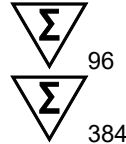


декември 2018 г.

Инструкции за употреба на *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA Test



IVD

Инвитро анализ за хибридизация на нуклеинови киселини с амплификация на сигнала с хемилуминесценция в микроплаки за качествено откриване на ДНК на 13 високорискови типа човешки папиломен вирус (HPV) в цервикални и вагинални проби

За употреба с:

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



REF

5197-1330 (Набор с 1 плака)
618111 (Набор с 4 плаки)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
САЩ

EC REP

QIAGEN GmbH QIAGEN
Strasse 1 40724 Hilden
ГЕРМАНИЯ

1058538BG редакция 13

Съдържание

Предназначение	8
Кратко изложение и обяснение	9
Информация за патогените	10
Принцип на процедурата	10
Подготовка на аликвотните части с QIASymphony SP	12
Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit	12
Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	13
Тестване с Rapid Capture System.....	13
Предоставени материали	15
Набор с 1 плака	15
Набор с 4 плаки	15
Съдържание на набора	16
Необходими, но непредоставени материали	17
Оборудване и материали за инвитро диагностика	17
Лабораторно оборудване и материали с общо предназначение	18
Допълнително оборудване и материали за подготовка на аликвотни части в PreservCyt	19
Допълнително оборудване и материали за подготовка на аликвотни части в SurePath	19
Предупреждения и предпазни мерки	20
Предупреждения	20
Проби.....	20
Натриев азид	21
Buffer N2	21
Автоматизирано тестване с RCS	22
Предупреждения за безопасността и рисковете при компонентите.....	22
Предпазни мерки.....	23

Съхранение и работа с реактиви	24
Компоненти на набора	24
Приготвени реактиви	24
Взимане и подготовка на проби	25
Цервикални и вагинални проби в STM	25
Проби от цервикална биопсия	26
Цервикални проби в PreservCyt Solution	26
Цервикални проби в SurePath Preservative Fluid	27
Автоматизирана подготовка на алиquotните части от проби в SurePath	28
Автоматизирана подготовка на алиquotните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath.....	29
Ръчна подготовка на алиquotните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath.....	29
Процедура.....	30
Подготовка на реактивите	30
Реактив за денатуриране.....	32
Реактив за денатуриране 2.....	33
Смес за сондата	34
Буфер за промиване	35
Конфигуриране на плаката.....	36
Подготовка на алиquotните части.....	38
Подготовка на алиquotните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	38
Подготовка на алиquotните части от проби в SurePath и клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	39
Подготовка на алиquotните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	39
Ръчна подготовка на алиquotните части от проби в PreservCyt	40
Ръчна подготовка на алиquotните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath.....	40
Денатуриране и хибридизация на алиquotни части, подготвени с QIASymphony SP.....	42

Денатуриране на калибратори, контроли и елуати от ДНК за ръчно тестване ..	43
Избирателен престой на елуати от ДНК.....	44
Хибридизация на елуати от ДНК.....	44
Денатуриране и хибридизация на проби в STM и ръчно приготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath.....	45
Денатуриране на калибратори, контроли и проби в STM.....	45
Избирателен престой на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath	47
Хибридизация на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath.....	48
Хибридизация с микроплака и Microplate Heater I.....	48
Хибридизация с микроепруветки и водна баня.....	50
Улавяне на хибриди.....	51
Откриване на хибриди	53
Промиване	54
Метод с Automated Plate Washer	54
Метод за ръчно промиване.....	55
Амплификация на сигнала	57
Измерване на микроплаката за улавяне и генериране на резултати	58
Интерпретиране на резултатите	59
Резултати от тестване на проби в STM.....	59
Резултати от тестване на проби в SurePath	59
Резултати от тестване на проби в PreservCyt.....	59
Стойност RLU/CO близна до 1,0	60
Други типове HPV.....	60
Проверка на калибрирането на анализа	60
Отрицателен калибратор	60
Положителен калибратор.....	61
Средната стойност на положителния калибратор/средната стойност на отрицателния калибратор	61

Изчисляване на стойността cut-off.....	61
Контроли	62
Ограничения	63
Работни характеристики	65
Клинични работни характеристики при скрининг на пациенти с нормални резултати от цитонамазка, когато тестът се използва като помощно средство за оценка на риска при определянето на лечение	65
Клинични работни характеристики при скрининг на пациенти с резултати с ASC-US от цитонамазка за определяне на необходимостта от направление за колпоскопия	71
Клинична чувствителност и специфичност за определянето на риска от високостепенно заболяване при жени с цитонамазки с LSIL или HSIL	74
Работни характеристики при самостоятелно взети и взети от лекар вагинални проби	77
Аналитична чувствителност	78
Еквивалентност между видовете проби	79
Еквивалентност между пробите в STM и PreservCyt	79
Еквивалентност между ръчната подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt и подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit	79
Еквивалентност между ръчната подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt и подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	80
Еквивалентност между STM и ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath	80
Еквивалентност между ръчната подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath и подготовката на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	81
Еквивалентност между ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath и подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit	82
Съвпадение на резултатите от различни методи на тестване.....	83
Възпроизводимост	87

Обща възпроизводимост на ръчното тестване.....	87
Възпроизводимост с клинични проби в STM.....	87
Възпроизводимост на клинични проби в PreservCyt.....	90
Възпроизводимост на клинични проби в SurePath	101
Кръстосана реактивност.....	107
Кръстосана хибридизация.....	109
Отражение на кръв и други вещества върху пробите в STM.....	109
Отражение на кръв и други вещества върху пробите в PreservCyt	110
Ръчна подготовка на алиquotни части	110
Подготовка на алиquotните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit	110
Подготовка на алиquotните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	111
Отражение на кръв и други вещества върху пробите в SurePath	112
Подготовка на алиquotните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	112
Подготовка на алиquotни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	113
Пренасяне.....	113
Стабилност на реактивите след зареждане в апарата	115
Цитирани източници.....	117
Символи	122
Ръководство за отстраняване на проблеми.....	123
Проверка за замърсяване на DR2	134
Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода.....	134
Проверка за замърсяване на Automated Plate Washer.....	135
Информация за контакт	136
Значими промени	137

Предназначение

За инвитро диагностика (In Vitro Diagnostic, IVD).

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test с технология Hybrid Capture® 2 (HC2) представлява анализ за хибридизация на нуклеинови киселини с амплификация на сигнала с хемилуминесценция в микроплаки за качествено откриване на ДНК на 13 високорискови типа HPV в цервикални и вагинални проби.

Цервикалните и вагиналните проби, които могат да се тестват с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, включват:

- Цервикални проби, взети от лекар с *digene* HC2 DNA Collection Device
- Вагинални проби, взети самостоятелно с *digene* HC2 DNA Collection Device
- Тъкани от биопсия, взети в *digene* Specimen Transport Medium (STM)
- Проби, взети с изделие за взимане на проба с метличка или комбинирано изделие за взимане на проба с четчица/шпатула и поставени след това в PreservCyt Solution или SurePath Preservative Fluid

Употребата на този тест е показана:

- За откриването на високорискови типове HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68, за които е известно, че са основен фактор при развитието на цервикален карцином.
- Като начален тест за скрининг на общото население – за употреба с или без цитонамазка – за идентифициране на жени с повишен риск от развитие на цервикален карцином или наличие на високостепенно заболяване на маточната шийка. С напредването на възрастта положителната диагноза на HPV става все по-чест признак на заболяване на маточната шийка.
- Като контролен тест за пациенти след абнормни резултати от цитонамазка или заболяване на маточната шийка, за да се определи необходимостта от направление за колпоскопия или други контролни процедури.
- Като контролен тест за пациенти с положителни резултати за нискостепенна сквамозна интраепителна лезия (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) или високостепенна сквамозна интраепителна лезия (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) от цитонамазка преди колпоскопия. При такива пациенти резултатът от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ще улесни лекаря при провеждането на лечението с оценка на риска за жените за определяне на отсъствие на високостепенно заболяване.

Кратко изложение и обяснение

Наличието на определени типове HPV в женския генитален тракт се свързва с редица заболявания – например кондилом, боуеноидна папулоза, цервикална, вагинална и вулварна интраепителна неоплазия и карцином (1–3). Общоприет факт е, че тези вируси се предават предимно по полов път и че високорисковите типове HPV са основният общопризнат рисков фактор за развитие на цервикален карцином (4–8).

Засега посежки на HPV инвитро не са възможни и имунологичните тестове не са подходящи за определяне на наличие на HPV цервикална инфекция. Индиректни свидетелства за аногенитална HPV инфекция могат да се получат с медицински преглед и по наличието на характерни клетъчни изменения, свързани с вирусна репликация в цитонамазка или проби от биопсия. Друг вариант е тъканите от биопсия да се анализират с хибридизация на нуклеинови киселини, за да се открие директно наличието на ДНК на HPV.

Понастоящем типове HPV 16 и 18 се считат за високорискови, свързани с карцином типове (8-10). За типове HPV 31, 33 и 35 е демонстрирано, че са по-слабо свързани с карцином (2, 11–14). Тази по-слаба връзка се дължи на факта, че тези типове се откриват по-често при високостепенни сквамозни интраепителни лезии, отколкото при карциноми. Затова образуването на карциноми поради наличието на тези типове е по-малко вероятно, отколкото при наличието на ДНК на високорискови типове HPV (15). На тези 5 типа HPV, взети заедно, се дължат около 73% от всички HPV инфекции (16, 17). Допълнителни типове HPV – 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68 – са идентифицирани като основните типове HPV, които могат да се открият в останалите лезии (17–27). Тези типове HPV могат да се категоризират също така в средно- и високорискови групи според своето относително разпространение в различните категории хистопатологични диагнози (16, 17, 24–28).

Известно е, че ДНК на HPV се среща при около 10% от жените с нормален цервикален епител, но действителният преваленс в конкретни групи жени зависи силно от възрастта и други демографски променливи (2, 10, 16, 29). Резултатите от прогностични проучвания показват, че при 15%–28% от жените с положителен тест за ДНК на HPV се развиват сквамозни интраепителни лезии (Squamous Intraepithelial Lesions, SIL) в рамките на 2 години в сравнение с едва 1%–3% от жените с отрицателен тест за ДНК на HPV (30, 31). По-конкретно рискът от прогресиране при типове HPV 16 и 18 е по-висок (около 40%), отколкото при другите типове HPV (30).

Информация за патогените

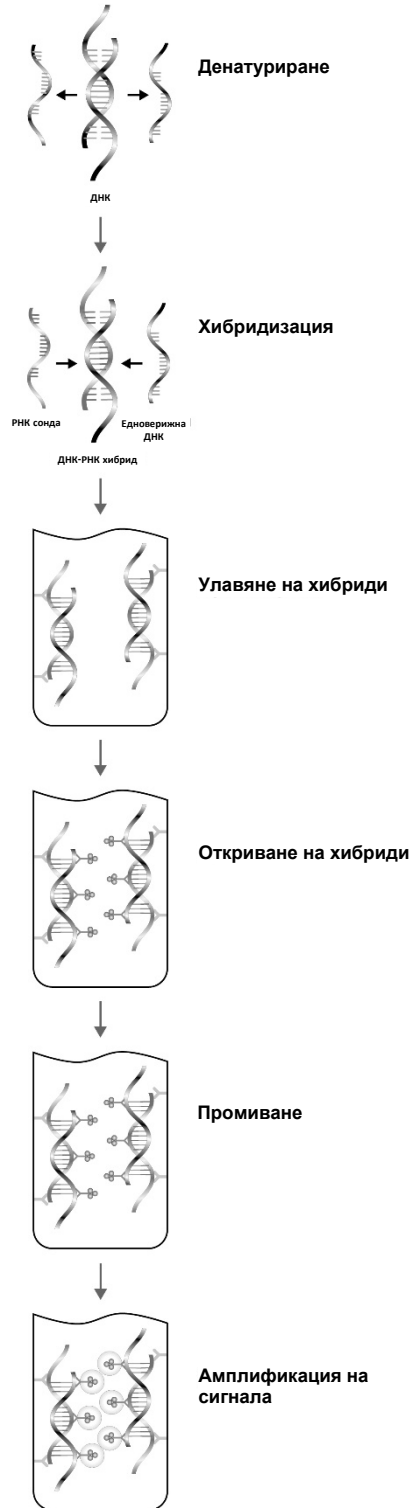
Човешките папиломни вируси се състоят от двадесетостенна вирусна частица (вирион), съдържаща двуверижна кръгова ДНК молекула от 8000 базови двойки, обвита с протеинов капсид. След инфекция на епителни клетки вирусната ДНК се установява в цялата дълбочина на епитела, но интактни вириони се срещат само в горните слоеве на тъканта. Затова вирусна ДНК може да се открие както във вирионите, така и под формата на епизомни или интегрирани HPV секвенции в зависимост от типа и степента на лезията.

Принцип на процедурата

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test с технология HC2 представлява анализ за хибридизация на нуклеинови киселини с амплификация на сигнала, използващ откриване с хемилуминесценция в микроплаки. Пробите, съдържащи прицелната ДНК, хибридизират със специфична HPV РНК сонда. Така получените РНК–ДНК хибриди се улавят на повърхността на ямка на микроплака, покрита с антитела, специфични за тези РНК–ДНК хибриди. Обездвижените хибриди след това реагират с конюгирани с алкална фосфатаза антитела, специфични за тези РНК–ДНК хибриди, и се откриват с хемилуминесцентен субстрат. Няколко молекули алкална фосфатаза се конюгират с всяко антитяло. С всеки уловен хибрид се свързват множество конюгирани антитела, което води до значителна амплификация на сигнала. При разрязването на субстрата със свързаната алкална фосфатаза се излъчва светлина, която се измерва в относителни светлинни единици (Relative Light Units, RLU) от апарат *digene* Microplate Luminometer (DML). Интензитетът на излъчената светлина показва наличието или отсъствието на прицелната ДНК в пробата.

