

Lipanj 2023.

# Upute za uporabu za test QIAscreen<sup>®</sup> HPV PCR Test (priručnik)



Inačica 1



Za in vitro dijagnostičku uporabu

Za uporabu s instrumentom Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx



617005



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



1132289HR

Sample to Insight



# Sadržaj

Predviđena uporaba .....	4
Sažetak i objašnjenje.....	5
Načelo postupka.....	6
Uključeni materijali .....	7
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	8
Potrošni materijal, reagensi i instrumenti za pripremu uzorka .....	8
Potrošni materijal za instrument Rotor-Gene Q MDx .....	8
Oprema .....	8
Oprema za ekstrakciju i real-time PCR .....	9
Upozorenja i mjere opreza .....	10
Sigurnosne informacije.....	10
Opće mjere opreza.....	10
Pohrana i rukovanje reagensima.....	12
Pohrana i rukovanje ispitcima.....	14
Priprema uzorka .....	16
Protokol: Test QIAscreen HPV PCR Test na instrumentu Rotor-Gene Q MDx .....	19
PCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom za 72 epruvete .....	21
Tumačenje rezultata .....	25
Ograničenja .....	27
Radne značajke.....	29
Granica detekcije (Limit of Detection, LoD).....	29
Analitička specifičnost .....	30

Kliničke radne značajke na cervikalnim ispitcima (brisovima) .....	30
Obnovljivost* .....	31
Radne značajke na samostalno prikupljenim (cerviko-)vaginalnim ispitcima .....	31
Interferirajuće tvari* .....	31
Referencije .....	32
Vodič za rješavanje problema .....	34
Simboli.....	36
Kontaktne podaci.....	38
Informacije za naručivanje.....	39
Povijest revizija dokumenta .....	41

# Predviđena uporaba

Test QIAscreen HPV PCR Test in vitro je ispitivanje koje se temelji na real-time PCR-u, a služi za kvalitativnu detekciju DNA humanog papiloma virusa (HPV) sljedećih 15 (vjerojatno) visokorizičnih genotipova HPV-a, tj., 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 i 68.

Uzorci koji se mogu testirati testom QIAscreen HPV PCR Test uključuju DNA izoliranu od ispitaka koji su prikupljeni na sljedeće načine:

- Cervikalni ispitci prikupljeni s pomoću pribora za prikupljanje nalik četkici/metlici (koje je prikupio liječnik)
- Vaginalni ispitci prikupljeni s pomoću četkice/metlice ili pribora za lavažu (samostalno prikupljeni)

## Indikacije za uporabu:

- Kao primarni test u probiru žena za rizik od raka vrata maternice (ili pretkanceroznog stanja) kako bi se utvrdila potreba za upućivanjem na kolposkopiju ili druge postupke praćenja
- Kao naknadni test za žene s rezultatima Papa testa s atipičnim pločastim stanicama neodređenog značenja (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) ili skvamoznom intraepitelnom neoplazijom niskog stupnja (Low-grade Squamous Intra-epithelial Neoplasia, Isil) kako bi se utvrdila potreba za upućivanjem na kolposkopiju ili druge postupke praćenja

Ovaj je proizvod namijenjen profesionalnim korisnicima, kao što su tehničari i djelatnici laboratorija koji su obučeni za obavljanje in vitro dijagnostičkih postupaka, tehnika molekularne biologije i za rad na sustavu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## Sažetak i objašnjenje

Humani papiloma virusi (HPV) propadaju porodici Papillomaviridae, a radi se o malim virusima s dvolančanom DNA. Veličina kružnog genoma iznosi približno 7,9 kilobaza. Identificirano je više od 100 tipova HPV-a, od kojih su određeni tipovi HPV-a, poznati kao visokorizični HPV (high-risk HPV, hrHPV) kao što su HPV 16 i 18, povezani s induciranjem mukoznih lezija koje mogu dovesti do maligniteta. Rak vrata maternice i lezije koje mu prethode (Cervikalna Intraepitelna Neoplazija, CIN) najpoznatije su komplikacije trajne infekcije visokorizičnim tipom HPV-a (1 – 3).

Virusni se genom sastoji od ranih (early, E) i kasnih (late, L) gena, koji redom kodiraju proteine potrebne za rane i kasne stadije životnog ciklusa HPV-a. Produkti gena E6 i E7 visokorizičnih tipova HPV-a (high-risk HPV, hrHPV) imaju kancerogena svojstva i nužni su za malignu transformaciju stanice domaćina (4). Maligna progresija često se povezuje s integracijom virusa u genom stanice domaćina (5). Integracija rezultira prekidom genoma virusa u regiji koja se može protezati od otvorenog okvira čitanja gena E1 do otvorenog okvira čitanja gena L1 (6). To može imati posljedice za amplifikaciju virusne DNA u tim regijama posredovanu PCR-om. Budući da o kontinuiranoj ekspresiji virusnih onkoproteina (7, 8) ne ovisi samo inicijacija transformiranog fenotipa, već i njegovo održavanje, virusna regija E6/E7 nepromjenjivo se zadržava u integriranim virusnim genomima u slučajevima raka vrata maternice (6). Test QIAscreen HPV PCR Test cilja na konzerviranu regiju unutar gena E7. Ispitivanje je klinički validirano u skladu s međunarodnim smjernicama za ispitivanja za detekciju HPV-a i u drugim ispitivanjima (9, 10, 14, 15).

## Načelo postupka

Test QIAscreen HPV PCR Test višestruko je ispitivanje koje se temelji na real-time PCR-u i koje je usmjereno na gen E7 15 (vjerojatno) visokorizičnih tipova HPV-a te koje upotrebljava fluorescentne probe za detekciju jednog ili više akumulirajućih produkata PCR-a. Tijekom svakog ciklusa PCR-a fluorescentni se signal povećava logaritamski, što rezultira amplifikacijskom krivuljom. Čim amplifikacijska krivulja cilja premaši svoj prag, uzorak se smatra pozitivnim za taj cilj. Višestruki format omogućuje istodobno otkrivanje četiri različite fluorescentne boje po reakciji, pri čemu svaka fluorescentna boja predstavlja drugi cilj. Četiri su različita cilja: **1.** HPV 16, **2.** HPV 18, **3.** 13 drugih visokorizičnih tipova HPV-a kao smjesa i **4.** humani  $\beta$ -globinski gen. Test QIAscreen HPV PCR Test odvojeno detektira HPV 16, HPV 18 i pool 13 drugih visokorizičnih HPV genotipova. Humani  $\beta$ -globinski gen upotrebljava se kao kontrola uzorka kojom se utvrđuju kvaliteta uzorka DNA i prisutnost potencijalnih inhibitornih tvari.

