3 farklı RCS aleti kullanarak işlenmiş ve RCS'nin temel işlemsel adımlarının her birinin bulaşma potansiyeli değerlendirilmiştir:

- Numune transferi
- Plakadan plakaya transfer
- Prob ekleme
- Mikroplaka sallama
- Mikroplaka yıkama

Floresans 485 nm eksitasyon dalgaboyunda ve 535 nm emisyon dalgaboyunda ölçülmüş ve *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testiyle bir yalancı pozitif karşılık gelecek şekilde 1:20.000 gücünde bir bulaşma olayını saptayacak kadar hassas olmuştur (yani, 20 ng'de 1 pg). Bu değerlendirmenin sonuçları RCS'nin temel işlemsel adımlarının herhangi biri sırasında yalancı pozitif *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testi sonucuna neden olacak bir bulaşma olayı göstermemiştir.

Cihaz içi reaktif stabilitesi

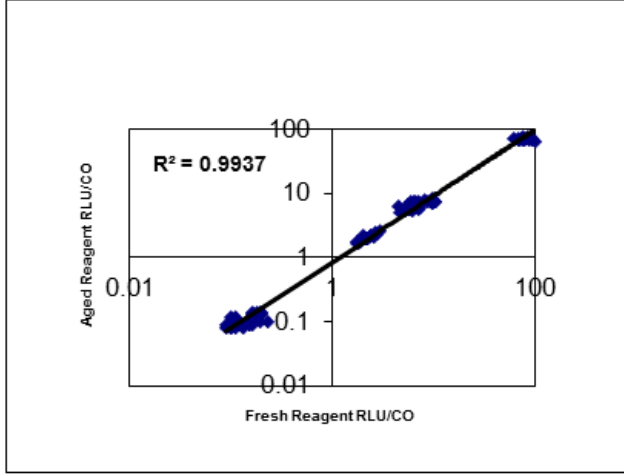
QIAGEN sistem platformunda uzun süreler cihaz içi kalan reaktifleri kullanırken RCS otomatik testinin performans özelliklerini değerlendirmiştir. Uzun süreli cihaz içi yerleştirmeye en çok tabi kalması beklenen reaktifler Prob Karışımı, DR1, DR2, ve Yakalama Mikroplakasıdır.

Test performansı hem taze hazırlanmış reaktifler hem de RCS aleti üzerinde cihaz içi olarak 16 saatlik bir süreye kadar oda sıcaklığında eskimesi beklenen (laboratuvar ortamında 2 vardiyayı simüle etmek üzere) reaktifler kullanılarak değerlendirilmiştir. Simüle edilmiş klinik numunelerin test edilmesi tanımlanmış bir reaktif matriksiyle 2 test gününün her birinde 2 RCS aleti kullanılarak yapılmıştır (bakınız aşağıda Tablo 55).

Tablo 55. Cihaz içi reaktif stabilitesi için çalışma tasarımı

RCS aleti	Gün 1	Gün 2
1	Eskimiş reaktifler	Taze reaktifler
2	Taze reaktifler	Eskimiş reaktifler

Tüm RLU/CO veri noktalarının bir plotu Şekil 3'te gösterilmiştir. Eskimiş ile taze reaktiflerin karşılaştırmalı plot ve regresyon analizi eskimiş ve taze reaktifler arasında anlaşmaya işaret etmektedir.



Şekil 3. Eskimiş ve taze reaktifleri kullanarak analiz kalibratör ve kontrol değerlerini karşılaştıran dağılım plotu.

Anlaşma sonuçlarının daha ileri incelenmesi eskimiş reaktifleri kullanırken kalitatif sonuçların değişmediğini göstermektedir (bakınız aşağıda Tablo 56).