Ако показанието в RLU е по-голямо или равно на стойността cut-off (CO) на анализа, това означава, че в пробата има секвенции от ДНК на високорискови HPV. Ако показанието в RLU е по-малко от CO на анализа, това означава, че няма специфични секвенции от ДНК на тестваните високорискови HPV или че нивата на ДНК на HPV са под границата на откриване на теста.

**Технология с Hybrid Capture
(улавяне на хибриди)**



Подготовка на аликвотните части с QIASymphony SP

Автоматизирана подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt може да се извърши с QIASymphony SP с QIASymphony DSP HPV Media Kit или QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit

QIASymphony DSP HPV Media Kit осигурява екстракти от аликвотните части на микроплаката за хибридизация, които са готови за автоматизирано тестване с Rapid Capture® System (RCS) с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIASymphony SP изпълнява наведнъж всички стъпки от процедурата за подготовка на максимум 88 аликвотни части, на партиди по максимум 24.

QIASymphony SP обработва 88 аликвотни части в PreservCyt за 2 часа и 15 минути без намеса на потребителя, след като аликвотните части бъдат заредени в апарата.

QIASymphony SP обработва 88 аликвотни части в SurePath за 1 час и 45 минути без намеса на потребителя, след като аликвотните части бъдат заредени в апарата. Непосредствено след подготовката на аликвотните части с QIASymphony SP се извършва 90-минутна инкубация с нагревател на екстрактите от аликвотните части в микроплаката за хибридизация. По време на инкубацията на екстрактите от аликвотните части калибраторите и контролите се денатурират поотделно във водна баня и след като инкубацията приключи, се пипетират ръчно в първата колона на микроплаката за хибридизация. Подготовката на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony SP и QIASymphony DSP HPV Media Kit може да се извърши преди началото или след края на цитологичната обработка.

Важно: Екстрактите, получени след подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt и SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit, може да се тестват само с RCS. Ръчно извършване на теста с екстракти от аликвотните части не е валидирано.

Освен в тези инструкции за употреба, ще намерите необходимите описания и информация за процедурите за автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony в съответните ръководства за потребителя на QIASymphony и инструкциите за употреба (наръчника) на *QIASymphony DSP HPV Media Kit*.

Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

QIASymphony DSP AXpH DNA Kit осигурява елуати от ДНК на микроплаката за хибридизация, готови за ръчно или автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIASymphony SP изпълнява наведнъж всички стъпки от процедурата за подготовка на максимум 88 аликвотни части, на партиди по максимум 24. QIASymphony SP обработва 88 аликвотни части за 4 часа и 30 минути без намеса на потребителя, след като аликвотните части бъдат заредени в апарата.

Освен в тези инструкции за употреба, ще намерите необходимите описания и информация за процедурите за автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony в съответните ръководства за потребителя на QIASymphony и инструкциите за употреба (наръчника) на *QIASymphony DSP AXpH DNA Kit*.

Тестване с Rapid Capture System

Високопроизводително тестване на големи обеми от аликвотни части с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test може да се извърши с RCS. Наборът с 4 плаки (каталожен № 618111) може да се използва само с RCS и не може да се използва за ръчно тестване.

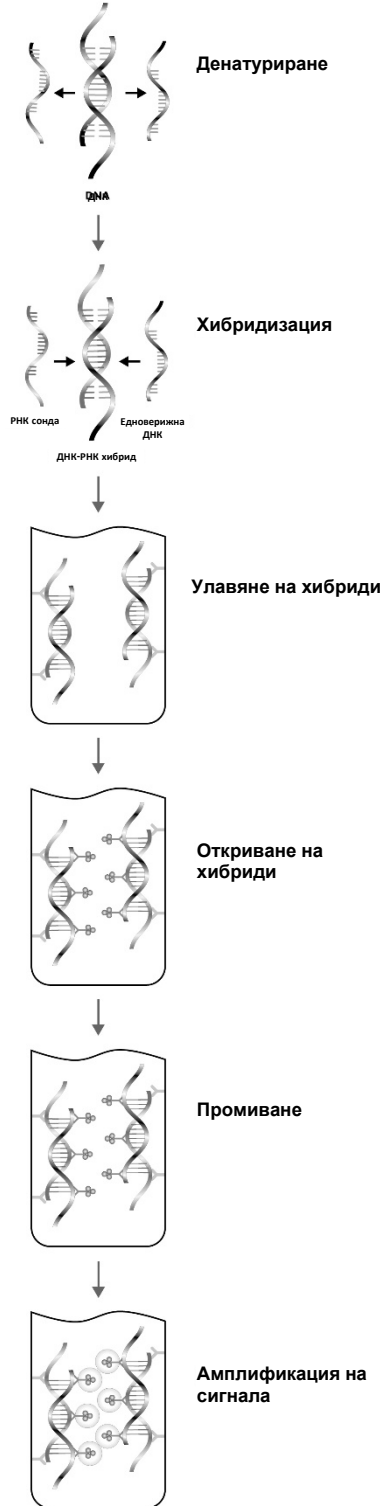
RCS е система с общо предназначение за автоматизирано пипетиране и разреждане, която може да се използва с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за високопроизводително тестване на големи обеми от аликвотни части. Тази система обработва до 352 проби за 8 часа, включително 3,5-часов период без намеса на потребителя; до 704 резултата за проби могат да се генерират за 13 часа.

Подготовката на аликвотните части се извършва предварително извън RCS, преди да бъдат поставени на плота на RCS. Освен това откриването на хемилуминесцентните сигнали и съобщаването на резултатите се извършват на отделен апарат DML, използван както за ръчно, така и за автоматизирано тестване с RCS.

Всяка стъпка от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test се извършва в абсолютно същата последователност като при ръчно тестване. RCS позволява шахматна обработка на до 4 микроплаки, всяка от които съдържа аликвотни части и необходимите за теста калибратори и контроли.

Освен в тези инструкции за употреба, ще намерите необходимите описания и информация за процедурите за автоматизирано тестване с RCS в ръководството за потребителя на *Rapid Capture System* и ръководството за потребителя на *Rapid Capture System – извършване на тестове digene HC2 DNA Test с аликвотни части, обработени с QIASymphony SP*.

Технология с Hybrid Capture
(улавяне на хибриди)



Ръчна подготовка на
аликвотни части

Автоматизирана на Rapid Capture System

Предоставени материали

Набор с 1 плака

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test с 1 плака (каталожен № 5197-1330) съдържа 96 теста.

При ръчно тестване с набора с 1 плака препоръчителният минимален брой тестове за всяко използване е 24. Ако се налага да се правят по-малко от 24 теста на едно използване, общият брой тестове от един набор може да бъде намален поради ограничените обеми на реактивите. Броят на пациентските резултати зависи от това колко пъти се използва един набор, както следва:

Колко пъти се използва	Брой пациентски резултати
1	88
2	80
3	72
4	64

При автоматизирано тестване с RCS с набора с 1 плака използването на пълния набор изисква тестване на пълна микроплака (88 аликвотни части) на една серия с RCS. Тестването може да се извърши и с непълна микроплака, но тогава пак ще се използва целият набор, тъй като неизползваемият обем е необходим за работата на апарата.

Набор с 4 плаки

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test с 4 плаки (каталожен № 618111) съдържа 384 теста.

Наборът с 4 плаки може да се използва само за автоматизирано тестване с RCS. За да се извършат 384 теста, наборът с 4 плаки трябва да се използва на 1 или 2 серии с RCS. Ако се налага да се обработват повече от 2 серии, общият брой тестове от един набор може да бъде намален поради ограничените обеми на реактивите.

Съдържание на набора

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Каталожен номер	5197–1330	618111
Брой тестове	96	384
Indicator Dye Contains 0.05% (w/v) sodium azide (Индикаторният оцветител съдържа 0,05% (тегло/обем) натриев азид)	0,35 ml	2,0 ml
Denaturation Reagent (Реактив за денатуриране)* Разреден разтвор на натриева основа (NaOH)	50 ml	2 × 100 ml
Probe Diluent (Дилуент за сонда)* Буфериран разтвор с 0,05% (тегло/обем) натриев азид	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (Сонда за високорискови HPV) PHK сонда за HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68 в буфериран разтвор (червена капачка)	200 µl	3 × 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Контрола с нискорискови HPV) 5 pg/ml (500 000 копия/ml) ДНК от клониран HPV 6 и Carrier DNA в STM с 0,05% (тегло/обем) натриев азид.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Контрола с високорискови HPV) 5 pg/ml (500 000 копия/ml) ДНК от клониран HPV 16 и Carrier DNA в STM с 0,05% (тегло/обем) натриев азид	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Отрицателен калибратор) Carrier DNA в STM с 0,05% (тегло/обем) натриев азид	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (Калибратор с високорискови HPV) 1 pg/ml ДНК от клониран HPV 16 и Carrier DNA в STM с 0,05% (тегло/обем) натриев азид	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Микроплака за улавяне) Покрита с кози поликлонални антитела срещу РНК–ДНК хибриди	1	4
Detection Reagent 1 (Реактив за откриване 1) Конюгирани с алкална фосфатаза антитела срещу РНК–ДНК хибриди в буфериран разтвор с 0,05% (тегло/обем) натриев азид	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Реактив за откриване 2) CDP-Star® с Emerald II (хемилуминесцентен субстрат)	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate (Концентриран буфер за промиване)* Съдържа 1,5% (тегло/обем) натриев азид	100 ml	2 × 100 ml

* Информация за здравето и безопасността ще намерите в „Предупреждения и предпазни мерки“ на страница 20.

Необходими, но непредоставени материали

Важно: Използваните в тази процедура апарати трябва да бъдат проверени и калибрирани по инструкциите на производителя.

Оборудване и материали за инвитро диагностика

Само оборудване и материали, валидирани с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, се предлагат от QIAGEN.

- *digene* Hybrid Capture 2 System (по-нататък наричана накратко „*digene* HC2 System“), която включва одобрен от QIAGEN луминометър (по-нататък наричан накратко „апарат DML“), одобрен от QIAGEN персонален компютър и периферни устройства (монитор, клавиатура, мишка, принтер и кабел за принтер), софтуер за *digene* HC2 System (по-нататък наричан накратко „аналитичен софтуер за анализи *digene*“), протоколи за анализи за HPV с *digene* HC2 System, софтуер LumiCheck Plate и ръководство за потребителя на *digene* HC2 System
- 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 (допълнително)*
- Conversion Rack and Lid (допълнително)*
- *digene* Specimen Rack and Lid (допълнително)*
- Пипета и стойка EXPAND-4 (допълнително)†
- Апарат за подаване и режещо устройство за фолио за запечатване на епруветки (допълнително, използват се с MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (задължително при използване на набора с 4 плаки; незадължително за набора с 1 плака)
- Апаратура за промиване
- Микроплаки за хибридизация
- Капацы за микроплаки
- Ленти за ямки на микроплаки за RCS*
- Улеи за реактиви за RCS*
- Капацы за улеи за реактиви за RCS*
- Връхчета за еднократна употреба за RCS*
- Капачки за RCS*

* Задължително за автоматизирано тестване с RCS.

† Нестандартен артикул, който се използва за прехвърляне на аликовтни части в STM в микроплаката за хибридизация. Могат да се използват и други нестандартни изтеглящи се многоканални пипети, стига да може да се постигне 3,2 cm разстояние между връхчетата в изтеглено състояние.

- Buffer N2*
- Buffer D2*
- Синя RCS Washer Boat†
- Удължени връхчета за пипети
- Епруветки за взимане на проби
- Статив за епруветки за взимане на проби
- Завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби
- Съдове за еднократна употреба за реактиви
- Фолио DuraSeal™ за запечатване на епруветки
- Микроепруветки за хибридизация‡
- Статив за микроепруветки‡
- Фолио за запечатване на плаки‡

Лабораторно оборудване и материали с общо предназначение


- Водна баня за 65 ± 2 °C с достатъчни размери, за да може да побере статив за проби [21 cm ширина × 32 cm дълбочина × 18 cm височина (8,25 × 12,25 × 4,9 in.)]
- Микроцентрифуга
- Вортекс с приставка за чаша
- Едноканална пипета с променливи настройки за обеми 20–200 µl и 200–1000 µl
- Пипета „резила“ с многократно действие – например пипета Eppendorf® Repeater®
- 8-канална пипета с променливи настройки за обеми 25–200 µl
- Таймер
- Разтвор на натриев хипохлорит, 0,5% по обем
- Parafilm® или еквивалент
- Връхчета с аерозолна бариера за еднократна употреба за едноканална пипета (20–200 µl и 200–1000 µl)
- Връхчета за еднократна употреба за пипета „резила“ с многократно действие (12,5, 5, 2,5 и 1,25 ml)
- Връхчета за еднократна употреба за 8-канална пипета (25–200 µl)
- Кърпички Kimtowels® или еквивалентни немъхести хартиени кърпички
- Покривка за еднократна употреба
- Ръкавици за еднократна употреба без талк
- Епруветки от полипропилен 5 ml и/или 15 ml с фиксираща се капачка и обло дъно
- Статив за епруветки 10 ml или 15 ml
- Епруветки от полипропилен 50 ml с конично дъно


* Задължително за тестване с аликвотни части, подготвени с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.


† Задължително за автоматизирано тестване с RCS на аликвотни части, обработени с QIASymphony DSP HPV Media Kit.

‡ Задължително за хибридизация с микроепруветки и водна баня.


Допълнително оборудване и материали за подготовка на аликвотни части в PreservCyt

 В инструкциите за употреба (наръчник) на QIAasymphony DSP HPV Media Kit ще намерите информация за автоматизираната подготовка на аликвотните части с QIAasymphony DSP HPV Media Kit.

 В наръчника за QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit ще намерите информация за автоматизираната подготовка на аликвотните части с QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit.

 В инструкциите за употреба на digene HC2 Sample Conversion Kit ще намерите информация за ръчната подготовка на аликвотните части.

Допълнително оборудване и материали за подготовка на аликвотни части в SurePath

 В инструкциите за употреба (наръчник) на QIAasymphony DSP HPV Media Kit ще намерите информация за автоматизираната подготовка на аликвотните части с QIAasymphony DSP HPV Media Kit.