# Uključeni materijali

## Sadržaj kompleta

<b>QIAscreen HPV PCR Test Kit</b>		<b>72 reakcije</b>
<b>Kataloški br.</b>		<b>617005</b>
QIAscreen Master Mix (QIAscreen glavna mješavina) (1 epruveta)	Prozirna boja	1080 µL
QIAscreen Positive Control (QIAscreen pozitivna kontrola) (1 epruveta)	Prozirna boja	100 µL
QIAscreen Negative Control (QIAscreen negativna kontrola) (1 epruveta)	Prozirna boja	100 µL
<i>Upute za uporabu za test QIAscreen HPV PCR Test (priručnik)</i>		1

## Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (Safety Data Sheets, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

### Potrošni materijal, reagensi i instrumenti za pripremu uzorka

- Otopina Hologic PreservCyt® Solution (za pohranu uzoraka koje su pacijentice uzele same)
- Standardni kompleti za ekstrakciju DNA, kao što su komplet QIAamp® DSP virus spin kit (QIAGEN, kat. br. 61704), QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit (QIAGEN, kat. br. 937055) ili komplet NucleoMag 96 Tissue kit (Macherey-Nagel, kat. br. 744300)
- PBS za rukovanje cervikalnim ispitcima u mediju za prikupljanje PreservCyt
- AL buffer (QIAGEN, kat. br. 19075) za prethodnu obradu cervikalnih ispitaka prikupljenih u medijima za prikupljanje SurePath i CellSolutions

### Potrošni materijal za instrument Rotor-Gene Q MDx

- 0.1 mL Strip Tubes and Caps za upotrebu s rotorom sa 72 jažice (QIAGEN, kat. br. 981103 ili kat. br. 981106)

### Oprema

- Namjenske pipete\* (prilagodljive) za PCR (1 – 10 µL; 10 – 100 µL)
- Namjenski sterilni vršci za pipete začepljeni filtrom koji ne sadržavaju DNazu
- Rukavice za jednokratnu upotrebu
- Centrifuga za radnu površinu stola\*
- Vrtložna miješalica\*

\* Provjerite jesu li instrumenti pregledani i kalibrirani prema preporuci proizvođača.



## Oprema za ekstrakciju i real-time PCR

- QIASymphony SP Module (kat. br. 9001297) (za neobaveznu automatizaciju ekstrakcije)
- Sustav Rotor-Gene Q 5plex HRM System (kat. br. 9002033) ili Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM instrument (kat. br. 9002032) sa softverom Rotor-Gene Q inačice 2.3.1 ili novije\*
- Predložak za postupak QIAScreen za Rotor-Gene Q. Predložak se naziva „**QIAScreen RGQ profile v1.0.ret**”.
- Predlošci za analizu kanala QIAScreen za kanale: zeleni (HPV 16), žuti (HPV drugo), narančasti ( $\beta$ -globin) i crveni (HPV 18). Predlošci imaju ekstenziju datoteke „.qut”.

\* Ako je primjenjivo, instrument Rotor-Gene Q 5plex HRM s datumom proizvodnje od siječnja 2010. ili kasnijim. Datum proizvodnje možete saznati iz serijskog broja na stražnjoj strani instrumenta. Serijski broj ima format „mmggnnn”, pri čemu „mm” označuje mjesec proizvodnje u brojkama, „gg” označuje posljednje dvije brojke godine proizvodnje, a „nnn” označuje jedinstveni identifikator instrumenta.

# Upozorenja i mjere opreza

## Sigurnosne informacije

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

- Pozitivne i negativne kontrole testa QIAScreen HPV PCR Test sadržavaju natrijev azid kao konzervans (0,01 %). Natrijev azid može reagirati s olovom i bakrom u vodovodnim cijevima te tvoriti eksplozivne metalne azide. Ako ga odlažete kroz sudoper, isperite odvode obilnom količinom hladne vode kako biste spriječili nakupljanje azida.

## Opće mjere opreza

Upotreba PCR testova zahtijeva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je usmjerena na molekularnu biologiju i usklađena s primjenjivim propisima i važećim normama.

Uvijek vodite računa o sljedećem:

- Nosite zaštitne rukavice za jednokratnu upotrebu bez pudera, laboratorijsku kutu i zaštitu za oči kada rukujete ispitcima.
- Spriječite kontaminaciju ispitka i kompleta mikrobima i nukleazama (DNaza). DNaza može uzrokovati degradaciju DNA predloška.
- Izbjegavajte kontaminaciju produkta DNA ili PCR uslijed prijenosa jer bi to moglo rezultirati lažno pozitivnim signalom.
- Uvijek upotrebljavajte vrške pipeta za jednokratnu upotrebu koji ne sadržavaju DNazu te imaju pregrade za aerosol.

- Reagensi testa QIAscreen HPV PCR Test optimalno su razrijeđeni. Nemojte dodatno razrjeđivati reagente jer bi to moglo dovesti do smanjenja radnog učinka.
- Svi reagensi isporučeni uz test QIAscreen HPV PCR Test namijenjeni su za upotrebu isključivo s drugim reagensima isporučenima u istome kompletu. Nijedan reagens iz jednog kompleta nemojte zamijeniti istim reagensom iz drugog kompleta testa QIAscreen HPV PCR Test Kit, čak ni ako je iz iste serije jer to može utjecati na radni učinak.
- Za dodatna upozorenja, mjere opreza i postupke pogledajte korisnički priručnik za instrument Rotor-Gene Q MDx.
- Prije provođenja prvog postupka u danu provedite postupak zagrijavanja za instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na temperaturi od 95 °C u trajanju od 10 minuta.
- Promjena vremena inkubacije i temperatura može dovesti do pogrešnih ili neusklađenih podataka.
- Nemojte upotrebljavati dijelove kompleta kojima je istekao rok trajanja ili koji se bili nepravilno pohranjeni.
- Izlaganje komponenata svjetlosti svedite na najmanju moguću mjeru: reakcijske smjese mogu se izmijeniti uslijed izloženosti.
- Budite iznimno oprezni kako biste spriječili kontaminaciju smjesa sintetičkim materijalima sadržanima u reagensima PCR.
- Uklonite otpad od uzoraka i ispitivanja u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.