Tablo 56. Taze ve eski reaktiflerin anlaşması

İstatistiksel ölçüt	Sonuç
Genel anlaşma (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
%95 CI	97.97–100.0
Pozitif anlaşma (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
%95 CI	97.97–100.0
Negatif anlaşma (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
%95 CI	97.97–100.0
R ²	0.9937
Eğim	0.97
Kesişim	0.47
Kappa	1.0

Veri analizi sonuçların taze ve eskimiş reaktifler için aynı olduğunu göstermektedir ve bu durum reaktiflerin alete 16 saate kadar bir süre boyunca cihaz-ıçi yerleştirildiğinde yeterince stabil olduğuna işaret eder.

Referanslar

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

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










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

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

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

Semboller

Bu kullanma talimatında aşağıdaki tablodaki semboller kullanılmıştır:

Sembol	Sembol tanımı
 96	96 test için yeterli içerik
 384	384 test için yeterli içerik
	İn vitro diagnostik tıbbi cihaz
	Katalog numarası
	Üretici
	Avrupa Topluluğunda yetkili temsilci
	Son kullanma tarihi
	Kullanma talimatına başvurun
	Global Ticaret Madde Numarası

Sorun Giderme Kılavuzu

Açıklama ve öneriler

Denatürasyon sırasında renk değişikliği hatalı veya hiç gözlenmiyor.

- a) DNR uygun şekilde hazırlanmamış DNR'nin Gösterge Boyayı içerdiğinden ve koyu mor renkte olduğundan emin olun.
- b) DNR eklenmemiş Numune hacmini ölçerek (1,5 ml beklenir) DNR'nin numuneye eklendiğini doğrulayın. Eğer hacim DNR eklenmediğine işaret ederse doğru eklemeyi yapın, karıştırın ve bu sefer uygun renk değişikliği gözlenirse teste devam edin.
- c) Numuneler renk değişikliğini maskeleyen kan veya başka materyaller içeriyor Tarif edilen renk değişikliği bu numunelerde beklenmez; test sonuçlarının olumsuz etkilenmemesi gerekir.
- d) Numune pH'ı olağandışı asidik olabilir. Diğer nedenlerden hiçbiri geçerli değilse, numune olağandışı asidik olabilir ve beklenen renk değişikliği oluşmayacaktır. Servikse asetik asit uygulamadan önce yeni bir numune alın çünkü uygun olmayan numune pH'ı test sonuçlarını olumsuz etkiler.

Kalite kontroller hatalı sonuçlar verir.

- a) Test için yanlış analiz protokolü seçilmiş Yapılmakta olan test için analiz protokolü yanlışsa DR2 eklendikten sonra 30 dakika içinde doğru analiz protokolü kullanılarak mikropkaka tekrar okunmalıdır.
- b) QC1-LR ve QC2-HR ters yerleştirilmiş Numuneleri tekrar test edin.
- c) HRC ve QC2-HR ters yerleştirilmiş Numuneleri tekrar test edin.

Açıklama ve öneriler

Hibridizasyon sırasında hatalı renk değişikliği gözlenmiş.

- a) Prob Karışımının denatüre kalibratörler, kalite kontrol ve/veya numunelerle yetersiz karıştırılması veya Prob Karışımı eklenmemiş veya hatalı hacimde reaktif eklenmiş
- Hibridizasyon mikrolakasını veya mikrotüpleri içeren mikrotüp askısını 2 dakika daha sallayın. Halen mor kalan mikrotüpler veya mikrolaka kuyuları varsa doğru Prob Karışımından 25 µl daha ekleyin ve iyi karıştırın. Prob Karışımı eklenip tekrar karıştırıldığında uygun renk değişimi olmazsa ve numune kan veya başka materyaller yoksa numuneyi tekrar test edin.
- b) Numuneler renk değişikliğini maskeleyen kan veya başka materyaller içeriyor
- Tarif edilen renk değişikliği bu numunelerde beklenmez; test sonuçlarının olumsuz etkilenmemesi gerekir.
- c) Numune <1000 µl STM değerine sahip
- Orijinal numunenin hacmini kontrol edin. Hacim $1425 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$ olmalıdır (test için 75 µl bölüntü alındıktan sonra). Hacim <1425 µl ise, orijinal numune <1000 µl STM içermiştir. Yeni bir numune alın.