За ръчната подготовка на аликвотните части в SurePath са необходими следните допълнително оборудване и материали:

- Центрофуга с променлив ъгъл, която може да достига $800 \pm 15g$ и да побира 15-ml полипропиленови епруветки с конично дъно за центрофуга
- digene HC2 Sample Conversion Tubes или 15-ml полипропиленови епруветки VWR® или Corning®

Важно: Предлаганите от QIAGEN digene HC2 Sample Conversion Tubes трябва да се използват с MST Vortexer 2 или RCS.

- 7-ml стандартни пипети за прехвърляне или еквиваленти
- digene Specimen Transport Medium

Предупреждения и предпазни мерки

За инвитро диагностика.

Прочетете внимателно всички инструкции, преди да използвате теста.

Предупреждения

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. Повече информация ще намерите в съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Те са достъпни онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате ИЛБ за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

Проби

ВНИМАНИЕ Риск от инфекциозни агенти



Пробите може да съдържат инфекциозни агенти и с тях трябва да се борави по съответния начин. Всички проби следва да се считат за потенциално инфекциозни.

Няма известен тестов метод, който дава пълна гаранция, че пробите няма да предадат инфекция. Препоръчва се с човешки проби да се борави в съответствие с действащите национални и местни практики за биологична защита. Спазвайте тези практики за биологична защита с материали, които съдържат или биха могли да съдържат инфекциозни агенти.

Тези предпазни мерки може да бъдат например:

- Не пипетирайте с уста.
- Не пушете, не пийте и не се хранете на места, на които се борави с проби или реактиви.
- Носете ръкавици за еднократна употреба без талк, когато боравите с реактиви или проби. Измивайте добре ръцете след извършването на теста.

- Почистете и дезинфекцирайте всички разливи на проби с туберкулоциден – например натриев хипохлорит 0,5% по обем – или друг подходящ дезинфектант (32, 33).
- Обеззаразявайте и изхвърляйте всички проби, реактиви и други потенциално заразени материали в съответствие с националните и местните разпоредби.

След денатурирането и инкубацията пробите вече не се считат за инфекциозни (34), но лабораторният персонал въпреки това трябва да спазва националните и местните разпоредби.

Натриев азид

Някои реактиви съдържат натриев азид. Известни са случаи, в които натриевият азид образува оловен или меден азид в лабораторната канализация. Тези азиди могат да експлодират при удар – например с чук. За да предотвратите образуване на оловен или меден азид, промивайте щателно канализацията с вода след изхвърляне на разтвори, съдържащи натриев азид. За да отстраните замърсявания от стари канализационни тръби с предполагаеми наслоения от азиди, Администрацията по безопасни и здравословни условия на труд в САЩ препоръчва:

1. Източете течността от канала с гумен или пластмасов маркуч.
2. Напълнете с разтвор на натриева основа 10% по обем.
3. Оставете да действа 16 часа.
4. Промийте добре с вода.

Buffer N2

ВНИМАНИЕ Опасност от силно реактивни съединения



Не добавяйте белина или киселинни разтвори директно към разтвори или отпадъци, съдържащи Buffer N2.

Buffer N2 съдържа гуанидин хидрохлорид, който може да образува силно реактивни съединения с белината.

Ако се разлее течност, съдържаща такива буфери, я почистете с подходящ лабораторен почистващ препарат и вода. Ако разлятата течност съдържа потенциално инфекциозни агенти, първо почистете замърсената област с лабораторен почистващ препарат и вода, а след това с 1% (по обем) натриев хипохлорит.

Автоматизирано тестване с RCS

В ръководството за потребителя на *Rapid Capture System* ще намерите допълнителни предупреждения и предпазни мерки конкретно за употребата на тази система за високопроизводително тестване на големи обеми от аликвотни части.

Предупреждения за безопасността и рисковете при компонентите

Следните предупреждения за рисковете и безопасността се отнасят за компонентите на набора *digene HC2 High-Risk HPV DNA Test*:

Реактив за денатуриране



Съдържа: натриева основа. Опасно! Може да бъде корозивно за металите. Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ/на лекар.

Калибратор с високорискови HPV

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Контрола с високорискови HPV

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Контрола с нискорискови HPV

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Отрицателен калибратор

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Дилуент за сонда



Съдържа: оцетна киселина; полиакрилна киселина. Опасно! Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ/на лекар.


Концентриран буфер за промиване



Съдържа: натриев азид. Предупреждение! Вреден при поглъщане. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Предпазни мерки

Потребителят задължително трябва да взема следните предпазни мерки, когато извършва *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Не използвайте реактивите след датата на изтичане на срока на годност, посочена до символа  на етикета на външната опаковка, или датата на изтичане на срока на годност на приготвените реактиви.
- Нарушаване на посочените срокове и температурни диапазони при извършването на теста може да доведе до невалидни резултати. Тестове, за които посочените срокове и температурни диапазони не са спазени, са невалидни и трябва да бъдат повторени.
- Процедурата, калибрирането на анализа, качественият контрол и интерпретирането на резултатите за пробите от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test трябва да се спазват точно, за да се получат надеждни резултати от теста.
- Важно е да се пипетира точният посочен обем от реактива и да се разбърква добре след всяко добавяне на реактив. В противен случай тестът може да даде грешни резултати. Посочените промени в цвета трябва да бъдат налице – така се потвърждава, че тези условия са изпълнени.
- Компонентите на набора са тествани в комплект с изключение на концентрирания буфер за промиване. Не заменяйте компоненти с други от различни източници или партиди. Допуска се обаче комбиниране на компоненти от набори с един и същ партиден номер, за да се осигурят необходимите обеми реактиви за тестване на повече от една микроплака на една серия с RCS.
- Нуклеиновите киселини са много чувствителни към разграждане от нуклеази в околната среда. Нуклеази има по човешката кожа и повърхности или материали, с които боравят хора. Почиствайте и покривайте работните повърхности с покривка за еднократна употреба и носете ръкавици без талк, когато изпълнявате всички стъпки от теста.
- Задължително предотвратявайте замърсяване на микроплаката за улавяне и реактива за откриване 2 (DR2) с екзогенна алкална фосфатаза по време на извършването на теста. Алкална фосфатаза може да се съдържа например в реактив за откриване 1 (DR1), бактерии, слюнка, косми и мазнини от кожата. Покриването на микроплаката за улавяне след стъпката за промиване и по време на инкубацията на DR2 е особено важно, защото екзогенна алкална фосфатаза може да реагира с DR2 и да доведе до грешни положителни резултати.
- Предпазвайте DR2 от продължително излагане на пряка светлина. Използвайте DR2 незабавно след приготвянето на аликвотните части и го предпазвайте от пряка слънчева светлина.

- Обезвъздушете пипетата с многократно действие, преди да накапвате реактива, и редовно проверявайте за големи въздушни мехурчета. Ако във върха на пипетата с многократно действие има множество големи въздушни мехурчета, тя може да не накапе точното количество. Това може да се предотврати, като пипетата се напълни, изпразни докрай и напълни отново. В ръководството за потребителя на пипетата ще намерите конкретните инструкции за употреба.
- За многоканалните пипети се използва техниката за обратно пипетиране (вижте „Откриване на хибриди“ на страница 53) за накапване на DR1 и DR2. Проверете дали всяко връхче на многоканалната пипета е добре поставено и запълнено.
- Всяка ямка на микроплаката за улавяне трябва да бъде добре промита (вижте „Промиване“ на страница 54). Недостатъчното промиване може да остави по-наситен фон и да доведе до грешни положителни резултати. Остатъчен буфер за промиване в ямките на микроплаката за улавяне може да причини понижаване на нивото на сигнала или лоша възпроизводимост.

Съхранение и работа с реактиви

Компоненти на набора

След получаването съхранявайте набора при 2–8 °C. Концентрираният буфер за промиване, реактивът за денатуриране и индикаторният оцветител могат да се съхраняват при 2–30 °C, ако е необходимо. Всички реактиви се доставят готови за употреба с изключение на реактива за денатуриране (DNR), сместа за сондата и буфера за промиване.

Пригответни реактиви

След като бъде пригответен, DNR е стабилен 3 месеца при 2–8 °C.

След като бъде пригответен, буферът за промиване е стабилен 3 месеца при 2–30 °C.

Ако се тестват аликвотни части в PreservCyt, обработени с QIASymphony DSP HPV Media Kit или QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, отворените неденатурирани калибратори и контроли са стабилни 3 месеца при 2–8 °C.

Ако се тестват аликвотни части, обработени с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, пригответният реактив за денатуриране 2 (DNR2) е стабилен 8 часа при 15–30 °C.

Взимане и подготовка на проби

Цервикални и вагинални проби за тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test трябва да се взимат и пренасят с едно от следните изделия за взимане на проби:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (включва цервикална четка и STM)
- Тъкани от биопсия, взети в *digene* STM
- Изделие за взимане на проба с метличка или комбинирано изделие за взимане на проба с четчица/шпатула и поставени след това в PreservCyt Solution или SurePath Preservative Fluid

Проби, взети с други изделия за взимане на проби или пренасяни в други преносни среди, не са проверени за употреба с този тест. Работните характеристики на този тест са установени само с посочените набори за взимане на проби.

digene HC2 DNA Collection Device не трябва да се използва за бременни жени. Цервикални проби трябва да се взимат преди обработката на цервикса с оцетна киселина или йод, ако се извършва преглед с колпоскопия. В инструкциите за употреба на *digene* HC2 DNA Collection Device ще намерите допълнителни процедури за взимане на проби и боравене с проби.

Цервикални и вагинални проби, взети в STM, не изискват допълнителна обработка на аликвотните части преди тестването с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Проби в PreservCyt и SurePath изискват допълнителна обработка на аликвотните части преди тестването с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Цервикални и вагинални проби в STM

Важно: Не взимайте цервикална или вагинална проба в STM при високи концентрации на противогъбичен крем, противозачатъчен гел или дамски душ.

Проби в STM могат да се съхраняват до 2 седмици при стайна температура и да се транспортират без охлаждане до лабораторията за тестване. Изпращайте пробите в изолиран контейнер с доставка на следващия или 2-рия ден.

В лабораторията за тестване пробите трябва да се съхраняват при 2–8 °C, ако тестът ще се извършва в рамките на 1 седмица. Ако тестът ще се извършва след повече от 1 седмица, покрийте капачките на епруветките с пробите с Parafilm и съхранявайте пробите при –20 °C до 3 месеца. Когато изваждате от фризера проби за тестване, незабавно сменете капачките със завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби.

В STM е добавен консервант, възпрепятстващ развъждането на бактерии и съхраняващ целостта на ДНК. Той не е предназначен за съхраняване на жизнеспособността на организми или клетки.

Проби от цервикална биопсия

Прясна проба с тъкан от цервикална биопсия с напречно сечение до 5 mm може да се тества с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Не използвайте тъкани от биопсия с диаметър под 2 mm. Поставете незабавно пробата от биопсия в 1,0 ml STM, покрийте капачката на епруветката с пробата с Parafilm, за да не се отвори, и я съхранявайте замразена при -20°C . Изпращайте пробите от биопсия при $2-30^{\circ}\text{C}$ за доставка на следващия ден до лабораторията за тестване.

В лабораторията за тестване пробите трябва да се съхраняват при -20°C , докато не бъдат обработени. Когато изваждате от фризера проби за тестване, незабавно сменете капачките със завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби.

Цервикални проби в PreservCyt Solution

Важно: Не взимайте цервикална проба в PreservCyt за подготовка на аликвотни части с QIASymphony DSP HPV Media Kit при високи концентрации на противогъбичен крем, вагинален лубрикант или кръв.

Важно: Не взимайте цервикална проба в PreservCyt за подготовка на аликвотни части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit при наличие на противозачатъчен гел.

Вземете пробите по обичайния начин и подгответе предметните стъкла ThinPrep® Pap Test по инструкциите за употреба, предоставени от производителя.

След като вземете проби в PreservCyt, ги съхранявайте до 3 месеца при $2-30^{\circ}\text{C}$ преди подготовката на аликвотните части за *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Проби в PreservCyt не се замразяват.

Подготовката на аликвотните части може да се извърши по следните начини:

- Автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony SP и QIASymphony DSP HPV Media Kit

Резултатът е екстракт от аликвотна част (с магнитни частици, STM и DNR), който е готов за преминаване към стъпката за денатуриране от теста.

- Автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIAasymphony SP и QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit

Резултатът е елуат от ДНК, готов за преминаване към стъпката за денатуриране от теста.

- Ръчна подготовка на аликвотни части с *digene* HC2 Sample Conversion Kit

Резултатът от ръчната подготовка е денатурирана аликвотна част, готова за преминаване към стъпката за хибридизация от теста.

Изискванията за обема от пробата зависят от начина за подготовка на аликвотните части, както следва:

- Автоматизираната подготовка на аликвотните части с QIAasymphony DSP HPV Media Kit изисква 3 ml проба
- Автоматизираната подготовка на аликвотните части с QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit изисква 4 ml проба
- Ръчната подготовка на аликвотните части с *digene* HC2 Sample Conversion Kit изисква поне 4 ml проба

Проби с по-малък от необходимия обем след приготвянето на Pap Test съдържат недостатъчно материал за тестване и може да предизвикат грешен отрицателен резултат в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Цервикални проби в SurePath Preservative Fluid

Важно: Не взимайте цервикална проба в SurePath за подготовка на аликвотни части с QIAasymphony DSP HPV Media Kit при наличие на противозачатъчен гел, противогъбичен или противовъзпалителен крем.

Взимайте пробите в SurePath Preservative Fluid по съответните инструкции за употреба.

Подготовката на аликвотните части от проби в SurePath може да се извърши преди началото или след края на цитологичната обработка.

Ако не сте започнали цитологичната обработка, използвайте аликвотна част от изходната проба в SurePath, която не била обработена по друг диагностичен метод – например с BD PrepMate® System и BD PrepStain® Slide Processor. В тези инструкции за употреба тези аликвотни части се наричат „аликвотни части в SurePath“, за да се избегнат недоразумения.