# Pohrana i rukovanje reagensima

## Uvjeti transporta

Test QIAscreen HPV PCR Test transportira se na suhom ledu. Ako bilo koja komponenta testa QIAscreen HPV PCR Test nije zamrzнула po primitku, ili je vanjska ambalaža otvorena tijekom prijevoza, ili pošiljka ne sadrži otpremnicu, priručnik ili reagente, obratite se jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Uvjeti pohrane

Test QIAscreen HPV PCR Test potrebno je odmah nakon primitka pohraniti na temperaturi od -30 do -15 °C u zamrzivač s konstantnom temperaturom i zaštititi od svjetlosti.

## Stabilnost


Kada je pohranjen u specificiranim uvjetima pohrane, test QIAscreen HPV PCR Test stabilan je do isteka roka trajanja navedenog na naljepnici kutije.

Nakon otvaranja reagensi se mogu pohraniti u njihovom originalnom pakiranju na temperaturi od -30 do -15 °C. Ponavljano zamrzavanje i odmrzavanje treba izbjegavati. Nemojte premašivati maksimalan iznos od 5 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

- Lagano promiješajte sadržaj epruvete preokrećući je 10 puta i centrifugirajte sve epruvete prije otvaranja.
- Rokovi trajanja za svaki reagens naznačeni su na pojedinačnim naljepnicama komponenata. Ako je pohranjen u ispravnim uvjetima, proizvod će zadržati radne značajke koje se odnose na vrijeme stabilnosti dokle god se upotrebljavaju iste serije komponenata.
- Postupci kontrole kvalitete u tvrtki QIAGEN uključuje funkcionalno ispitivanje kompleta prije njegova puštanja na tržište za svaku pojedinačnu partiju kompleta. Nemojte miješati reagente iz različitih kompleta, čak ni ako su iz iste serije.

Potrebno je paziti na rokove trajanja i uvjete pohrane ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponenata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok ili koje su bile nepravilno pohranjene.

# Pohrana i rukovanje ispitcima

<p><b>OPREZ</b></p> 	<p>Sa svim ispitcima potrebno je postupati kao s potencijalno zaraznim materijalom.</p>
---	---

## Cervikalni ispitci

Test QIAscreen HPV PCR Test namijenjen je za upotrebu s uzorcima genomske DNA dobivenima iz cervikalnih ispitaka (brisovi). Validirani mediji za prikupljanje cervikalnih ispitaka (brisoava) su mediji za prikupljanje PreservCyt, CellSolutions®, Pathtest® i Surepath®. Optimalna temperatura pohrane kliničkih uzoraka iznosi 2 – 8 °C nakon dostave u laboratorij. U tim uvjetima pohrane, uzorci u mediju za prikupljanje PreservCyt stabilni su 3 mjeseca dok su u mediju za prikupljanje Surepath stabilni 2 tjedna prije ekstrakcije DNA.

Cervikalni uzorci prikupljeni u mediju PreservCyt mogu biti pohranjeni do 210 dana nakon prikupljanja uzorka na temperaturi 18 – 25 °C, do dvije i pol godine na temperaturi 2 – 8 °C i do 2 godine na temperaturi < 20 °C. Cervikalni uzorci prikupljeni u mediju Surepath mogu biti pohranjeni 10 tjedana nakon prikupljanja uzorka na temperaturi 2 – 30 °C. do dvije i pol godine na 2 – 8 °C i do 210 dana na < 20 °C.

## Vaginalni ispitci koje su pacijentice prikupile same s pomoću četkice

Test QIAscreen HPV PCR Test namijenjen je za upotrebu s uzorcima genomske DNA ekstrahirane iz ispitaka koji su samostalno prikupljeni s pomoću vaginalne četkice ili koji su samostalno prikupljeni postupkom cerviko-vaginalne lavaže. Vaginalni ispitci koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice mogu se uzeti i poslati suhi ili u fiziološkoj otopini (0,9 % w/v NaCl) te se nakon primitka u laboratoriju pohraniti u PreservCyt. Ispitci koje su

pacijentice uzele same postupkom cerviko-vaginalne lavaže uzimaju se i šalju u fiziološkoj otopini (0,9 % w/v NaCl) te se nakon primitka u laboratoriju pohranjuju u PreservCyt. Samostalno prikupljeni uzorci u mediju PreservCyt mogu biti pohranjeni do 210 dana nakon prikupljanja uzorka na temperaturi 18 – 25 °C, do dvije i pol godine na temperaturi 2 – 8 °C i do 2 godine na temperaturi < 20 °C.

## Uzorci genomske DNA

Nakon što se ekstrahira genomska DNA može se pohraniti na temperaturi 2 – 8 °C za kraće čuvanje (≤ 2 dana) ili na temperaturi od -30 do -15 °C za čuvanje do 12 mjeseci.

# Priprema uzorka

## Ekstrakcija DNA

Standardni kompleti za ekstrakciju DNA (npr., kompleti na bazi stupca i magnetskih kuglica, kao što su QIAamp® DSP Virus spin kit, QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit i NucleoMag 96 Tissue kit, (Macherey-Nagel) kompatibilni su s ovim ispitivanjem. Pojediniosti o uporabi kompleta QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi navedene su u nastavku.

## Klinički ispitci u medijima za prikupljanje PreservCyt i PathTezt

Za cervikalne ispitke (brisove) spremljene u medij za prikupljanje PreservCyt ili PathTezt, frakcija DNA koja će se upotrebljavati kao unos u PCR predstavlja 0,125 % od 20 ml uzorka cervikalnog brisa u mediju PreservCyt ili PathTezt. To odgovara 25 µL originalnih uzoraka. Budući da je moguće maksimalno upotrijebiti samo 5 µL ekstrahirane DNA kao unos u PCR, postupci ekstrakcije DNA trebali bi se izvoditi tako da 5 µL ekstrakta DNA odgovara 25 µL cervikalnog ispitka (brisa) kako bi se osiguralo da se ispravna frakcija cervikalnog uzorka upotrebljava u PCR-u. Ekvivalentni medij s formaldehidom (npr. Surepath) ili bez njega (npr. PreservCyt) potrebno je obraditi na sličan način.