Test analiz doğrulamayı geçemez. Pozitif kalibratörler, kalite kontroller veya numunelerde sinyal gözlenmiyor.

- a) Prob Seyrelticiye prob eklenmemiş
- Prob Karışımını bu kullanma talimatında tanımlandığı şekilde hazırlayın. Tüpleri dikkatle etiketleyin.
- b) Hazırlama sırasında prob, RNaz ile kontamine olmuş
- Probu pipetlerken aerosol bariyeri pipet uçları kullanın ve eldiven takın. Prob Karışımını steril kaplarda hazırlayın. Sadece temiz, yeni tek kullanımlık reaktif rezervuarları kullanın.
- c) Prob Karışımının yetersiz karıştırılması
- Probu Prob Seyrelticiye ekledikten sonra en az 5 saniye yüksek hızda vorteksleyerek iyice karıştırın. Görünür bir vorteks oluşmalıdır.
- d) Prob Karışımı ve denatüre numunenin yetersiz karıştırılması
- Prob Karışımı ve numuneyi her hibridizasyon mikrolakası kuyusu veya hibridizasyon mikrotüpüne ekledikten sonra Rotary Shaker I üzerinde 3 ± 2 dakika 1100 ± 100 devir/dk hızında sallayın. Her mikrolaka kuyusu veya mikrotüpte mordan sarıya renk değişimini kontrol edin.
- e) Hibridizasyon adımı
- $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 60 ± 5 dakika hibridize edin. Microplate

Açıklama ve öneriler

- | | |
|---|--|
| yanlış süre veya sıcaklık | Heater I veya su banyosunun sıcaklığını kontrol edin. Microplate Heater I veya su banyosunun numuneleri doğru sıcaklığa ısıtmak üzere ayarlandığından ve kullanımdan önce 60 dakika ön ısıtıldığından emin olun. Su seviyesinin numuneleri doğru sıcaklığa ısıtmaya yeterli olduğundan emin olun. Su banyoları düzenli olarak kalibre edilmelidir. |
| f) Yakalama adımında yetersiz karıştırma | Bir Rotary Shaker I üzerinde bu kullanma talimatında belirtildiği gibi 20–25°C'de 60 ±5 dakika sallayın. Rotary Shaker I hızını kalibrasyonla doğrulayın. (Bakınız Rotary Shaker I Kullanıcı El Kitabı) (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>). |
| g) DR1 doğru miktarının eklenmemesi veya belirtilen süre boyunca inkübasyon yapılmaması | 8 kanallı bir pipet kullanarak her mikrolaka kuyusuna 75 µl DR1 pipetleyin. 20–25°C'de 30–45 dakika inkübe edin. |
| h) DR2 doğru miktarının eklenmemesi veya belirtilen süre boyunca inkübasyon yapılmaması | 8 kanallı bir pipet kullanarak her mikrolaka kuyusuna 75 µl DR2 pipetleyin. 20–25°C'de 15–30 dakika inkübe edin. |
| i) DML aleti arızası veya hatalı programlama | Daha ileri talimat için ilgili DML aleti kullanıcı el kitabı ve yazılım kullanıcı el kitabına başvurun veya QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun. |

Kalibratörler, kalite kontrol ve/veya numunelerde artmış RLU değerleri (birçok kuyuda veya tüm kuyularda ≥ 200 RLU). Test, analiz doğrulamayı geçemez.