Ако сте приключили цитологичната обработка, използвайте аликвотна част от клетъчната пелета след градиентно елуиране, останала след подготовката на пробата в SurePath по съответните инструкции за BD PrepMate System и BD PrepStain Slide Processor. В тези инструкции за употреба тези аликвотни части се наричат „аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath“, за да се избегнат недоразумения.

Подготовката на аликвотните части може да се извърши по следните начини:

- Автоматизирана подготовка на аликвотни части в SurePath с QIASymphony SP и QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Резултатът е денатуриран екстракт от аликвотна част (с магнитни частици, STM и DNR), който е готов за преминаване към стъпката за хибридизация от теста.

- Автоматизирана подготовка на аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony SP и QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Резултатът е денатуриран екстракт от аликвотна част (с магнитни частици, STM и DNR), който е готов за преминаване към стъпката за хибридизация от теста.

- Ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath.

Резултатът от ръчната подготовка е денатурирана аликвотна част, готова за преминаване към стъпката за хибридизация от теста.

Изискванията за обема на аликвотните части зависят от начина за тяхната подготовка, както следва:

- Автоматизираната подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit изисква 950 µl
- Ръчната подготовка на аликвотните части изисква 2,8 ml аликвотна част от клетъчна пелета след градиентно елуиране в SurePath

Използване на по-малък от необходимия обем може да предизвика грешен отрицателен резултат в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Автоматизирана подготовка на аликвотните части от проби в SurePath

След като вземете проби в SurePath, ги съхранявайте до 4 седмици при 5–25 °C преди подготовката на аликвотните части с QIASymphony SP и QIASymphony DSP HPV Media Kit. Използваната проба в SurePath трябва да не е била обработена по друг диагностичен метод – например с BD PrepMate® и BD PrepStain® Slide Processor. Автоматизираната подготовка на аликвотните части изисква 950 µl от пробата в SurePath.

Автоматизирана подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath

Важно: Непосредствено след подготовката на предметното стъкло от цитонамазката в SurePath пипетирайте 2,0 ml SurePath Preservative Fluid в епруветката за центрофугиране, съдържаща клетъчната пелета след градиентно елуиране. Така се съхранява целостта на клетъчната пелета след градиентно елуиране за извършването на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Клетъчната пелета след градиентно елуиране в SurePath Preservative Fluid може да се съхранява до 4 седмици при 5–25 °C преди подготовката на аликвотните части за *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Автоматизираната подготовка на аликвотните части изисква 950 µl от клетъчната пелета след градиентно елуиране в SurePath.

Ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath

Важно: Непосредствено след подготовката на предметното стъкло от цитонамазката в SurePath пипетирайте 2,0 ml SurePath Preservative Fluid в епруветката за центрофугиране, съдържаща остатъчната клетъчна пелета. Така се съхранява целостта на клетъчната пелета след градиентно елуиране за извършването на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Клетъчната пелета след градиентно елуиране в SurePath Preservative Fluid може да се съхранява до 4 седмици при 2–30 °C преди подготовката на аликвотните части за *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Проби от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath се приготвят, както е посочено в тези инструкции за употреба. Резултатът от ръчната подготовка е денатурирана аликвотна част, готова за преминаване към стъпката за хибридизация от теста.

Процедура

Какво трябва да направите, преди да започнете

- За ръчно тестване оставете поне 60 минути Microplate Heater I да се подгрее до 65 °C ± 2 °C след студено включване. Ако не оставите това време за подгряване, микроплаката за хибридизация може да се стопи. В *ръководството за потребителя на Microplate Heater I* ще намерите допълнителни инструкции.
- Ако използвате водна баня по време на стъпките за денатуриране и хибридизация, водната баня трябва да бъде при 65 °C и нивото на водата трябва да бъде достатъчно, за да се потопи целият обем от пробата в епруветката.

Подготовка на реактивите

- Извадете пробите и всички необходими реактиви от хладилника, преди да започнете теста. Оставете ги 15–30 минути да се темперират до 20–25 °C. Подгответе аликвотните части в PreservCyt и SurePath, преди да темперирате предварително денатурираните проби и реактиви до стайна температура.
- Ако комбинирате готовите за употреба реактиви за серия с повече от една плака в RCS, разбъркайте добре отделните шишета и след това комбинирайте съответния обем реактив в чиста полипропиленова епруветка с конично дъно за еднократна употреба.
- За ръчно тестване реактивите с буфера за промиване и сместа за сондата се приготвят по време на съответните стъпки от тестването. За автоматизирано тестване с RCS всички реактиви се приготвят преди стартирането на серията в RCS и се поставят на плота на RCS.
- Пригответе необходимите DNR и DNR2, преди да пригответе другите реактиви.
- Изхвърлете всички приготвени реактиви (ако не е посочено друго) и аликвотни части от реактиви в края на теста.
- Използвайте следващите таблици 1–5, за да определите необходимия обем за всеки реактив според броя на тестовите/микроплаките и метода на тестването. Обемите за автоматизирано тестване с RCS включват неизползваемия обем реактив, който е необходим на апарата.

Таблица 1. Необходими обеми приготвени и готови за употреба реактиви за ръчно тестване на проби в STM и ръчно приготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath

Брой тестове/ленти	Смес за сондата	Буфер за промиване	DR1	DR2
24/3	1,04 ml	> 1 литър	3 ml	3 ml
48/6	2,08 ml	> 1 литър	5 ml	5 ml
72/9	3,12 ml	> 1 литър	7 ml	7 ml
96/12	4,16 ml	> 1 литър	12 ml	12 ml

Таблица 2. Необходими обеми приготвени и готови за употреба реактиви за автоматизирано тестване с RCS на проби в STM, ръчно приготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath и аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath, приготвени с QIAasymphony DSP HPV Media Kit

Брой микроплаки	Смес за сондата	Буфер за промиване	DR1	DR2
≤ 1	5,20 ml	3 литра	10 ml	10 ml
≤ 1,5	6,24 ml	3 литра	14 ml	14 ml
≤ 2	8,32 ml	3 литра	18 ml	18 ml
≤ 2,5	9,36 ml	6 литра	22 ml	22 ml
≤ 3	10,40 ml	6 литра	26 ml	26 ml
≤ 3,5	12,48 ml	6 литра	30 ml	30 ml
≤ 4	13,52 ml	6 литра	34 ml	34 ml

Таблица 3. Необходими обеми приготвени и готови за употреба реактиви за автоматизирано тестване с RCS на аликвотни части в PreservCyt, приготвени с QIAasymphony DSP HPV Media Kit

Брой микроплаки	DNR	Смес за сондата	Буфер за промиване	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,20 ml	3 литра	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	6,24 ml	3 литра	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	8,32 ml	3 литра	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	9,36 ml	6 литра	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	10,40 ml	6 литра	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	12,48 ml	6 литра	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	13,52 ml	6 литра	34 ml	34 ml

Таблица 4. Необходими обеми приготвени и готови за употреба реактиви за ръчно тестване на алиquotни части в PreservCyt, приготвени с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Брой тестове/ленти	DNR	DNR2	Смес за сондата	Буфер за промиване	DR1	DR2
24/3	0,6 ml	1,0 ml	1,04 ml	> 1 литър	3 ml	3 ml
48/6	0,6 ml	2,0 ml	2,08 ml	> 1 литър	5 ml	5 ml
72/9	0,6 ml	2,5 ml	3,12 ml	> 1 литър	7 ml	7 ml
96/12	0,6 ml	5,0 ml	4,16 ml	> 1 литър	12 ml	12 ml

Таблица 5. Необходими обеми приготвени и готови за употреба реактиви за автоматизирано тестване с RCS на алиquotни части в PreservCyt, приготвени с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Брой микроплаки	DNR	DNR2	Смес за сондата	Буфер за промиване	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,0 ml	5,20 ml	3 литра	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	5,5 ml	6,24 ml	3 литра	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	6,5 ml	8,32 ml	3 литра	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	7,7 ml	9,36 ml	6 литра	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	8,8 ml	10,40 ml	6 литра	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	10,0 ml	12,48 ml	6 литра	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	11,0 ml	13,52 ml	6 литра	34 ml	34 ml

Реактив за денатуриране

Наборът с 1 плака се доставя с 50 ml реактив за денатуриране, а наборът с 4 плаки се доставя с 2 × 100 ml реактив за денатуриране. Задължително пригответе DNR според обема, доставен със съответния набор.

Бележки:

- След като бъде приготвен, DNR е стабилен 3 месеца при 2–8 °C.
- Ако цветът избледнява, прибавете 3 допълнителни капки индикаторен оцветител и разбъркайте добре преди употреба.

Шише 50 ml

1. Прибавете 5 капки индикаторен оцветител в шишето с реактив за денатуриране 50 ml.
2. Разбъркайте добре.

DNR трябва да има равномерен тъмнолилав цвят.

3. Надпишете DNR с новата дата на изтичане на срока на годност.

Шише 100 ml

1. Прибавете 10 капки индикаторен оцветител в шишето с реактив за денатуриране 100 ml.
2. Разбъркайте добре.
DNR трябва да има равномерен тъмнолилав цвят.
3. Надпишете DNR с новата дата на изтичане на срока на годност.

Реактив за денатуриране 2

Забележка: DNR2 е необходим само за тестване на аликвотни части в PreservCyt, приготвени с QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit.

1. Надпишете чиста полипропиленова епруветка с конично дъно за еднократна употреба с „DNR2“.
2. Прибавете необходимия обем Buffer N2 (вижте Таблица 6 по-долу) в надписания контейнер.

Таблица 6. Приготвяне на DNR2

Необходим обем DNR2	Обем Buffer N2	Обем Buffer D2	Индикаторен оцветител
1,0 ml	0,4 ml	0,6 ml	1–2 капки
2,0 ml	0,8 ml	1,2 ml	1–2 капки
2,5 ml	1,0 ml	1,5 ml	1–2 капки
5,0 ml	2,0 ml	3,0 ml	1–2 капки
5,5 ml	2,2 ml	3,3 ml	1–2 капки
6,5 ml	2,6 ml	3,9 ml	1–2 капки
7,7 ml	3,1 ml	4,6 ml	1–2 капки
8,8 ml	3,5 ml	5,3 ml	1–2 капки
10,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	1–2 капки
11,0 ml	4,4 ml	6,6 ml	1–2 капки

3. Прибавете необходимия обем Buffer D2 (вижте Таблица 6 по-горе) в надписания контейнер.
4. Прибавете необходимото количество индикаторен оцветител (вижте Таблица 6 по-горе) в надписания контейнер.

Забележка: Използвайте индикаторния оцветител, доставен с набора *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

5. Разбъркайте на вортекса поне 10 секунди.

Забележка: След като бъде приготвен, DNR2 е стабилен 8 часа при 15–30 °C.

Смес за сондата

- За ръчно тестване пригответе сместа за сондата по време на денатурирането и инкубацията на пробата (вижте съответно „Денатуриране на калибратори, контроли и проби в STM“ на страница 45 или „Денатуриране на калибратори, контроли и елуати от ДНК за ръчно тестване“ на страница 43).
 - Внимавайте много, за да предотвратите замърсяване с рибонуклеази. Използвайте връхчетата с аерозолна бариера за пипетите, когато пипетирате сондата.
 - Дилуентът за сондата е гъст. Трябва да се вижда характерният въртоп, когато пригответе сместа за сондата; недостатъчно разбъркване може да причини понижаване на нивото на сигнала.
 - Ако комбинирате различни шишета със сондата за автоматизирано тестване с RCS, съберете сондата в едно шише и разбъркайте с пипетиране.
1. За да не остава сонда по капачката на шишето, центрофугирайте кратко време всяко шише със сонда, за да се събере течността на дъното на шишето.
 2. Чукнете леко шишето, за да се разбърка.
 3. Определете необходимото количество смес за сондата.

Препоръка: Пригответе повече смес за сондата, за да компенсирате обема, който може да остане по връхчетата на пипетите или отстрани на шишето. Посочените обеми в таблици 1–5 по-горе включват необходимия допълнителен обем.

Ръчно тестване: Определете необходимите обеми за разреждането на сондата в дилуента в съотношение 1:25, за да пригответе сместа за сондата (25 µl/тест). Обемите са дадени съответно в Таблица 1 на страница 31 и Таблица 4 на страница 32.

Автоматизирано тестване с RCS: Използвайте посочените обеми съответно в Таблица 2 на страница 31, Таблица 3 на страница 31 или Таблица 5 на страница 32.

4. Надпишете нов контейнер за еднократна употреба със „Смес за сонда за високорискови HPV“.

В зависимост от броя на тестовете е препоръчително да се използва 5-ml или 15-ml полипропиленова епруветка с фиксираща се капачка и обло дъно.

5. Прибавете необходимото количество дилуент за сонда (вижте Таблица 7 отдолу) в надписаната епруветка.
6. Пипетирайте необходимото количество от сондата за високорискови HPV в дилуента (вижте Таблица 7 отдолу), като поставите връхчето на пипетата до вътрешната стена на епруветката точно над облата част и накапете съдържанието.

Важно: Не потапяйте връхчето в дилуента за сондата.

Таблица 7. Приготвяне на сместа за сондата

Необходим обем смес за сондата	Обем дилуент за сондата	Обем сонда за високорискови HPV
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. Бъркайте поне 5 секунди на вортекса на максимална скорост, за да се разбърка добре.

Трябва да се вижда характерният въртоп.

Буфер за промиване

- За ръчно тестване пригответе буфера за промиване по време на стъпката за улавяне на хибриди (вижте „Улавяне на хибриди“ на страница 51).
- За да сведете експозицията до минимум, по време на подготовката прибавете вода в концентрирания буфер за промиване.
- За ръчния метод за промиване на микроплаките пригответе 3 литра от буфера за промиване в апаратурата за промиване.

Препоръка: На всеки 3 месеца почиствайте апаратурата и шлаухите за промиване с 0,5% разтвор на натриев хипохлорит и изплаквайте добре с дестилирана или дейонизирана вода, за да предотвратите замърсяване от алкална фосфатаза в бактерии и плесени.