**Važno:** Medij PreservCyt može ometati proces ekstrakcije DNA. To se može razriješiti na dva različita načina.

1. Prije nego što započnete ekstrakciju DNA razrijedite alikvot uzorka iz medija PreservCyt jednakim volumenom PBS-a ili pufera za lizu iz kompleta za ekstrakciju DNA i promiješajte. Pobrinite se da ukupni volumen uzorka bude kompatibilan s kompletom za ekstrakciju DNA. Ako ukupni volumen postane prevelik za komplet za ekstrakciju, preporučuje se uporaba 2. metode navedene u nastavku.
2. Centrifugirajte uzorak iz medija PreservCyt ( $\geq 3400 \times g$  10 min) i uklonite supernatant. Talog je potrebno resuspendirati u odgovarajućem volumenu PBS-a ili pufera za lizu koji je kompatibilan s kompletom za ekstrakciju DNA (za komplet QIAamp DSP Virus spin kit



resuspendirajte talog u volumenu od 200 µL i pratite upute proizvođača za ekstrakciju DNA, eluirajte u 100 µL; za komplet Margery Nagel Nucleomag96 tissue kit resuspendirajte talog u 100 µL pufera T1 iz istog kompleta i pratite upute proizvođača, eluirajte u 100 µL).

Ekvivalentne medije potrebno je obraditi na sličan način.

## Pojedinosti o uporabi kompleta QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit

Protokol za QSDSP: 500 µL cervikalnog uzorka u mediju PreservCyt pomiješa se sa 500 µL PBS-a. Započinje se integrirani proces Complex800\_V6\_DSP na instrumentu QIASymphony prema koracima navedenim u „Objedinjenom korisničkom vodiču za QIASymphony® SP/AS – 12.3 Integrirani rad”. DNA se eluira u 60 µL, a 5 µL upotrebljava se za test QIAScreen HPV PCR Test. Ako upotrebljavate samo modul QIASymphony SP, na instrumentu QIASymphony SP izvodi se proces pripreme uzorka u sklopu kojeg se provodi protokol Complex800\_V6\_DSP. Pridržavajte se koraka opisanih u „Uputama za uporabu za QIASymphony DSP Virus/Pathogen Kit (Priručnik) – Opći protokol pročišćavanja”.

Za cervikalne ispitke (brisove) spremljene u medije za prikupljanje SurePath ili CellSolutions, frakcija DNA koja će se upotrebljavati kao unos u PCR predstavlja 0,25 % od 10 mL uzorka cervikalnog brisa u medijima SurePath ili CellSolutions. To odgovara 25 µL originalnih tipova uzoraka. Budući da je moguće maksimalno upotrijebiti samo 5 µL ekstrahirane DNA kao unos u PCR, volumen uzorka i volumen elucije DNA trebaju biti takvi da 5 µL ekstrakta DNA odgovara 25 µL cervikalnog ispitka (brisa) kako bi se osiguralo da se ispravna frakcija cervikalnog uzorka upotrebljava u PCR-u.

**VAŽNO:** kliničke ispitke prikupljene u medijima SurePath i CellSolutions potrebno je prije uporabe prethodno obraditi prema protokolu navedenom ispod kako bi se izbjeglo križno povezivanje uzrokovano formaldehidom.

## Prethodna obrada kliničkih ispitaka prikupljenih u medijima SurePath i CellSolution:

3. Pomiješajte ispitke iz medija SurePath i CellSolution s puferom za lizu (AL) (QIAGEN) omjera 1:1 i temeljito promiješajte.
4. Inkubirajte na temperaturi od 90 °C u trajanju od 20 minuta i zatim ostavite da se ohladi na sobnu temperaturu prije nego što nastavite s ekstrakcijom DNA.

S ekvivalentnim medijima koji sadržavaju formaldehide treba postupati na sličan način.

Za vaginalne ispitke koje su pacijentice same prikupile s pomoću četkice spremljene u otopinu Hologic PreservCyt Solution postupci ekstrakcije DNA trebaju se izvoditi tako da 5 µL ekstrakta DNA koji se upotrebljava kao unos u PCR čini 0,5 % vaginalnog uzorka. Na primjer, samostalno prikupljeni vaginalni uzorak suspendirat će se u 2 mL otopine PreservCyt Solution, što znači da u tom slučaju 5 µL ulazne DNA odgovara 10 µL suspenzije samostalno prikupljenog uzorka.

Za ispitke koji su samostalno prikupljeni postupkom cerviko-vaginalne lavaže, frakcija DNA koja će se upotrebljavati kao unos u PCR čini 0,5 % uzorka samostalno prikupljenog postupkom lavaže. Stoga bi se u slučaju ukupnog volumena lavaže od 3 mL postupci ekstrakcije DNA trebali provoditi tako da 5 µL ulazne DNA odgovara 15 µL originalnog uzorka samostalno prikupljenog postupkom lavaže.

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

## Važne točke prije započinjanja

Uzmite si vremena kako biste se upoznali s radom instrumenta Rotor-Gene Q MDx prije nego što započnete s postupkom. Pogledajte korisnički priručnik za instrument.

Prije provođenja prvog postupka u danu provedite postupak zagrijavanja za sustav Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na temperaturi od 95 °C u trajanju od 10 minuta.

Da bi se proveo test potreban je predložak za softver serije Rotor-Gene Q. Pobrinite se da se upotrebljava predložak QIAscreen RGQ profile v1.0.ret.

Da biste analizirali test za svaki od četiri detekcijska kanala, potreban je predložak za softver serije Rotor-Gene Q. Pobrinite se da se upotrebljava ispravan predložak za svaki kanal, kako je navedeno u nastavku:

- „QIAscreen RGQ Green Channel analysis template.qut” mora se upotrebljavati za analizu signala u kanalu Green (HPV 16).
- „QIAscreen RGQ Orange Channel analysis template.qut” mora se upotrebljavati za analizu signala u kanalu Orange ( $\beta$ -globin).
- „QIAscreen RGQ Yellow Channel analysis template.qut” mora se upotrebljavati za analizu signala u kanalu Yellow (HPV drugo).
- „QIAscreen RGQ Red Channel analysis template.qut” mora se upotrebljavati za analizu signala u kanalu Red (HPV 18).

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

U istom je eksperimentu moguće testirati do 70 uzoraka genomske DNA, uz pozitivnu i negativnu kontrolu. Shema u Tablici 1 primjer je postavljanja bloka za postavljanje ili rotora za eksperiment s testom QIAscreen HPV PCR Test. Brojevi označuju položaje u bloku za postavljanje i konačan položaj na rotoru.

**Tablica 1. Postavljanje ploče i rotora za eksperiment s testom QIAscreen HPV PCR Test na instrumentu Rotor-Gene Q MDx**

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

**Napomena:** sve neupotrijebljene položaje napunite praznim epruvetama.

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

### 1. Postavljanje testa QIAscreen HPV PCR Test.

**Napomena:** da biste rizik od kontaminacije PCR reakcije sveli na najmanju moguću mjeru, strogo se preporučuje upotreba PCR ormarića s mogućnošću UV zračenja.