- | | |
|---|--|
| a) DNR eklenmemiş veya hatalı reaktif hacmi eklenmiş veya DNR'nin numuneler veya kalibratörler veya kalite kontrollerle yetersiz karıştırılması | Tekrarlama pipetörünün doğru iletim yaptığını DNR eklemeyen önce doğrulayın. Kalibre edilmiş pipetler şarttır. Her tüpe yarım hacim DNR ekleyin ve iyice karıştırın. Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkadığından emin olun. Kalibratörler, kalite kontroller ve numunelerin DNR eklendikten sonra mor renge dönüşmelidir. |
|---|--|

Açıklama ve öneriler

- | | |
|---|--|
| b) DML aletinde ışık sızması, kapı mühürlenmemiş, kapı etrafındaki mühür bozulmuş | Boş bir mikroplaka okuyarak DML aletinde bir arka alan okuması yapın (ham veri ölçümü). 50 RLU üzerindeki bir ölçüm bir ışık kaçağı bulunduğu işaret eder. Talimat için ilgili DML aleti kullanıcı el kitabına başvurun veya QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun. |
| c) DR2 veya yakalama mikroplakası kuyularının DR1 veya eksojen alkalin fosfatazla kontaminasyonu | Bakınız “DR2 Kontaminasyon kontrolü”, sayfa 127. |
| d) Kontamine Yıkama Tamponu | Bakınız “Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu”, sayfa 127. |
| e) Kontamine Automated Plate Washer | Bakınız “Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu”, sayfa 127. |
| f) DR1 inkübasyonundan sonra yakalama mikroplaka kuyularının yetersiz yıkanması | Yakalama mikroplakası kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde mikroplaka kuyularını taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın. Yıkamadan sonra mikroplaka kuyularında görünür pembe sıvı kalmamalıdır. Testlerde kontaminasyon veya arızalar için Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) başvurun. |
| g) Mikroplaka kuyularında DR1 kontaminasyonu | Tüm çalışma yüzeylerinin temiz ve kuru olduğundan emin olun. DR1 kullanırken dikkatli olun. Aerosollerden kaçınin. |
| h) Hibridizasyon solüsyonunu Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havluların aynı bölgesine dokunarak kurutulması | Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havluların daha önce kullanılmış aynı bölgesine dokunarak kurutmayın. |
| i) Hatalı kurutma havlularının kullanılması | Dokunarak sıvıyı gidermek için Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğeri az tiftikli kağıt havlular kullanın. |

Açıklama ve öneriler

Düşük PC/NC oranları veya oranın <2,0 olduğu yüksek sayıda (>%20) düşük pozitif numune. Test, analiz doğrulamayı geçemez.

- | | |
|---|---|
| a) Yetersiz örnek hazırlama | Doğru DNR hacmini ekleyin ve vortekslemeyle iyice karıştırın. Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkadığından emin olun.

PreservCyt numuneleri için denatürasyon inkübasyonundan önce uygun karıştırma ve hücre peleti tekrar süspansiyonunun tamamlandığından emin olun.

Saydamdan koyu mora belirgin bir renk değişikliği gözlenmelidir. $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 45 ± 5 dakika inkübe edin. |
| b) Prob Karışımı yeterince karıştırılmamış veya yetersiz Prob Karışımı eklenmiş | Prob Karışımını tanımlandığı şekilde hazırlayın. Vortekslemeyle, görünür bir vorteks oluştuğundan emin olarak iyice karıştırın. Prob Karışımı doğru iletimden emin olunması için tüplere bir tekrarlayan pozitif displasman pipeti veya çoklu kanallı pipetle eklenmelidir. |
| c) Her hibridizasyon mikrotüpü veya mikroplaka kuyusuan yetersiz Prob Karışımı hacmi eklenmiş | 8 kanallı pipetin doğru iletim yaptığını Prob Karışımını eklemeyen önce doğrulayın. Denatüre kalibratörler, kalite kontroller ve numuneleri içeren her mikrotüp veya mikroplaka kuyusuna 25 µl Prob Karışımı ekleyin. Renk değişimi ekleyip iyice karıştırmadan sonra koyu mordan sarıya olmalıdır. PreservCyt numuneleri sarı yerine pembeye dönmelidir. |
| d) DR1 aktivitesi kaybı | DR1'i $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de saklayın. Son kullanma tarihinden önce kullanın. |
| e) Yetersiz yakalama | Yakalama adımı 1100 ± 100 devir/dk olarak ayarlanmış bir Rotary Shaker I kullanılarak yapılmalıdır. Shaker hızını kalibrasyonla doğrulayın. |
| f) Yetersiz yıkama | Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde mikroplaka kuyularını taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın. |
| g) Kontamine Yıkama Tamponu | Bakınız "Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu", sayfa 127. |

RLU değerleri yaklaşık aynı olan bir dizi pozitif numune.