- За Automated Plate Washer пригответе буфера за промиване и го съхранявайте в покрит контейнер или пригответе 1 литър и го поставете в резервоара за промиване на Automated Plate Washer.
 - За автоматизирано тестване с RCS пригответе посоченото количество (вижте съответно Таблица 2 на страница 31, Таблица 3 на страница 31 или Таблица 5 на страница 32) в шишето за промиване на RCS.
1. Разбъркайте добре концентрирания буфер за промиване и прибавете необходимия обем от него (вижте Таблица 8 по-долу) в посочения контейнер.
 2. Прибавете необходимия обем дестилирана или дейонизирана вода (вижте Таблица 8 отдолу) в посочения контейнер.

Таблица 8. Приготвяне на буфер за промиване

Необходим обем буфер за промиване	Обем концентриран буфер за промиване	Обем дестилирана или дейонизирана вода
1 литър	33,3 ml	966,7 ml
2 литра	66,6 ml	1933,4 ml
3 литра	100,0 ml	2900,0 ml
6 литра	200,0 ml	5800,0 ml

3. Поставете чиста немъхеста хартиена кърпичка върху всички отвори на контейнера и разбъркайте добре.
4. Запечатайте контейнера, за да предотвратите замърсяване или изпаряване, или направо го поставете на съответния апарат.
5. Надпишете буфера за промиване с новата дата на изтичане на срока на годност.

Забележка: След като бъде приготвен, буферът за промиване е стабилен 3 месеца при 2–30 °C.

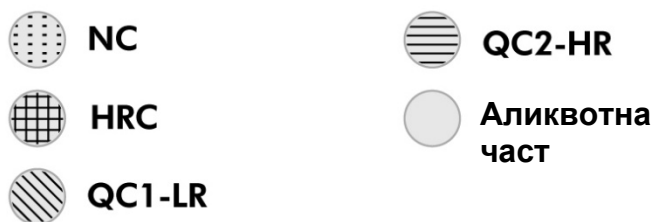
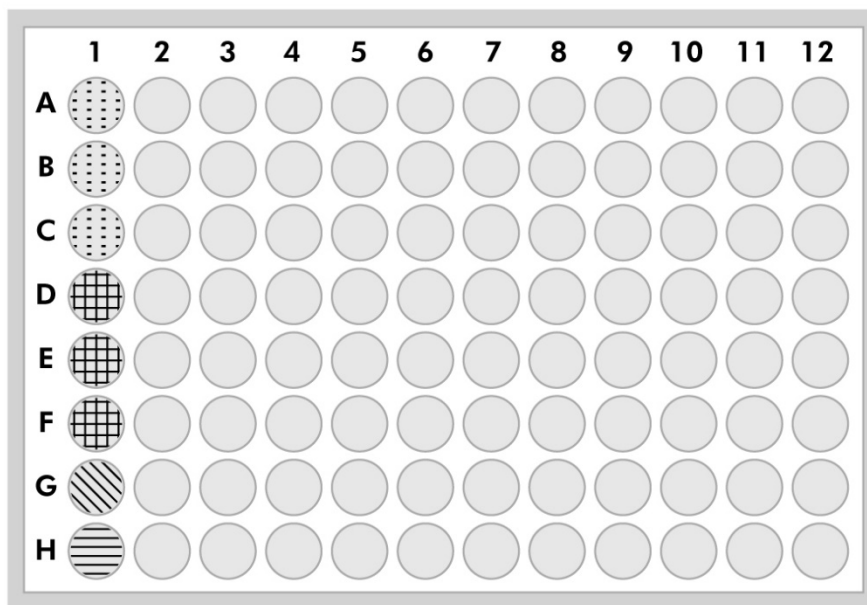
Конфигуриране на плаката

1. Конфигурирайте плаката с аналитичния софтуер за анализи *digene* с протоколите за анализи *digene* за HPV.

В съответното ръководство за потребителя на софтуера ще намерите инструкции за конфигурирането на плаката с точните позиции за калибраторите, контролите и пробите.

Бележки:

- Калибраторите, контролите и пробите се обработват в конфигурация с 8-ямки на колона.
- Тествайте калибраторите и контролите в следващите позиции на микроплаката (вижте Фигура 1 отдолу):
 - Реплики от отрицателен калибратор (Negative Calibrator, NC) в ямки A1, B1, C1 на микроплаката
 - Реплики от калибратор с високорискови HPV (High-Risk Calibrator, HRC) в микроплака ямки D1, E1, F1 на микроплакатас
 - Контрола с нискорискови HPV (QC1-LR) в ямка G1 на микроплаката
 - Контрола с високорискови HPV (QC2-HR) в ямка H1 на микроплаката



Фигура 1. Позиции на калибраторите, контролите и аликвотните части на микроплаката.

Важно: Когато изпълнявате автоматизирано тестване с RCS, използвайте специфичните за RCS протоколи за анализи за конфигурирането на плаката и генерирането на резултатите. Дефинираните параметри на специфичните за RCS протоколи за анализи са различни от тези за протоколите за анализи за ръчно тестване (вижте „Изчисляване на стойността cut-off“ на страница 61).

2. Поставете калибраторите, контролите и пробите за тестване в статив за епруветки за взимане на проби или статив за проби в реда, в който ще бъдат тествани.

Важно: Когато се изпълнява автоматизирано тестване с RCS, конфигурацията на плаката задължително трябва да съответства точно на тестваните проби, за да се предотврати съобщаване на неточни резултати за пробите. Проверете съответствието на серийните номера на всеки използван статив и капак за проби и надпишете всеки статив и капак за проби според реда за тестване на RCS.

Използвайте маркер и етикет, които няма да се отмият във водната баня на 65 °C.


Подготовка на аликвотните части

Проби в PreservCyt и SurePath изискват подготовка на аликвотните части преди тестването с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Аликвотните части се подготвят за различните стъпки от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test с различна подготовка.

Възможните методи за подготовка на аликвотните части са следните:


- Автоматизирана подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Автоматизирана подготовка на аликвотните части от проби в SurePath и клетъчни пелети след градиентно елуиране с QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Автоматизирана подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit
- Ръчна подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt
- Ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath

Подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit


 В инструкциите за употреба (наръчник) на QIASymphony DSP HPV Media Kit ще намерите инструкции за подготовката на аликвотните части в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Важно: Екстрактите, получени след подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit, може да се тестват само с RCS. Ръчно извършване на теста с екстракти от аликвотните части не е валидирано.

Резултатът от подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit е екстракти от аликвотните части в микроплака за хибридизация с празна първа колона. Екстрактите от аликвотните части съдържат магнитни частици, STM и DNR и са готови за автоматизирано тестване с RCS на стъпката за денатуриране. Калибраторите, контролите и екстрактите от аликвотните части се денатурират едновременно в микроплаката за хибридизация по време на автоматизирано тестване с RCS (вижте „Денатуриране и хибридизация на аликвотни части, подготвени с QIASymphony SP“ на страница 42).


 Когато изпълнявате автоматизирано тестване с RCS на аликвотни части, подготвени с QIASymphony SP, в *ръководството за потребителя на Rapid Capture System – извършване на тестове digene HC2 DNA Test с аликвотни части, обработени с QIASymphony SP*, ще намерите пълните инструкции за тестването.

Подготовка на аликвотните части от проби в SurePath и клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit


 В *инструкциите за употреба (наръчник) на QIASymphony DSP HPV Media Kit* ще намерите инструкции за подготовката на аликвотни части в SurePath и аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Важно: Екстрактите, получени след подготовката на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit, може да се тестват само с RCS. Ръчно извършване на теста с екстракти от аликвотните части не е валидирано.

Резултатът от подготовка на аликвотните части от проби в SurePath и клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit е калибратори, контроли и екстракти от аликвотните части в микроплака за хибридизация, готови за автоматизирано тестване с RCS на стъпката за хибридизация от теста.


 Когато изпълнявате автоматизирано тестване с RCS на аликвотни части, подготвени с QIASymphony SP, в *ръководството за потребителя на Rapid Capture System – извършване на тестове digene HC2 DNA Test с аликвотни части, обработени с QIASymphony SP*, ще намерите пълните инструкции за тестването.

Подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

 В *наръчника за QIASymphony DSP AXpH DNA Kit* ще намерите инструкции за подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt.

Резултатът от подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit е елуати от ДНК в микроплака за хибридизация с празна първа колона. Елуатите от ДНК са готови за стъпката за денатуриране от теста. Калибраторите, контролите и елуатите от ДНК се денатурират едновременно на микроплаката за хибридизация (вижте „Денатуриране и хибридизация на аликвотни части, подготвени с QIASymphony SP“ на страница 42).

Ръчна подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt

 В инструкциите за употреба на *digene* HC2 Sample Conversion Kit ще намерите инструкции за ръчната подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt.

Резултатът от ръчната подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt с *digene* HC2 Sample Conversion Kit е аликвотни части, готови за стъпката за хибридизация от теста. Пригответе калибраторите и контролите поотделно (вижте „Денатуриране на калибратори, контроли и проби в STM“ на страница 45).

Ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath

Резултатът от ръчната подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath е аликвотни части, готови за стъпката за хибридизация от теста. Пригответе калибраторите и контролите поотделно (вижте „Денатуриране на калибратори, контроли и проби в STM“ на страница 45).

Важно: Ако обемът на клетъчната пелета след градиентно елуиране от пробата в SurePath явно е по-малък от 1 ml, пелетата не е подходяща за тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, защото SurePath Preservative Fluid не е добавена след цитологичната обработка.

1. Темперирайте клетъчните пелети след градиентно елуиране в SurePath до стайна температура и проверете дали обемът на течността е около 2,8 ml.
2. Центрофугирайте клетъчните пелети след градиентно елуиране в SurePath в ротор с променлив ъгъл на $800 \pm 15g$ в продължение на 10 ± 1 минути.
3. Извадете епруветките от центрофугата.
4. Непосредствено след центрофугирането прелейте внимателно супернатанта и поийте леко всяка епруветка поне 3 пъти с кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички, за да отстраните излишната течност. Наблюдавайте пелетата във всяка епруветка.

Важно: Не позволявайте на клетъчните пелети да се плъзгат надолу по епруветката по време на попиването.

5. Поставете епруветките в статива.
6. Прибавете 200 μ l STM във всяка пелета с пипета с многократно действие или едноканална пипета.

7. Ресуспендирайте всяка пелета, като разбъркате всяка епруветка поотделно 15 секунди на вортекса на висока скорост.
Ако пелетата трудно се ресуспендира, разбъркайте още 5–30 секунди на вортекса или докато пелетата се отдели от дъното на епруветката и започне да се разтваря.
Забележка: Епруветките може да се разбъркват отворени.
8. Пипетирайте 100 µl DNR във всяка проба в SurePath с пипета с многократно действие или едноканална пипета.
Важно: Внимавайте да не докоснете страните на епруветката, за да не предизвикате кръстосано замърсяване на пробите.
9. Разбъркайте добре всяка епруветка поотделно на вортекса на висока скорост 5 секунди.
Забележка: Епруветките може да се разбъркват отворени.
10. Надпишете съответните епруветки *digene* HC2 Sample Conversion Tubes или 15-ml епруветки с конично дъно със съответните идентификатори и видове на аликвотните части (например „SP“ за проба в SurePath) и поставете епруветките в статив.
Важно: За автоматизирано тестване с RCS трябва да се използват епруветки *digene* HC2 Sample Conversion Tubes.
11. Прехвърлете целия обем в съответната 15-ml епруветка с конично дъно със 7-ml стандартна пипета за прехвърляне за еднократна употреба или еквивалентна.
12. Затворете епруветките с конично дъно и ги поставете в статив.
13. Инкубирайте епруветките във водна баня на 65 ± 2 °C в продължение на 90 ± 5 минути.
Забележка: Това време за инкубация е повече от необходимото за другите одобрени видове проби.
Ако тестването ще се извършва в същия ден, денатурирайте калибраторите и контролите (вижте „Денатуриране на калибратори, контроли и проби в STM“ на страница 45).
14. Извадете статива с епруветките от водната баня след инкубацията.
Ако използвате статив за проби, не го оставяйте да изстине, преди да свалите капака на статива. Пристъпете незабавно към тестването или свалете капака на статива и фолиото DuraSeal за запечатване на епруветки.
Забележка: Ако стативът за проби е изстинал, епруветките може да се залепят за капака и в последствие да се разлеят.
Подготвените аликвотни части в SurePath могат да се:

- Тестват незабавно (преминете на „Хибридизация на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath“ на страница 48)
- Съхраняват (вижте „Избирателен престой на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath“ на страница 47)


Денатуриране и хибридизация на аликвотни части, подготвени с QIASymphony SP

Резултатът от подготовката на аликвотните части на QIASymphony SP е микроплака за хибридизация, съдържаща като минимум подготвените аликвотни части.

Ако аликвотните части в PreservCyt са подготвени с QIASymphony SP, първата колона на микроплаката за хибридизация е празна. Съдържанието на микроплаката е готово за стъпката за денатуриране от теста. Калибраторите и контролите се прибавят в микроплаката за хибридизация ръчно или по време на автоматизирано тестване с RCS, след което се изпълнява стъпката за денатуриране.

Ако аликвотните части в SurePath или аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath са подготвени с QIASymphony SP, плаката съдържа подготвените аликвотни части с денатурираните калибратори и контроли, пипетирани в първата колона на микроплаката за хибридизация. Съдържанието на микроплаката е готово за автоматизирано тестване с RCS на стъпката за хибридизация от теста.

Важно: Екстрактите от аликвотните части, получени при подготовката на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit, могат да се тестват само с RCS. Ръчно извършване на теста с екстракти от аликвотните части не е валидирано.

 Когато изпълнявате автоматизирано тестване с RCS на аликвотни части, подготвени с QIASymphony SP, в *ръководството за потребителя на Rapid Capture System – извършване на тестове digene HC2 DNA Test с аликвотни части, обработени с QIASymphony SP*, ще намерите пълните инструкции за тестването.