**Važno:** dispenziranje mješavine QIAscreen Master Mix mora se obavljati u prostoru koji se odvojen od prostora gdje se obavlja ekstrakcija DNA.

1a. Očistite klupu, pipete i nosač za epruvete prije upotrebe s otopinom za degradaciju DNA kako biste spriječili kontaminaciju predloška ili nukleaze.

**Napomena:** mijenjajte vrške između svake epruvete kako biste izbjegli nespecifične kontaminacije predloška ili reakcijske smjese, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

1b. Nježno promiješajte sadržaj epruvete preokrećući je 10 puta, a zatim je kratko centrifugirajte prije upotrebe kako biste prikupili otopinu na dnu epruvete.

1c. Dispenzirajte 15 µL mješavine QIAscreen Master Mix u odgovarajuće epruvete na trakama za epruvete (maksimalno 72 epruvete po postupku instrumenta Rotor-Gene Q MDx). Postavljanje reakcije može se obavljati na sobnoj temperaturi.

1d. Vratite mješavinu QIAscreen Master Mix u zamrzivač kako biste izbjegli degradaciju sastojaka. Prenesite epruvete na odvojeno područje kako biste dispenzirali pozitivnu kontrolu QIAscreen Positive Control i DNA uzorka.

1e. Dodajte 5 µL negativne kontrole u epruvetu na položaju 2, pomiješajte pipetiranjem prema gore i prema dolje ili laganim udaranjem epruvete kažiprstom i zatvorite epruvetu pritiskom čepa s gornje strane.

1f. Dodajte 5 µL pozitivne kontrole QIAscreen Positive Control u epruvetu na položaju 1, pomiješajte pipetiranjem prema gore i prema dolje ili laganim udaranjem epruvete kažiprstom i zatvorite epruvetu.

**Napomena:** mijenjajte vrške između svake epruvete kako biste izbjegli nespecifične kontaminacije predloška ili reakcijske smjese, što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

- 1g. Dodajte 5 µL DNA uzorka u odgovarajuće epruvete koje sadržavaju mješavinu QIAscreen Master Mix, pomiješajte pipetiranjem prema gore i prema dolje ili laganim udaranjem epruvete kažiprstom i zatvorite epruvetu pritiskom čepa s gornje strane.
- 1h. Kad napunite komplet od 4 epruvete, začepite epruvete.  
**Napomena:** PCR epruvete mogu se pohraniti na 30 minuta između pipetiranja uzoraka u PCR epruvete i početka eksperimenta na stroju na temperaturi od 2 – 8 °C u mraku.
2. Pripremite instrument Rotor-Gene Q MDx i započnite s eksperimentom kako slijedi:  
**Važno:** prije provođenja prvog postupka u danu provedite postupak zagrijavanja za sustav Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na temperaturi od 95 °C u trajanju od 10 minuta.
  - 2a. Postavite rotor sa 72 jažice u držač rotora.
  - 2b. Napunite rotor strip epruvetama prema dodijeljenim položajima, počevši s položajem 1, kako je prikazano u Tablici 1, sa začepljenim praznim strip epruvetama postavljenima na sve neupotrijebljene položaje.  
**Napomena:** pobrinite se da je prva epruveta umetnuta u položaj 1 i da su strip epruvete postavljene tako da su ispravno okrenute i da se nalaze na ispravnim položajima kako je prikazano u Tablici 1.
  - 2c. Pričvrstite prsten za zaključavanje.
  - 2d. Postavite rotor i prsten za zaključavanje na instrument Rotor-Gene Q MDx i zatvorite poklopac instrumenta.
  - 2e. Idite na prozor **New Run** (Novi postupak) i kliknite **Open a template in another folder...** (Otvori predložak u drugoj mapi...).
  - 2f. Odaberite QIAscreen run template (Predložak postupka za QIAscreen) pod nazivom **QIAscreen RGQ profile v1.0.ret**.
  - 2g. Odaberite Rotor type: (Vrsta rotora:) **72-well rotor** (Rotor sa 72 jažice) i **Locking ring attached** (Prsten za zaključavanje pričvršćen) i kliknite na **Next** (Sljedeće).
  - 2h. Na stavci koja se odnosi na Operator (Rukovatelj) unesite inicijale i kliknite na **Next** (Sljedeće).
  - 2i. U sljedećem prozoru kliknite na **Next** (Sljedeće).

2j. Kliknite na **Start run** (Pokreni postupak).

Da biste unijeli nazive uzoraka, kliknite na **Edit samples** (Uredi uzorke) (to je također moguće učiniti nakon što postupak završi).

**Tablica 2. Postavke ciljeva i kanala\***

Cilj	Detekcijski kanal
β-globin	Orange
HPV 16	Green
HPV 18	Red
HPV drugo*	Yellow

\* HPV drugo sastoji se od smjese 13 HPV tipova koji nisu HPV 16/18.

3. Analizirajte podatke.

3a. Odaberite epruvete koje će se upotrebljavati za analizu.

3b. Idite na prozor **Analysis tool** (Alat za analizu), odaberite **Cycling A. Green** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezene postavke) (dolje desno unutar prozora) i odaberite datoteku **QIAScreen RGQ Green Channel analysis template.qut**. Odaberite **Cycling A. Green** i kliknite na **Hide** (Sakrij).

3c. Odaberite **Cycling A. Orange** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezene postavke) i odaberite datoteku **QIAScreen RGQ Orange Channel analysis template.qut**. Odaberite **Cycling A. Orange** i kliknite na **Hide** (Sakrij).

3d. Odaberite **Cycling A. Red** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezene postavke) i odaberite datoteku **QIAScreen RGQ Red Channel analysis template.qut**. Odaberite **Cycling A. Red** i kliknite na **Hide** (Sakrij).

3e. Odaberite **Cycling A. Yellow** i kliknite na **Show** (Prikaži). Kliknite **Import** (Uvoz) pod **Imported Settings** (Uvezene postavke) i odaberite datoteku **QIAScreen RGQ Yellow Channel analysis template.qut**.

3f. Kliknite na **Save** (Spremi).

- 3g. **NEOBAVEZNO:** U svrhu tumačenja rezultata podatke je moguće izvesti kao .csv datoteku. Idite na **File > Save as > Excel Analysis Sheet** (Datoteka > Spremi kao > Excel list za analizu) i spremite izvezenu datoteku.
4. Ispraznite instrument Rotor-Gene Q MDx i odložite strip epruvete u otpad u skladu s lokalnim sigurnosnim propisima.