- | | |
|---|---|
| a) Test sırasında yakalama mikroplakası kuyularının | Tüm inkübasyonlar sırasında yakalama mikroplakasını örtün. Testi yaparken tüplerin aerosol kontaminasyonuna |
|---|---|

Açıklama ve öneriler

- | | |
|-----------------------------------|---|
| kontaminasyonu | maruz kalmasından kaçının. Kullanım sırasında pudrasız eldivenler takın. |
| b) DR2 kontaminasyonu | DR2'yi yakalama mikropkaka kuyularına pipetlerken stoğu kontamine etmediğinizden emin olun. DR2'nin DR1 aerosolleri veya laboratuvar tozu, vs. ile kontaminasyonundan kaçının. |
| c) Automated Plate Washer arızası | Kontaminasyon veya arızalar için test yapma talimatı için "Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu", sayfa 127 kısmına bakın veya Otomatik Plaka Yıkayıcı Kullanıcı El Kitabına (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) başvurun. |

Replikatlar arasında geniş CV.

- | | |
|---|--|
| a) Hatalı pipetleme | Tekrar üretilebilir hacimlerin iletildiğinden emin olmak için pipeti kontrol edin. Pipetleri rutin olarak kalibre edin. |
| b) Yetersiz karıştırma | Tüm adımlarda iyice karıştırın. Denatürasyon inkübasyonu önce ve sonra ve Prob Karışımının eklenmesinden sonra iyice vorteksleyin. Görünür bir vorteks olduğundan emin olun. |
| c) Sıvının hibridizasyon mikrotüpleri veya hibridizasyon mikropkaka kuyularından yakalama mikropkaka kuyularına tam olmayan transferi | Hibridizasyon mikropkaka veya hibridizasyon mikrotüplerinden yakalama mikropkaka kuyularına transfer adımı sırasında tekrar üretilebilir hacimlerin aktarıldığından emin olun. |
| d) Uygun olmayan yıkama koşulları | Mikropkaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde mikropkaka kuyularını taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın. |
| e) Mikropkaka kuyularında DR1 kontaminasyonu | Tüm çalışma yüzeylerinin temiz ve kuru olduğundan emin olun. DR1 kullanırken dikkatli olun. Aerosollerden kaçının. |

Bilinen negatif numunelerden elde edilen yalancı pozitif sonuçlar.

- | | |
|------------------|--|
| a) DR2 kontamine | DR2'yi numuneler arasında bölerken numunelerde çapraz kontaminasyon oluşturmadığınızdan emin olun. Bir kitin bir parçasını kullanıyorsanız, o test için gerekli hacmi pipeti doldurmadan önce temiz, tek kullanımlık bir |
|------------------|--|