Денатуриране на калибратори, контроли и елуати от ДНК за ръчно тестване

- Тази процедура се използва за ръчно тестване на аликвотни части от проби в PreservCyt, подготвени с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit. Ако изпълнявате автоматизирано тестване с RCS, в *ръководството за потребителя на Rapid Capture System – извършване на тестове digene HC2 DNA Test с аликвотни части, обработени с QIASymphony SP*, ще намерите пълните инструкции за тестването.
- Денатурирането на калибратори и контроли се извършва с DNR, докато денатурирането на елуатите от ДНК се извършва с DNR2.

1. Разбъркайте всеки калибратор и контрола 10 секунди на вортекса на максималната настройка.
2. Обърнете всяка епруветка, за да извадите материала от капачката на епруветката.
3. Извадете капачките от епруветките с калибратори и контроли и ги изхвърлете.
4. С едноканална пипета прибавете 50 µl от съответния калибратор или контрола в дъното на празната ямка на микроплаката за хибридизация в съответствие с използваната конфигурация на плаката.

Ако калибраторът и контролите ще се използват за допълнително тестване, затворете епруветките с нови завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби, надпишете ги с нова дата на изтичане на срока на годност и ги съхранявайте при 2–8 °C.

Забележка: Отворените неденатурирани калибратори и контроли са стабилни 3 месеца при 2–8 °C.

5. Разбъркайте добре приготвените DNR и DNR2 на вортекса и отделете аликвотна част от всеки в подходящо надписан резервоар за реактив за еднократна употреба.

Важно: Задължително прибавете точния реактив в точната колона на микроплаката за елуат.

6. С 8-канална пипета прибавете 25 µl DNR в първата колона на микроплаката за хибридизация, съдържаща калибраторите и контролите.
7. С 8-канална пипета прибавете 25 µl DNR2 във всяка ямка на микроплаката за хибридизация, съдържаща елуат от ДНК.
8. Покрийте микроплаката за хибридизация с капак за микроплака и разбъркайте 30 секунди на Rotary Shaker I, настроен на 1100 ± 100 оборота в минута.
9. Поставете микроплаката в Microplate Heater I, темпериран до 65 ± 2 °C, като внимавайте да не се изпусне течност. Инкубирайте микроплаката за хибридизация 45 ± 5 минути.

Пригответе сместа за сондата по време на тази инкубация (вижте „Смес за сондата“ на страница 34).

10. Извадете микроплаката за хибридизация от Microplate Heater I.

Денатурираните калибратори, контроли и елуати от ДНК могат да се:

- Съхраняват (вижте „Избирателен престой на елуати от ДНК“ на страница 44)
- Тестват незабавно (преминете на „Хибридизация на елуати от ДНК“ на страница 44)

Избирателен престой на елуати от ДНК

Денатурирани елуати от ДНК, включително калибратори и контроли, покрити с капак за микроплака, могат да се съхраняват при 2–8 °C 2 седмици.

Хибридизация на елуати от ДНК

1. Ако микроплаката за хибридизация, съдържаща денатурираните калибратори, контроли и елуати от ДНК, е била оставена на съхранение, свалете капака на микроплаката и я оставете да се темперира до 20–25 °C.
2. Разбъркайте добре сместа за сондата на вортекса и отделете аликвотна част в резервоар за реактив за еднократна употреба.
3. Внимателно пипетирайте 25 µl от сместа за сондата във всяка ямка на микроплаката за хибридизация с 8-канална пипета и нови връхчета за всяко добавяне на смес за сондата.

Внимавайте да не изплискате течност и да не докоснете страните на ямките на микроплаката за хибридизация.

4. Покрийте микроплаката за хибридизация с капак за микроплака и разбъркайте 3 ± 2 минути на Rotary Shaker I, настроен на 1100 ± 100 оборота в минута. След разбъркването на шейкъра калибраторите, контролите и елуатите от ДНК трябва да пожълтеят.

Аликвотни части, които остават лилави, може да не са получили правилното количество смес за сондата. Прибавете още 25 µl смес за сондата в останалите лилави аликвотни части и разбъркайте отново на шейкъра. Ако аликвотна част остане лилава след тази процедура, тествайте повторно пробата.

5. Поставете микроплаката в Microplate Heater I, temperиран до 65 ± 2 °C, като внимавайте да не се изплиска течност. Инкубирайте микроплаката за хибридизация 60 ± 5 минути.
6. Преминете на „Улавяне на хибриди“ на страница 51, за да продължите тестването.

Денатуриране и хибридизация на проби в STM и ръчно приготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath

- Когато тествете ръчно приготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath, стъпката за денатуриране не е задължителна за аликвотните части. Необходимите за теста калибратори и контроли обаче се денатурират по следващите инструкции.
- Някои проби в STM може да съдържат кръв или друг биологичен материал, който може да възпрепятства промените на цвета след прибавянето на DNR. Проби с тъмен цвят преди прибавянето на DNR може да не се оцветят правилно на тази стъпка. В тези случаи различното оцветяване не се отразява на резултатите на теста. Доброто разбъркване може да се провери с наблюдаване на промяната на цвета на калибраторите и контролите.

Денатуриране на калибратори, контроли и проби в STM

- Не изваждайте изделието за взимане на проба от епруветката с пробата в нито един момент.
- За да се предотвратят грешни положителни резултати, целият материал в пробата задължително трябва да влезе в контакт с DNR. Разбъркването след прибавянето на DNR е задължителна стъпка.
- За проби в STM, денатурирани по метода с MST Vortexer 2, трябва да се използва методът „Хибридизация с микроплака и Microplate Heater I“ на страница 48. Методът „Хибридизация с микроепруветки и водна баня“ (страница 50) не е валидиран с проби в STM, денатурирани с MST Vortexer 2.

1. Свалете и изхвърлете капачките от епруветките.

Важно: Свалените капачки от епруветки с проби в STM трябва да се считат за потенциално инфекциозни (допълнителна информация ще намерите в „Предупреждения и предпазни мерки“ на страница 20).

2. Пипетирайте посочения обем (вижте Таблица 9 отдолу) DNR в епруветките с пипета с многократно действие или регулируема пипета.

Внимавайте да не докоснете страните на епруветките, за да не предизвикате кръстосано замърсяване на пробите.

Важно: Наборите с 1 плака и 4 плаки имат различни обеми за калибратора с високорискови HPV. Задължително прибавете правилния обем DNR.

Забележка: Прибавеният обем DNR е равен на половината от обема на течността в епруветката.

Таблица 9. Прибавяне на DNR

Калибратор, контрола или проба в STM	Необходим обем DNR
Отрицателен калибратор, 2 ml	1000 µl
Калибратор с високорискови HPV, 1 ml	500 µl
Калибратор с високорискови HPV, 2 ml	1000 µl
Контрола с нискорискови или високорискови HPV, 1 ml	500 µl
Проба в STM, 1 ml	500 µl

3. Разбъркайте епруветките по метода с MST Vortexer 2 или метода за ръчно разбъркване на епруветките поотделно.

Метод с MST Vortexer 2

- a) Покрийте епруветките с фолио DuraSeal за запечатване на епруветки, като изтеглите фолиото върху епруветките в статива за проби.
- b) Поставете капака на статива върху покритите с фолио епруветки и го фиксирайте на място с 2-та странични клипса. Отрежете фолиото с режещото устройство.
- c) Вдигнете лостчето с червена дръжка в хоризонталното положение.
- d) Поставете статива за проби стабилно във водачите на MST Vortexer 2 – най-големият репер на статива трябва да бъде в предния десен ъгъл. Закрепете статива за проби, като свалите лостчето с червена дръжка във вертикалното положение.
- e) Изберете настройка за скоростта 100 (максимална скорост) и включете MST Vortexer 2.
- f) Разбъркайте епруветките 10 секунди на вортекса.
- g) Изключете MST Vortexer 2.
- h) Извадете статива за проби от MST Vortexer 2, като вдигнете лостчето с червената дръжка.

Метод за ръчно разбъркване на епруветките поотделно на вортекса

- a) Затворете епруветките с нови завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби.
- b) Разбъркайте добре всяка епруветка поотделно на вортекса на висока скорост 5 секунди.

Важно: По време на разбъркването трябва да се вижда характерният въртоп на течността, която трябва да мие цялата вътрешна повърхност на епруветката.

- c) Обърнете веднъж всяка епруветка, за да може течността да измие вътрешността на епруветката, капачката и ръба.
- d) Върнете епруветката в статива.

Течността в епруветката трябва да стане лилава.

4. Инкубирайте епруветките в статив във водна баня на 65 ± 2 °C 45 ± 5 минути.

За ръчно тестване пригответе сместа за сондата по време на тази инкубация (вижте „Смес за сондата“ на страница 34).

5. Извадете епруветките от водната баня след инкубацията.

Ако използвате статив за проби, не го оставяйте да изстине, преди да свалите капака на статива. Пристъпете незабавно към тестването или свалете капака на статива и фолиото DuraSeal за запечатване на епруветки.

Забележка: Ако стативът за проби изстине, епруветките може да се залепят за капака и в последствие да се разлеят.

Денатурираните калибратори, контроли и проби в STM може да се:

- Съхраняват (вижте „Избирателен престой на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath“ на страница 47)
- Тестват незабавно (преминете на „Хибридизация на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath“ на страница 48)

Избирателен престой на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath


Важно: Не съхранявайте и не изпращайте денатурирани проби на сух лед.

Всички подготвени аликвотни части, включително калибраторите и контролите, могат да се съхраняват при 2–8 °C до следващия ден или при –20 °C до 3 месеца. Могат да се извършват максимум 3 цикъла замразяване-размразяване с максимален престой 2 часа при стайна температура на всеки цикъл размразяване.

За съхранение до следващия ден при 2–8 °C в статива за проби покрийте аликвотните части с фолио DuraSeal за запечатване на епруветки и поставете отново капака на статива.

За съхранение при –20 °C в статива за проби свалете капака на статива и фолиото DuraSeal за запечатване на епруветки и поставете съответните капачки на епруветките.

Хибридизация на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath

 Когато изпълнявате автоматизирано тестване с RCS на аликвотни части в STM или ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath, в *ръководството за потребителя на Rapid Capture System* ще намерите пълните инструкции за тестването.

Ако денатурираните калибратори, контроли или проби са били оставени на съхранение, ги оставете да се темперират до 20–25 °C, а ако са съхранявани в статив за проби, свалете и изхвърлете капачките от епруветките.

- Възможни са два метода за хибридизация на аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath: „Хибридизация с микроплака и Microplate Heater I“ и „Хибридизация с микроепруветки и водна баня.“
- За проби в STM, денатурирани по метода с MST Vortexer 2, трябва да се използва „Хибридизация с микроплака и Microplate Heater I“ на страница 48. „Хибридизация с микроепруветки и водна баня“ (страница 50) не е валидиран с проби в STM, денатурирани с MST Vortexer 2.
- Сместа за сондата е гъста. Сместа за сондата трябва да бъде добре разбъркана и необходимото количество трябва да бъде накапано във всяка ямка на микроплаката за хибридизация или микроепруветка за хибридизация.
- Когато прехвърляте аликвотната част в микроплаката за хибридизация или микроепруветката за хибридизация, внимавайте да не докоснете страните на ямките на микроплаката за хибридизация или микроепруветките за хибридизация, защото невнимателното прехвърляне на аликвотните части може да доведе до грешни положителни резултати. Ограничете образуването на въздушни мехурчета. Използвайте чисто удължено връхче за пипета за всяко прехвърляне, за да предотвратите кръстосано замърсяване.

Хибридизация с микроплака и Microplate Heater I

1. Вземете и надпишете микроплака за хибридизация.
2. Разбъркайте на вортекса по един от следните методи:

Калибратори, контроли или аликвотни части в STM с MST Vortexer 2

- a) Ако е необходимо, покрийте епруветките с фолио DuraSeal за запечатване на епруветки и закрепете капака на статива за проби.

- b) Разбъркайте статива за проби минимум 5 секунди на вортекса на максималната настройка за скоростта.
- c) Поставете незабавно статива за проби на плота и отворете ключалките. Вдигнете капака на статива на около 1 см и внимателно го раздвижете наляво-надясно, за да се отлепят всички евентуално залепнали за фолиото DuraSeal епруветки. Свалете капака на статива, като го вдигнете право нагоре, докато се отдели от статива за проби.
- d) Внимателно отлепете фолиото DuraSeal за запечатване на епруветки от капака на статива и го изхвърлете.

Аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt или SurePath с MST Vortexer 2

- a) Ако е необходимо, покрийте епруветките с фолио DuraSeal за запечатване на епруветки и закрепете капака на статива за проби.
- b) Разбъркайте Conversion Rack минимум 10 секунди на вортекса на максималната настройка за скоростта.
- c) Поставете незабавно статива за проби на плота и отворете ключалките. Вдигнете капака на статива на около 1 см и внимателно го раздвижете наляво-надясно, за да се отлепят всички евентуално залепнали за фолиото DuraSeal епруветки. Свалете капака на статива, като го вдигнете право нагоре, докато се отдели от статива за проби.
- d) Внимателно отлепете фолиото DuraSeal за запечатване на епруветки от капака на статива и го изхвърлете.

Всички видове аликвотни части с вортекса

- a) Разбъркайте всяка епруветка поотделно поне 5 секунди на вортекса.
3. С пипетата EXPAND-4 или едноканална пипета с удължено връхче прехвърлете 75 µl от всеки калибратор, контрола или аликвотна част в дъното на празна ямка на микроплаката за хибридизация в съответствие с използваната конфигурация на плаката.

Ако аликвотните части ще се оставят на съхранение, затворете денатурираните калибратори, контроли и аликвотни части в STM с нови завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби и поставете оригиналната капачка за всяка от аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath.

Забележка: Съхранявайте аликвотните части при условията, посочени в „Избирателен престой на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath“ на страница 47.

- 4. След като прехвърлите последната аликвотна част, покрийте микроплаката за хибридизация с капак за микроплака и инкубирайте 10 минути при 20–25 °C.