# Tumačenje rezultata

Kriteriji validacije postupka i uzoraka navedeni su redom u nastavku pod točkama A i B. Odgovarajuće mjere navedene su u slučaju da jedan (ili više) kriterija nije zadovoljeno.

## A. Kriteriji validacije kontrola testa QIAscreen HPV PCR Test

Ciljevi bi u pozitivnoj kontroli QIAscreen Positive Control trebali dati vrijednosti  $C_T$  niže od 29 za  $\beta$ -globin, niže od 30 za HPV 16 i HPV 18 i niže od 32 za HPV drugo. Ako to nije slučaj i postavke analize su ispravne, potrebno je ponoviti eksperiment.

Nijedan od ciljeva u negativnoj kontroli QIAscreen Negative Control ne bi trebao dati signal veći od praga do kraja PCR postupka (tj., ciklus 40 ili nije definirano). Ako se signal vidi prije ciklusa 40 i postavke analize su ispravne, potrebno je ponoviti eksperiment.

**Napomena:** Ako kontrole nisu usklađene s utvrđenim ograničenjima i ponavljanje isključuje pogreške u tehnici, provjerite sljedeće stavke:

- rok trajanja na pakiranju reagensa
- temperaturu reagensa
- postavke PCR sustava i softvera
- kontaminaciju.

Ako su kontrole i dalje nevažeće, obratite se službi za korisnike proizvođača ili svom lokalnom distributeru.

## B. Tumačenje rezultata uzoraka

Rezultat za uzorak utvrđuje se kako slijedi (Tablica 3).

Tablica 3. Tumačenje rezultata

	Vrijednost $C_T$ za HPV cilj(eve)	Vrijednost $C_T$ $\beta$ -globin	Tumačenje
1	HPV 16 i/ili HPV 18 < 36 i/ili HPV drugo < 33,5	Svejedno koliko	HPV pozitivan
2	HPV 16 i HPV 18 $\geq$ 36 ili nije definirano, a HPV drugo $\geq$ 33,5 ili nije definirano	$\leq$ 30	HPV negativan
3	HPV 16 i HPV 18 $\geq$ 36 ili nije definirano, a HPV drugo $\geq$ 33,5 ili nije definirano	$>$ 30	Nevažeći

**1. HPV pozitivan.** Kada je/su vrijednost(i)  $C_T$  za HPV 16 i/ili HPV 18 < 36 i/ili za drugi HPV < 33,5 (neovisno o vrijednosti  $C_T$   $\beta$ -globina). Kanal naznačuje prisutni tip/prisutne tipove. **2. HPV negativan.** Kada je vrijednost  $C_T$  za  $\beta$ -globin  $\leq$  30, a vrijednosti  $C_T$  za HPV 16 i HPV 18 su  $\geq$  36 ili ne pokazuju signal, dok HPV drugo iznosi  $\geq$  33,5 ili ne pokazuje signal. **3. Nevažeći.** Kada je vrijednost  $C_T$  za  $\beta$ -globin  $>$  30, vrijednosti  $C_T$  za HPV 16 i HPV 18 su  $\geq$  36 ili ne pokazuju signal, dok HPV drugo iznosi  $\geq$  33,5 ili ne pokazuje signal.

## Ograničenja

- Test bi se za navedenu namjenu trebao izvoditi na ispitcima cervikalnog brisa ili samostalno prikupljenim (cerviko-)vaginalnim ispitcima. Međutim, QIAscreen HPV PCR Test također je ocijenjen za upotrebu s DNA ekstrahiranom iz ispitaka biopsije fiksiranim formalinom i uronjenim u parafin (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).
- Uzimanje, transport i pohrana uzoraka mogu utjecati na broj kopija cilja u ispitku, uzrokujući potencijalan lažno pozitivni ili lažno negativni rezultat.
- Ove se upute odnose samo na instrument Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
- Loše radne značajke prilikom ekstrakcije DNA mogu dovesti do nevažjećih rezultata ispitivanja. Obratite se svom lokalnom distributeru ili korisničkoj službi proizvođača za tehnički savjet o protokolu ekstrakcije DNA ako navedeni problem bude i dalje prisutan.
- Uzorke s dvosmislenim rezultatima zbog malog broja kopija ciljeva moguće je potvrditi ponavljanjem analize.
- Lezije vrata maternice u rijetkim slučajevima mogu biti inducirane prirodnim varijantama HPV-a ili tipovima HPV-a koje ne obuhvaća test QIAscreen HPV PCR Test.
- Reagensi testa QIAscreen HPV PCR Test smiju se upotrebljavati isključivo za in vitro dijagnostiku.
- Upotreba PCR testova zahtijeva dobru laboratorijsku praksu, uključujući održavanje opreme, koja je usmjerena na molekularnu biologiju i usklađena s primjenjivim propisima i važećim normama.
- Reagensi i upute isporučeni za test QIAscreen HPV PCR Test validirani su za optimalan radni učinak.
- Test QIAscreen HPV PCR Test namijenjen je za laboratorijske stručnjake obučene za upotrebu instrumenata Rotor-Gene Q MDx.
- Proizvod je namijenjen da ga upotrebljavaju samo zaposlenici koji su dobili posebne upute i posebno su obučeni za tehnike real-time PCR-a i in vitro dijagnostičke postupke. Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti zajedno s drugim kliničkim ili laboratorijskim nalazima.

- Strogo pridržavanje Uputa za uporabu (priručnika) nužno je za dobivanje optimalnih rezultata testa QIAscreen HPV PCR Test.
- Potrebno je paziti na rokove trajanja ispisane na kutiji i naljepnicama svih komponentata. Nemojte upotrebljavati komponente kojima je istekao rok trajanja.
- Svi reagensi isporučeni uz test QIAscreen HPV PCR Test namijenjeni su za upotrebu isključivo s drugim reagensima isporučenima u istome kompletu. U suprotnom bi mogli utjecati na radni učinak.
- Svaka upotrebna ovog proizvoda koja nije u skladu s njegovom namjenom i/ili modifikacije komponentata poništava odgovornost tvrtke Self-screen B.V.
- Odgovornost je korisnika da validira radni učinak sustava za bilo kakve postupke koji se primjenjuju u njegovu laboratoriju, a koji nisu obuhvaćeni studijama učinka.