Açıklama ve öneriler

- reaktif rezervuarına bölüntüleyin.
- b) Mikroplaka kuyularında DR1 kontaminasyonu Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde mikroplaka kuyularını taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın. Yıkamadan sonra mikroplaka kuyularında görünür pembe sıvı kalmamalıdır.
- c) Birkaç sıra boyunca Kimtowels kağıt havluları veya eşdeğer tiftiksiz kağıt havluların aynı bölgesine dokunarak kurutulması Daha önce kullanılan bir bölgeye dokunarak suyu gidermeyin.
- d) Yetersiz örnek hazırlama Doğru DNR hacmini ekleyin ve vortekslemeyle iyice karıştırın. Yalancı pozitif sonuçlardan kaçınmak için sıvının tüpün tüm iç yüzeyini yıkadığından emin olun.
- PreservCyt numunelerinin manuel hazırlanması için denatürasyon inkübasyonundan önce uygun karıştırma ve hücre peleti tekrar süspansiyonunun tamamlandığından emin olun. *digene* HC2 Sample Conversion Kiti kullanma talimatına bakınız.
- Saydamdan koyu mora belirgin bir renk değişikliği gözlenmelidir. $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 45 ± 5 dakika inkübe edin. SurePath numunelerinin manuel hazırlanması için $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 90 ± 5 dakika inkübe edildiğinden emin olun.
- e) Uygun olmayan yıkama koşulları Mikroplaka kuyularını Yıkama Tamponuyla 6 kez, her seferinde mikroplaka kuyularını taşıyarak yıkayın veya Automated Plate Washer kullanın.
- f) Denatüre numunenin hibridizasyon mikrotüpü veya hibridizasyon mikroplaka kuyusuna aktarılması sırasında pipet ucunun denatüre olmamış materyallerle kontaminasyonu Numune işleme işleminin denatürasyon adımı bu kullanma talimatında belirtildiği şekilde yapılmalıdır. Yetersiz numune vorteksleme, tüp inversiyonu ve ajitasyon servikal numunelere endojen spesifik olmayan RNA–DNA hibridlerinin tam olmayan denatürasyonu sonuçlanabilir. Özellikler PreservCyt veya SurePath numunelerinde bu hibridlerin numune denatürasyon tüpü duvarlarında bulunması olasıdır. Bu denatüre olmamış hücre materyalinin bulaşmasını önlemek için pipet

Açıklama ve öneriler

ucunun denatüre numunenin hibridizasyon mikrotüpü veya hibridizasyon mikroplakası kuyusuna aktarılması sırasında numune denatürasyon tüpünün kenarlarına dokunmasına izin vermeyin.

Artmış NC RLU değerleri (>200 RLU). Testin kalan kısmı beklenen performansı gösterir.

- a) DR2 20–25°C üzerinde bir sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Testi tekrar çalışın ve yakalama ve saptama adımlarının 20–25°C'de inkübe edildiğinden emin olun.
- b) DR2 30 dakikadan daha uzun inkübe edilmiştir. Mikroplakayı 20–25°C'de 15 dakika inkübasyondan sonra (ve en fazla 30 dakika inkübasyondan sonra) okuyun.
- c) DR2 veya Yıkama Tamponu alkalin fosfataz veya DR1 ile kontamine olmuştur. Bakınız “DR2 Kontaminasyon kontrolü,” sayfa 127, veya “Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu”, sayfa 127.

Test analiz doğrulamayı geçemez. Artmış $PC\bar{X}/NC\bar{X}$.

HRC ve QC2-HR ters yerleştirilmiş Numuneleri Tekrar Test Edin. Bu reaktiflerin yerleştirilmesini ters yapmamak için kalibratör ve kalite kontrol flakonlarındaki etiketleri dikkatle okuyun.

DR2 Kontaminasyon kontrolü

1. Bölüntülenmiş, kalan veya orijinal DR2 flakonundan 75 µl miktarını boş bir yakalama mikrolakası kuyusuna pipetleyin.

Not: Performansın optimum değerlendirilmesi için DR2'yi 3 kopya halinde test edin.

2. 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçınin.
3. Mikrolakayı bir DML aleti kullanarak ölçün.

DR2 kontrolü <50 RLU olmalıdır.

DR2 değerleri <50 RLU ise testi tekrarlamak için DR2 kullanılabilir.

Kontamineyse (>50 RLU), yeni bir kit alın ve testi tekrarlayın.

Yıkama Aygıtı ve/veya su kaynağı kontaminasyonu

1. Kuyuları 1–4 olarak işaretleyin. 4 ayrı yakalama mikrolaka kuyusuna 75 µl DR2 pipetleyin.

Kuyu 1, DR2 kontrolü görevi yapar.