5. Разбъркайте добре сместа за сондата на вортекса и отделете аликвотна част в резервоар за реактив за еднократна употреба.
6. Внимателно пипетирайте 25 µl от сместа за сондата във всяка ямка на микроплаката за хибридизация с 8-канална пипета и нови връхчета за всяко добавяне на смес за сондата. Внимавайте да не изплискате течност и да не докоснете страните на ямките на микроплаката за хибридизация.
7. Покрийте микроплаката за хибридизация с капак за микроплака и разбъркайте 3 ± 2 минути на Rotary Shaker I, настроен на 1100 ± 100 оборота в минута. След разбъркването на шейкъра калибраторите, контролите, аликвотните части в STM и аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath трябва да пожълтеят, а аликвотните части в PreservCyt трябва да порозовеят. Аликвотни части, които остават лилави, може да не са получили правилното количество смес за сондата. Прибавете още 25 µl смес за сондата в останалите лилави аликвотни части и разбъркайте отново на шейкъра. Ако аликвотна част остане лилава след тази процедура, тествайте повторно пробата.
8. Поставете микроплаката в Microplate Heater I, темпериран до 65 ± 2 °C, като внимавайте да не се изплиска течност. Инкубирайте микроплаката за хибридизация 60 ± 5 минути.
9. Преминете на „Улавяне на хибриди“ на страница 51, за да продължите тестването.

Хибридизация с микроепруветки и водна баня

1. Надпишете и поставете необходимите номера на чисти микроепруветки за хибридизация в статива за микроепруветки.
2. Разбъркайте всеки калибратор, контрола и епруветка с аликвотна част поотделно поне 5 секунди на вортекса, преди да отделите аликвотната част.
3. С едноканална пипета с удължено връхче прехвърлете 75 µl от всеки калибратор, контрола или аликвотна част в дъното на съответната микроепруветка за хибридизация в съответствие с използваната конфигурация на плаката. Ако аликвотните части ще се оставят на съхранение, затворете денатурираните калибратори, контроли и аликвотни части в STM с нови завиващи се капачки за епруветки за взимане на проби и поставете оригиналната капачка за всяка от аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath.

Забележка: Съхранявайте аликвотните части при условията, посочени в „Избирателен престой на подготвени аликвотни части в STM и ръчно подготвени аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в PreservCyt и SurePath“ на страница 47.

4. След като прехвърлите последната аликвотна част, инкубирайте микроепруветките за хибридизация 10 минути при 20–25 °C.
5. Разбъркайте добре сместа за сондата на вортекса и отделете аликвотна част в резервоар за реактив за еднократна употреба.
6. Внимателно пипетирайте 25 µl от сместа за сондата във всяка микроепруветка за хибридизация с 8-канална пипета и нови връхчета за всеки ред.
Внимавайте да не изплискате течност и да не докоснете страните на микроепруветките за хибридизация.
Огледайте статива отдолу, за да се уверите, че всички микроепруветки за хибридизация са получили точното количество смес за сондата.
7. Покрийте микроепруветките за хибридизация с фолио за запечатване на плака.
Затворете статива с капака. Разбъркайте статива за микроепруветки 3 ± 2 минути на Rotary Shaker I, настроен на 1100 ± 100 оборота в минута.
След разбъркването на шейкъра калибраторите, контролите, аликвотните части в STM и аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath трябва да пожълтеят, а аликвотните части в PreservCyt трябва да порозовеят.
Аликвотни части, които остават лилави, може да не са получили правилното количество смес за сондата. Прибавете още 25 µl смес за сондата в останалите лилави аликвотни части и разбъркайте отново на шейкъра. Ако аликвотна част остане лилава след тази процедура, тествайте повторно пробата.
8. Инкубирайте статива за микроепруветки 60 ± 5 минути във водна баня на 65 ± 2 °C.
Нивото на водата във водната баня трябва да бъде достатъчно, за да покрие целия обем на микроепруветките за хибридизация.
Забележка: Стативът за микроепруветки ще плава във водната баня.
9. Преминете на „Улавяне на хибриди“, за да продължите тестването.

Улавяне на хибриди

1. Извадете всички освен необходимия брой ямки на микроплаката за улавяне от рамката на плаката.
2. Върнете неизползваните ямки на микроплаката за улавяне в оригиналния плик и го запечатайте.
3. С маркер номерирайте последователно всяка колона и надпишете микроплаката за улавяне с подходящ идентификатор.
Аликвотните части ще се прибавят в ямките на микроплаката за улавяне в съответствие с използваната конфигурация на плаката.

4. Ако е необходимо, внимателно извадете микроплаката за хибридизация от Microplate Heater I или статива за микроепруветки от водната баня.

Свалете незабавно капака на микроплаката и го поставете на чиста повърхност или свалете капака на статива и изтеглете бавно фолиото за запечатване нагоре и настрани от статива за микроепруветки.

5. С 8-канална пипета прехвърлете цялото съдържание (около 100 μ l) на ямките на микроплаката за хибридизация или микроепруветките за хибридизация в дъното на съответните ямки на микроплаката за улавяне.

Използвайте нови връшчета за пипети за всяко прехвърляне и оставете всяко връшче да се изпразни докрай, за да се прехвърли точното количество аликвотна част. Ако желаете, можете да стабилизирате пипетата, като опрете средата на връшчето в горния ръб на ямките на микроплаката за улавяне (вижте Фигура 2 отдолу).



Фигура 2. Правилно пипетиране.

6. Покрийте микроплаката за улавяне с капака за микроплака или ново фолио за запечатване на плака и разбъркайте 60 ± 5 минути на Rotary Shaker I на 1100 ± 100 оборота в минута при $20\text{--}25$ °C.
Пригответе буфера за промиване по време на тази инкубация (вижте „Буфер за промиване“ на страница 35).
7. Когато инкубацията приключи, извадете микроплаката за улавяне от Rotary Shaker I и внимателно свалете капака или фолиото за запечатване на микроплаката.
8. Изхвърлете течността от ямките на микроплаката за улавяне в мивката; обърнете напълно микроплаката за улавяне над мивката и я разтръскайте добре с вертикално движение.

Важно: Не обръщайте отново микроплаката след това.

Не изливайте много близко до дъното на мивката, за да не полепнат обратно пръски от течността.

9. Попийте с плътно притискане 2–3 пъти върху чисти кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички.

Цялата течност трябва да бъде отстранена от ямките на микроплаката за улавяне и горната част на микроплаката за улавяне трябва да бъде суха.

10. Преминете на „Откриване на хибриди“, за да продължите тестването.

Откриване на хибриди

- Прибавете всички необходими реактиви в микроплаката за улавяне отляво-надясно с 8-канална пипета. Избършете връхчетата в резервоара за реактив за еднократна употреба, за да отстраните излишния реактив преди накапването в микроплаката.
 - Ако не се използва 8-канална пипета, тя може да се замести с пипета с многократно действие. Отделете аликвотна част DR1 в полипропиленова епруветка с достатъчен размер за побиране на необходимия обем.
 - Препоръчително е да се използва техниката за обратно пипетиране, за да се подобри накапването на еднакво количество реактив. Процедурата е описана по-долу.
 - Ако желаете, можете да стабилизирате пипетата, като опрете средата на връхчето в горния ръб на ямките на микроплаката за улавяне. Внимавайте да не докоснете страните на ямките на микроплаката за улавяне, за да предотвратите кръстосано замърсяване на аликвотните части (вижте Фигура 2 на страница 52).
1. Разбъркайте добре DR1 и прехвърлете внимателно съответния обем (вижте съответно Таблица 1 на страница 31 или Таблица 4 на страница 32) в чист резервоар за реактив за еднократна употреба.
 2. Внимателно пипетирайте 75 µl DR1 във всяка ямка на микроплаката за улавяне по техниката за обратно пипетиране, както следва:
 - a) Закрепете връхчета на 8-канална пипета; всички връхчета трябва да бъдат закрепени здраво.
 - b) Натиснете буталото на пипетата надолу от първото до второто междинно положение.
 - c) Потопете връхчетата в реактива.
 - d) Пуснете бавно буталото и оставете реактива да запълни връхчетата.
 - e) Накапете реактива в ямките на микроплаката с натискане на буталото до първото междинно положение. Не пускайте буталото, докато връхчетата за пипети не се потопят в реактива.
 - f) Напълнете отново връхчетата и повторете, докато всички ямки на микроплаката се напълнят.

Проверете дали всички ямки на микроплаката за улавяне са напълнени, като наблюдавате наситеността на розовия цвят. Всички ямки на микроплаката за улавяне трябва да бъдат еднакво розови.

3. Покрийте микроплаката за улавяне с капак за микроплака, чисто фолио Parafilm или еквивалентно и инкубирайте 30–45 минути при 20–25 °C.
4. Преминете на „Промиване“, за да продължите тестването.

Промиване

Промийте микроплаката за улавяне по един от следващите методи.

Метод с Automated Plate Washer

Automated Plate Washer трябва да бъде постоянно включен. Резервоарът за изплакване трябва да бъде пълен, а резервоарът за отпадъци трябва да бъде празен. Automated Plate Washer ще изплаква редовно системата, за да я почисти. В *ръководството за потребителя на Automated Plate Washer* ще намерите допълнителни инструкции.

- Резервоарът за промиване трябва да бъде пълен с буфер за промиване поне до делението за 1 литър. Ако не е, пригответе буфера за промиване (вижте „Буфер за промиване“ на страница 35).
 - Резервоарът за изплакване трябва да бъде пълен с дейонизирана или дестилирана вода.
 - Резервоарът за отпадъци трябва да бъде празен със здраво затворена капачка.
 - Automated Plate Washer ще се запълва автоматично преди всяко промиване и ще се изплаква след всяко промиване.
 - Ако е била използвана само част от ямките на микроплаката за улавяне, поставете празните ямки в микроплаката за улавяне, за да попълните колоната преди промиването.
1. Свалете капака на микроплаката и поставете микроплаката за улавяне на платформата на Automated Plate Washer.
 2. Automated Plate Washer трябва да бъде включен и на дисплея трябва да пише **Digene Wash Ready** (Готов за промиване на digene) или **P1**.
 3. Изберете броя ленти за промиване с натискане на бутона **Rows** (Редове) – можете да коригирате стойността с + или –.
 4. Натиснете бутона **Rows** (Редове), за да се върнете на **Digene Wash Ready** (Готов за промиване на digene) или **P1**.

5. Натиснете бутона **Start/Stop** (Старт/стоп) за започване.

Automated Plate Washer ще извърши 6 цикъла запълване-аспириране, което ще продължи около 10 минути. По време на програмата ще има кратка пауза; не изваждайте микроплаката преждевременно.

Когато Automated Plate Washer е приключил промиването, на дисплея ще пише **Digene Wash Ready** (Готов за промиване на digene) или **P1**.

6. Извадете микроплаката за улавяне от платформата на Automated Plate Washer, когато програмата приключи.

Микроплаката за улавяне трябва да бъде бяла, без остатъчна розова течност в ямките.

7. Преминете на „Ампликация на сигнала“ на страница 57, за да продължите тестването.

Метод за ръчно промиване

1. Почистете DR1 от ямките, като поставите чисти кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички върху микроплаката за улавяне.
2. Хартиените кърпички трябва да бъдат в контакт с цялата повърхностна площ на микроплаката за улавяне. След това обърнете внимателно микроплаката.
3. Оставете микроплаката за улавяне да изтича 1–2 минути.
4. Попийте добре с чисти кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички.

Внимателно изхвърлете използваните хартиени кърпички, за да предотвратите замърсяване с алкална фосфатаза.

5. Използвайте апаратурата за промиване, за да промиете ръчно микроплаката за улавяне 6 пъти.

За да се промие добре, всяка ямка на микроплаката за улавяне трябва да се препълни с буфер за промиване. Така ще се измие DR1 от горните части на ямките на микроплаката за улавяне. Промиването започва от ямка A1 на микроплаката за улавяне и продължава зигзагообразно надясно и надолу. След като всички ямки на микроплаката за улавяне бъдат запълнени, излейте течността в мивката с енергично вертикално движение. Второто промиване започва от ямка H12 на микроплаката за улавяне и продължава зигзагообразно наляво и нагоре. Този последователност от 2 промивания се повтаря още 2 пъти за общо 6 промивания на всяка ямка на микроплаката за улавяне.

-
6. След промиването поийте микроплаката за улавяне, като я обърнете върху чисти кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички и я притиснете плътно 3–4 пъти. Сменете хартиените кърпички и поийте отново.
 7. Оставете микроплаката за улавяне обърната и я оставете да изтича 5 минути. Поийте микроплаката за улавяне още веднъж.
Микроплаката за улавяне трябва да бъде бяла, без остатъчна розова течност в ямките.
 8. Преминете на „Амплификация на сигнала“ на страница 57, за да продължите тестването.

Амплификация на сигнала

- Използвайте нов чифт ръкавици за боравенето с DR2.
 - Прибавете всички необходими реактиви в микроплаката за улавяне отляво-надясно с 8-канална пипета.
 - Ако не се използва 8-канална пипета, тя може да се замени с пипета с многократно действие. Отделете аликвотна част DR2 в полипропиленова епруветка с достатъчен размер за побиране на необходимия обем.
 - Прибавете DR2 без прекъсване. Разликата във времето за инкубация на всички ямки на микроплаката за улавяне трябва да бъде възможно най-малка.
 - Внимавайте да не докоснете страните на ямките на микроплаката за улавяне и да не пръснете реактив върху връхчетата, за да предотвратите кръстосано замърсяване на пробите (вижте Фигура 2 на страница 52).
1. Разбъркайте добре DR2 и прехвърлете съответния обем (ако е необходимо, вижте Таблица 1 на страница 31 или Таблица 4 на страница 32) в чист резервоар за реактив за еднократна употреба.
 2. Внимателно пипетирайте 75 µl DR2 във всяка ямка на микроплаката за улавяне по техниката за обратно пипетиране, описана по-горе (вижте „Откриване на хибриди“ на страница 53).