# Radne značajke

## Granica detekcije (Limit of Detection, LoD)

Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) utvrđena je s pomoću genskih fragmenata gBlocks (tj. genomskih blokova DNK s dvostrukom zavojnicom) koji sadrže dio gena E7 genotipa HPV-a. Serije 3-strukih serijskih gBlock razrjeđivanja 15 ciljanih tipova HPV-a (tj. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 i 68) pripremljene su na pozadini od 50 ng humane DNA i testirane su 8-struko. LoD je za  $\beta$ -globin ocijenjen na seriji 3-strukog serijskog razrjeđivanja u vodi fragmenata gBlock koja je sadržavala dio gena  $\beta$ -globina testirane 8-struko.

**Tablica 4. Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) ispitivanja QIAscreen HPV PCR Test za 15 tipova HPV-a i  $\beta$ -globinski gen**

Cilj	LoD (kopija po PCR-u)
HPV 16	206
HPV 18	69
HPV 39, 45	617
HPV 31, 33, 35, 51, 56, 59, 66, 67	1852
HPV 52, 58, 68	5556
$\beta$ -globin	617

## Analitička specifičnost\*

Analitička specifičnost utvrđena je u odnosu na DNA plazmida neciljanih HPV genoma (tj. HPV 6, 11, 26, 40, 42, 43, 53, 61 i 70) pri koncentraciji od najmanje 46.000 kopija/test i u odnosu na 3 vaginalna mikroorganizma za koje postoji najveća mogućnost da su patogeni, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Candida albicans*, pri koncentraciji od najmanje 10.000 kopija/test. Test nije pokazao nikakvu križnu reaktivnost s neciljanim tipovima HPV-a 6, 11, 26, 40, 42, 43, 53 i 61 ili mikroorganizmima. Samo je za HPV 70 zapažen pozitivan signal u kanalu „HPV drugo“ (tj. kanalu koji detektira pool od 13 tipova HPV-a koji nisu HPV 16/18), koji je nakon dodatnog razrjeđivanja bilo moguće detektirati pri > 17.000 kopija/test. HPV 70 smatra se vjerojatno kancerogenim na temelju epidemioloških, filogenetskih i funkcionalnih istraživanja (11-13).

## Kliničke radne značajke na cervikalnim ispitcima (brisojima)

Klinička osjetljivost i specifičnost testa za cervikalnu intraepitelnu neoplaziju razreda 2 ili višeg (CIN 2+) u cervikalnim ispitcima (brisojima) pohranjenim u mediju PreservCyt validirane su u dva različita ispitivanja analizom neinferiornosti u odnosu na testove za visokorizični HPV GP5+/6+ PCR(10) ili Hybrid Capture 2 (14) u skladu s međunarodnim smjernicama o zahtjevima testova za HPV u svrhu probira za rak vrata maternice (9). U ispitivanjima je klinička osjetljivost za CIN 2+ iznosila 96,8 % (61/63) i 92,9 % (91/98), dok je klinička specifičnost za CIN 2+ iznosila 95,1 % (783/823) i 94,2 % (933/990). Klinička osjetljivost i specifičnost nisu bile inferiorne u odnosu na one referentnih ispitivanja GP5+/6+ PCR (10) ili Hybrid Capture 2 (14), što upućuje na vrlo dobre kliničke radne značajke. Za žene koje imaju ASC-US ili LSIL vrijednosti kliničke osjetljivosti i specifičnosti za CIN2+ iznosile su 97,4 % (37/38; 95 %-tni CI 83,5 – 99,6) odnosno 59,8 % (52/87; 95 %-tni CI: 49,2 – 69,5).(14)

\* Radne značajke navedene su za verziju testa ABI7500. Analiza ekvivalencije pokazala je sličan radni učinak i validaciju za test QIAscreen HPV PCR Test za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## Obnovljivost\*

Obnovljivost unutar laboratorija i podudaranje testa među laboratorijima validirani su u skladu s međunarodnim smjernicama za zahtjeve testa za HPV u svrhu probira za rak vrata maternice (9). Unutarlaboratorijska obnovljivost na cervikalnim ispitcima (brisovima) tijekom vremena je iznosila 99,5 % (544/547) s kappa vrijednosti od 0,99, dok je međulaboratorijsko podudaranje iznosilo 99,2 % (527/531) s kappa vrijednosti od 0,98, upućujući na vrlo dobro podudaranje (10).

## Radne značajke na samostalno prikupljenim (cerviko-)vaginalnim ispitcima\*

Radne značajke testa na samostalno prikupljenim (cerviko-)vaginalnim ispitcima validirane su za dvije različite metode uzorkovanja: 1) ispitke koji su samostalno prikupljeni postupkom lavaže, i 2) ispitke koji su samostalno prikupljeni s pomoću vaginalne četkice. Za ispitke koji su samostalno prikupljeni postupkom lavaže podudaranje s referentnim ispitivanjem GP5+/6+ PCR iznosilo je 96,7 % (59/61) s osjetljivošću CIN 2+ od 91,4 % (21/23) (10). Za ispitke koji su samostalno prikupljeni s pomoću četkice podudaranje s testom GP5+/6+ PCR iznosilo je 92,9 % (104/112) s osjetljivošću CIN 2+ od 93,9 % (31/34) (10).

## Interferirajuće tvari\*

Tragovi EDTA (0,5 M), HCl (1 N), zrnaca od silika-gela (1  $\mu$ L), krvi (1  $\mu$ L), uree (40 g/100 mL) i pufera za lizu inhibirali su radne značajke testa. Etanol (ETOH) od 96 % (1  $\mu$ L) i dimetil sulfoksid (DMSO) od 4 % (v/v) nisu imali inhibitorski učinak na radne značajke testa. Inhibicija se prati kontrolom uzorka (npr.,  $\beta$ -globinski cilj).