2. Yıkama Şişesinden yıkama tamponunu mikrolaka kuyusu 2'ye 10 µl pipetleyin.
3. Yıkama Tamponunun yıkayıcı tüpü içinden akmasını bekleyin. Tüpten 10 µl Yıkama Tamponunu mikrolaka kuyusu 3'e pipetleyin.
4. Yıkama Tamponunu hazırlamak için kullanılan sudan bir bölüntü alın. 10 µl suyu mikrolaka kuyusu 4'e pipetleyin.
5. 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçınin.
6. Mikrolakayı bir DML aleti kullanarak ölçün.

DR2 kontrolü (kuyu 1) <50 RLU olmalıdır.

Kuyu 2, 3 ve 4'ten RLU'yu DR2 kontrol RLU'suyla karşılaştırın. Kuyu 2, 3 ve 4 için ayrı RLU değerleri DR2 kontrol RLU'sunu 50 RLU geçmemelidir.

DR2 kontrolden 50 RLU üzerinde değerler kontaminasyona işaret eder. Yıkama Aygıtını temizleme ve bakımını yapma talimatı için bakınız "Manuel yıkama yöntemi", sayfa 55.

Automated Plate Washer kontaminasyon kontrolü

1. Kuyuları 1–5 olarak işaretleyin. 5 ayrı yakalama mikropkaya kuyusuna 75 µl DR2 pipetleyin.
Kuyu 1, DR2 kontrolü görevi yapar.
2. Plaka Yıkayıcı Yıkama Şişesinden 10 µl Yıkama Tamponunu mikropkaya kuyusu 2'ye pipetleyin.
3. Plaka Yıkayıcı Durulama Şişesinden 10 µl yıkama tamponunu mikropkaya kuyusu 3'e pipetleyin.
4. Plaka Yıkayıcı tuş takımında **Prime** düğmesine basıp Yıkama Tamponunun hatlardan akmasını bekleyin. Oluktan 10 µl Yıkama Tamponunu mikropkaya kuyusu 4'e pipetleyin.
5. Plaka Yıkayıcı tuş takımında **Rinse** düğmesine basıp durulama sıvısının hatlardan akmasını bekleyin. Oluktan 10 µl Yıkama Tamponunu mikropkaya kuyusu 5'e pipetleyin.
6. Örtün ve 20–25°C'de 15 dakika inkübe edin. Doğrudan güneş ışığından kaçının.
7. Mikropkayı bir DML aleti kullanarak ölçün.

DR2 kontrolü (kuyu 1) <50 RLU olmalıdır.

Kuyu 2, 3 ve 4 ve 5'ten RLU'yu DR2 kontrol RLU'suyla karşılaştırın. Kuyu 2, 3, 4 ve 5 için ayrı RLU değerleri DR2 kontrol RLU'sunu 50 RLU geçmemelidir.

Plaka Yıkayıcıdan, DR2 kontrolden 50 RLU üzerinde değerler kontaminasyona işaret eder.

Dekontaminasyon işlemi için Automated Plate Washer Kullanıcı El Kitabına (Automated Plate Washer User Manual) başvurun.

İrtibat Bilgisi

Yerel QIAGEN temsilcinizle irtibat kurmak için test kitinde sağlanan QIAGEN irtibat bilgisi sayfasını kullanın.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

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

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

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

Hybrid Capture teknolojisi Avusturya, Belçika, İsviçre, Lihtenştayn, Almanya, Danimarka, İspanya, Fransa, Birleşik Krallık, Yunanistan, İrlanda, İtalya, Lüksemburg, Hollanda ve İsveç'te tescilli Avrupa Patent No. 0 667 918 kapsamı altındadır.

A.B.D. Hybrid Capture Patenti

6,228,578B1

A.B.D. HPV Patentleri

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

© 2012–2015 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com