\* Radne značajke navedene su za verziju testa ABI7500. Analiza ekvivalencije pokazala je sličan radni učinak i validaciju za test QIAscreen HPV PCR Test za Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

## Referencije

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



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

# Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i stranicu s najčešćim pitanjima u našem Centru za tehničku podršku: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Znanstvenici u tehničkim službama tvrtke QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja biste mogli imati, a koja se odnose na informacije i/ili postupke u ovom priručniku ili na tehnologije za uzorke i ispitivanja (za informacije za kontakt posjetite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentari i prijedlozi

---

### Uzorak ima nevažeći rezultat: amplifikacija $\beta$ -globina je preniska ili ne postoji

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Pogrešno pipetiranje ili izostavljeni reagensi. Pogledajte „PCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom za 72 epruvete“ na stranici 21 | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovno obradite uzorak. |
| b) | Provjerite eluat DNA   | Ponovite ekstrakciju DNA.  |
- 

### Pozitivna kontrole ima nevažeći rezultat: amplifikacija je preniska ili ne postoji za jedan ili više ciljeva

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Pogrešno pipetiranje ili izostavljeni reagensi. Pogledajte „PCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom za 72 epruvete“ na stranici 21 | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovno obradite uzorak.   |
| b) | Djelomična degradacija   | Sadržaj kompleta čuvajte na temperaturi od $-15$ do $-30$ °C. Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje do maksimalno pet ciklusa.                                       |
| c) | PCR reagensi djelomično degradirani  | Sadržaj kompleta čuvajte na temperaturi od $-15$ do $-30$ °C, a reakcijske smjese čuvajte na mjestu zaštićenom od svjetlosti. Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje. |
| d) | Inverzija strip cijevi   | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije.  |
| e) | Rok trajanja   | Provjerite rok trajanja kompleta koji upotrebljavate.  |
| f) | Kašnjenje između pipetiranja uzoraka i početka postupka  | PCR mješavine mogu se pohraniti na 30 minuta između pipetiranja uzoraka u PCR i početka postupka na stroju na temperaturi od $2 - 8$ °C u mraku.                                 |

## Komentari i prijedlozi

---

### Kontrola bez predloška (no template control, NTC) je nevažea

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Pogrešno pipetiranje ili izostavljeni reagensi. Pogledajte „PCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom za 72 epruvete” na stranici 21 | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovno obradite uzorak. |
|----|--|--|













### Nema signala u uzorku ili je signal jako slab, ali kontrolni postupak je u redu

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Inhibitorski učinci  | Uvijek provjerite da nema ostataka pufera tijekom ekstrakcije DNA.<br>Ponovite ekstrakciju DNA. |
| b) | Pogrešno pipetiranje. Pogledajte „PCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx s rotorom za 72 epruvete” na stranici 21 | Provjerite shemu pipetiranja i postavke reakcije. Ponovite postupak PCR-a.                      |

Ako problem i dalje postoji, obratite se tehničkoj službi tvrtke QIAGEN.

# Simboli

Na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
	Upotrijebiti do
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Simbol s oznakom CE-IVD
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala
	Komponente
	Sadržava
	Broj
Rn	R se odnosi na reviziju Uputa za uporabu (priručnika), a n je broj revizije
	Globalni broj trgovačke jedinice
	Ograničenje temperature
	Proizvođač

## Simbol

## Definicija simbola

---



Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti



Prije upotrebe pročitajte upute



Oprez

## Kontaktни podaci

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku pomoć na [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), nazovite broj 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite stranicu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
QIAscreen HPV PCR Test	Za 72 reakcije, uključuje: glavnu mješavinu, pozitivnu kontrolu, negativnu kontrolu, upute za upotrebu	617005
QIAasymphony SP	Modul QIAasymphony za pripremu uzoraka (neobavezno za ekstrakciju)	9001297
<b>Rotor-Gene Q MDx</b>		
Rotor-Gene Q MDx HRM System	Real-time PCR cikler i analizator za mekšanje visoke razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, dodatni pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo za dijelove i rad, ugradnju i obuku	9002035
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cikler za real-time PCR i analizator za mekšanje visoke razlučivosti (High Resolution Melt, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, dodatni pribor: uključuje 1-godišnje jamstvo za dijelove i rad, ugradnja i obuka nisu uključeni	9002032
<b>Pribor za Rotor-Gene Q MDx</b>		
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	Aluminijski blok za ručno postavljanje reakcije s jednokanalnom pipetom sa 72 epruvete od 0,1 mL	9018901

Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	250 traka od 4 epruvete i čepa za 1000 reakcija	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10 x 250 stripova od 4 epruvete i čepa za 10.000 reakcija	981106

Ažurirane informacije o licenciranju i izjave specifične za određeni proizvod pogledajte u odgovarajućem priručniku ili uputama za upotrebu za QIAGEN komplet. Priručnici i upute za upotrebu za kompletne tvrtke QIAGEN dostupni su na adresi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ili ih možete zatražiti od tehničke službe tvrtke QIAGEN ili svojeg lokalnog distributera.



# Povijest revizija dokumenta

Datum	Izmjene
R2, kolovoz 2018. godine	Ažuriran je odjeljak Upozorenja i mjere opreza; dodan je CellSolutions® u odjeljak Pohrana i rukovanje ispitcima i u Zaštitni znakovi; revidiran je odjeljak Priprema uzorka kako bi se razlomci zamijenili postocima; ažuriran je protokol: test QIAScreen HPV PCR Test za instrument RGQ MDx; revidiran je protokol u stupcu 3 u Tablici 1: QIAScreen HPV PCR Test za instrument RGQ MDx; ažuriran je odjeljak PCR na instrumentu RGQ MDx s rotorom za 72 epruvete radi dodavanja važne napomene i mijenjanja prozora New experiment (Novi eksperiment) u New Run (Novi postupak); ažuriran je odjeljak Radne značajke; ispravljen je kataloški broj za test QIAScreen HPV PCR Test; ažuriran je raspored
R3, lipanj 2023.	Ažuriran je odjeljak o pohrani i rukovanju ispitcima; Odjeljku o pripremi uzoraka dodan je predtretman uzoraka pohranjenih u mediju SurePath te upute za ekstrakciju DNA pomoću kompleta QIAamp DSP Virus Spin kit i ekstrakciju DNA uz QIASymphony i komplet QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi kit; Ažurirane su kliničke radne značajke za uzorke pohranjene u mediju SurePath i dodane su reference za validaciju uzoraka pohranjenih u mediju SurePath.

## Ugovor o ograničenom licenciranju za test QIAScreen HPV PCR Test

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

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom kompletu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ovaj panel i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj panel i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, preradivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog panela potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s panelom i/ili njegovim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); PreservCy® (Hologic, Inc.); CellSolutions®; Pathtezt® (Pathtezt); SurePath® (Becton Dickinson and Company). Registrirani nazivi, zaštitni znakovi itd. upotrijebljeni u ovom dokumentu, čak i ako nisu posebno označeni kao takvi, ne smiju se smatrati zakonski nezaštićenima.

**Tvrtka Self-screen B.V. Zakonski je proizvođač testa QIAScreen HPV PCR Test.**

**Test QIAScreen HPV PCR Test u ime tvrtke QIAGEN proizvodi tvrtka Self-screen B.V.**

1132289HR 06/2023 HB-2579-004 © 2023 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tehnička podrška [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Web-mjesto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)