Проверете дали всички ямки на микроплаката за улавяне са напълнени, като наблюдавате наситеността на жълтия цвят; всички ямки на микроплаката за улавяне трябва да бъдат еднакво жълти.
 3. Покрийте микроплаката за улавяне с капак за микроплака и инкубирайте при 20–25 °C 15 минути (инкубацията не трябва да продължава повече от 30 минути).

Важно: Избягвайте излагане на пряка слънчева светлина.
 4. Преминете на „Измерване на микроплаката за улавяне и генериране на резултати“, за да продължите тестването.

Измерване на микроплаката за улавяне и генериране на резултати

1. Измерете микроплаката за улавяне с апарат DML.

В съответното ръководство за потребителя на софтуера ще намерите подробна информация за измерването на микроплака за улавяне и генериране на фишове с резултатите от теста. Аналитичният софтуер за анализи *digene* позволява въвеждане на необходимата информация за теста.

2. Ако не е използвана пълна микроплака за улавяне, извадете използваните ямки на микроплаката за улавяне от рамката на микроплаката, изплакнете добре рамката на микроплаката с дестилирана или дейонизирана вода, изсушете я и я запазете за следващия тест.

3. Изхвърлете всички аликвотни части от реактиви и приготвени реактиви, ако не е посочено друго.

Разредете останалия DNR в шишето, преди да го изхвърлите по националните и вътрешнолабораторните процедури.

Интерпретиране на резултатите

Стойността CO на анализа *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 1 pg/ml е еквивалентна 100 000 копия HPV/ml или 5000 копия HPV на един анализ.

Резултати от тестване на проби в STM

Проби в STM със стойност RLU/CO $\geq 1,0$ се считат за „положителни“ за 1 или повече типове HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68.

Проби в STM със стойност RLU/CO $< 1,0$ се считат за „отрицателни“ или „не е открита ДНК на HPV“ за 13-те тествани типа HPV. Секвенции от ДНК на високорискови HPV липсват или нивата на ДНК на HPV са под границата на откриване на теста.

Резултати от тестване на проби в SurePath

Проби в SurePath със стойност RLU/CO $\geq 1,0$ се считат за „положителни“ за 1 или повече типове HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68.

Проби в SurePath със стойност RLU/CO $< 1,0$ се считат за „отрицателни“ или „не е открита ДНК на HPV“ за 13-те тествани типа HPV. Секвенции от ДНК на HPV липсват или нивата на ДНК на HPV са под границата на откриване на теста.

Резултати от тестване на проби в PreservCyt

Проби в PreservCyt със стойност RLU/CO $\geq 1,0$ се считат за „положителни“ за 1 или повече типове HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68.

Проби в PreservCyt със стойност RLU/CO $< 1,0$ се считат за „отрицателни“ или „не е открита ДНК на HPV“ за 13-те тествани типа HPV. Секвенции от ДНК на HPV липсват или нивата на ДНК на HPV са под границата на откриване на теста.

За проби в PreservCyt със стойност RLU/CO $\geq 1,0$ и $< 2,5$ QIAGEN препоръчва повторно тестване на пробата, както следва:

- Ако при първото повторно тестване RLU/CO $\geq 1,0$, пробата се съобщава като „положителна“. Друго тестване не е необходимо.
- Ако при първото повторно тестване RLU/CO $< 1,0$, е необходимо второ повторно тестване (трети резултат). Вторият резултат е окончателният (при $< 1,0$ е отрицателен, при $\geq 1,0$ е положителен) и се съобщава.

Стойност RLU/CO близка до 1,0

Ако RLU/CO на дадена проба е малко под 1,0 и има предполагаема инфекция с високорискови HPV, може да е добре да се използват други методи на тестване и/или пробата да се тества повторно.

Други типове HPV

Тъй като този анализ открива само високорискови типове HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68, имайте предвид, че в пробата може да има други, нискорискови типове HPV. Ако тествате конкретно за предавани по полов път нискорискови HPV, използвайте *digene* HC2 HPV DNA Test, който открива ДНК на нискорискови и високорискови типове HPV.

Проверка на калибрирането на анализа

Проверката на калибрирането на анализа се извършва, за да бъде сигурно, че реактивите, калибраторите и контролите функционират правилно и позволяват точно определяне на стойността CO на анализа. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test изисква калибриране на анализа с всеки тест; затова всеки анализ трябва да се проверява. Тази процедура за проверка не замества тестването за вътрешнолабораторен контрол на качеството. Допустимите диапазони за калибриране на анализа и контролите са установени само за апарати DML, одобрени от QIAGEN.

Калибрирането на анализа се извършва автоматично от аналитичния софтуер за анализи *digene* и се отпечатва на фиша с анализа на данните. Потребителите, които използват *digene* Qualitative Software версия 1.03 или по-стара, обаче трябва да извършват ръчна проверка на калибрирането на анализа, преди да могат да съобщават пациентски резултати. Обърнете се към „Техническо обслужване“ на QIAGEN за повече информация.

Тестът трябва да изпълнява посочените критерии за калибриране на анализа. Ако някой от следващите критерии не е изпълнен, софтуерът няма да интерпретира резултатите за пробата.

Отрицателен калибратор

NC трябва да се тества на три репликата с всеки тест. Средната стойност на NC трябва да бъде ≥ 10 и ≤ 250 RLU, а коефициентът на вариация (Coefficient of Variation, CV) трябва да бъде $\leq 25\%$. Ако CV е $> 25\%$, софтуерът изважда най-отдалечената от средната стойност на RLU като аномалия и преизчислява средната и CV с останалите стойности.

Ако CV продължава да бъде > 25%, калибрирането на анализа е невалидно и тестът трябва да се повтори за всички пациентски проби. Съответно резултатите за пациентските проби не трябва да се съобщават.

Положителен калибратор

HRC трябва да се тества на три репликата с всеки тест. CV на HRC трябва да бъде $\leq 15\%$. Ако CV е > 15%, софтуерът изважда най-отдалечената от средната стойност на RLU като аномалия и преизчислява средната и CV с останалите стойности.

Ако CV продължава да бъде > 15%, калибрирането на анализа е невалидно и тестът трябва да се повтори за всички пациентски проби. Съответно резултатите за пациентските проби не трябва да се съобщават.

Средната стойност на положителния калибратор/средната стойност на отрицателния калибратор

Софтуерът използва $HRC\bar{X}$ и $NC\bar{X}$, за да изчисли $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Валидно съотношение $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ се дефинира като $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$. Ако $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ е < 2,0 или > 15, калибрирането на анализа е невалидно и тестът трябва да се повтори за всички пациентски проби. Съответно резултатите за пациентските проби не трябва да се съобщават.

Изчисляване на стойността cut-off

Аналитичният софтуер за анализи *digene* изчислява и съобщава RLU/CO и положителни/отрицателни резултати за всички проби. Стойността CO за определяне на положителни проби е $HRC\bar{X}$. Аналитичният софтуер за анализи *digene* използва стойностите на RLU за пробите, за да изрази резултатите като RLU/CO за пробите.

За автоматизирано тестване с RCS протоколът за анализа за HPV на RCS прилага коефициент за корекция на калибрирането (Calibration Adjustment Factor, CAF) 0,8 към валидната стойност на $HRC\bar{X}$. Този CAF е необходим, за да могат работните характеристики на автоматизираното тестване с RCS да остават еквивалентни на тези на ръчното тестване. CAF се прилага само за резултати от автоматизирано тестване с RCS; затова е задължително да се избере точният протокол за анализа, за да се генерират точни резултати от теста.

Контроли

Аликвотни части за контролите се доставят с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test и трябва да се използват за вътрешнолабораторен контрол на качеството. Доставените контроли са прицелни ДНК на клонирани HPV, а не са получени от некултивирани HPV. Това е същият вид материал като използвания за доставените калибратори. Допълнителни контроли може да се тестват по указанията или изискванията на национални или местни разпоредби или акредитирани организации. Доставените контроли не са подходящи за контрола на обработката на PreservCyt Solution или SurePath Preservative Fluid.

В съответното ръководство за потребителя на аналитичния софтуер за анализи *digene* ще намерите инструкции за въвеждането на номерата на партидите и сроковете на годност на контролите. За да бъде един анализ валиден, RLU/CO на всяка контрола трябва да отговаря на определените критерии, както е посочено в Таблица 10 по-долу. Ако контролите не са в тези диапазони, анализът е невалиден и тестът трябва да се повтори. Съответно резултатите за пациентите не трябва да се съобщават.

Таблица 10. Контроли и критерии за валидност на анализа

Контрола	Минимална RLU/CO	Максимална RLU/CO	CV (%)
QC1-LR	0,001	0,999	≤ 25
QC2-HR	2	8	≤ 25

Ограничения

- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за HPV тип 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68 не се препоръчва за съдебно-медицински експертизи за предполагаемо изнасилване.
- Преваленсът на HPV инфекция в даден пациентски контингент може да се отрази на работните характеристики. Прогнозните стойности за положителните резултати намаляват, когато се тестват контингенти с нисък преваленс или лица, които не са изложени на риск от инфекция.
- Отрицателен резултат от теста не изключва възможността за HPV инфекция, защото много ниски нива на инфекция или грешка при взимането на пробата могат да предизвикат грешен отрицателен резултат от теста. Също така този тест не открива ДНК на нискорискови типове HPV (6, 11, 42, 43 и 44).
- Инфекция с HPV не е категоричен индикатор за наличието на високостепенно заболяване на маточната шийка и също така не предполага във всички случаи, че ще се развие високостепенно заболяване или карцином на маточната шийка.
- Наблюдава се малко кръстосана хибридизация между сондата за високорискови HPV и HPV тип 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 и MM9. Пациенти, чиито проби съдържат високи нива от тези типове HPV, е възможно погрешно да получат направление за колпоскопия (15, 35).
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test е предназначен за откриване на високорискови типове HPV, включително 39, 58, 59 и 68. На проведени от QIAGEN аналитични проучвания с ДНК от плазмид на клонирани HPV е демонстрирано, че тестът открива тези типове при концентрации от 0,62 pg/ml до 1,39 pg/ml. Тези характеристики са еквивалентни на характеристиките на откриването на другите прицелни типове HPV с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIAGEN успява да валидира откриването на тези типове HPV само в ограничен брой клинични проби. Поради ниския преваленс на тези типове в общото население (28) работните характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за откриването на HPV тип 39, 58, 59 и 68 не са статистически потвърдени.
- При наличие на високи концентрации на противогъбичен крем, противозачатъчен гел или дамски душ в момента на взимането на проба в STM за тестване, има вероятност да се получи грешен отрицателен резултат, ако пробата съдържа нива на ДНК на HPV, които дават стойности RLU/CO, близки до стойността CO на анализа.

- При наличие на високи концентрации на противогъбичен крем, вагинален лубрикант или кръв в момента на взимането на цервикална проба в PreservCyt за подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit, има вероятност да се получи грешен отрицателен резултат, ако пробата съдържа нива на ДНК на HPV, които дават стойности RLU/CO, близки до стойността CO на анализа.
- При наличие на противозачатъчен гел в момента на взимането на цервикална проба в PreservCyt за подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, може да се получи грешен отрицателен резултат от теста.
- При наличие на противозачатъчен гел, противогъбичен крем или противовъзпалителен крем в момента на взимането на цервикална проба в SurePath за подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit, може да се получи грешен отрицателен резултат от теста.
- Възможно е да има кръстосана реактивност между сондата за високорискови HPV и плазмид рBR322. Има сведения за човешки генитални проби с хомологични на рBR322 секвенции и затова могат да се получат грешни положителни резултати при наличие на високи нива на бактериални плазмиди.
- При автоматизирано тестване с RCS, ако правилното прехвърляне на пробите в плаката за хибридизация не се проверява визуално и не се коригира евентуално неправилно прехвърляне на пробите, може да се получат грешни отрицателни резултати.

Работни характеристики

Клинични работни характеристики при скрининг на пациенти с нормални резултати от цитонамазка, когато тестът се използва като помощно средство за оценка на риска при определянето на лечение

Резултатите от 8 независими клинични проучвания, проведени от авторитетни медицински, академични и държавни учреждения в центрове в Съединените щати и чужбина са описани по-долу. На проучванията са използвани утвърдените методи за цитонамазка в страните, в които са провеждани. С изключение на 2 случая, навсякъде е използвана класификацията Бетесда (Bethesda Grading System) за интерпретирането на резултатите от цитонамазката. Информация за еквивалентната терминология за скрининг за цервикален карцином в Европейската общност ще намерите в „Европейските указания за осигуряване на качеството на скрининг за цервикален карцином“ (36). Допълнително е направена диагностика за високостепенно заболяване на маточната шийка с биопсия под колпоскопски контрол за всяко проучване. На тези проучвания е оценена клиничната полезност на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test в сравнение с цитонамазката за възрастни жени (в общия случай по-възрастни от 30 години). С изключение на едно проучване, на всички останали е извършено и прогностично тестване за HPV с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Всички проучвания са скринингови, представителни за общото население с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, ако по-долу не е посочено друго. Две от проучванията са проведени в Съединените щати, 2 в Европа, 2 в Латинска Америка, едно в Африка и едно в Азия.

Работните характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, наблюдавани на 6 представителни проучвания, са обобщени (вижте таблица 11 и 12 по-долу) за жени на възраст 30 и повече години с хистологично потвърдена диагноза високостепенна цервикална неоплазия, която се дефинира като цервикална интраепителна неоплазия (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) от трета (CIN 3) или по-висока степен.

Таблица 11. Оценка на работните характеристики – чувствителност и специфичност

Контингент	n	Чувствителност (%)			Специфичност (%)		
		(n/N)			(n/N)		
		95% доверителен интервал (ДИ)			95% ДИ		
		Само цитонамазка	Само HPV	HPV + цитонамазка	Само цитонамазка	Само HPV	HPV + цитонамазка
Западна Европа 1	7592	51,6 (14/27) 32,0–71,3	96,3 (26/27) 81,0–99,9	100,0 (27/27) 87,2–100,0	98,5 (7453/7565) 98,2–98,8	96,2 (7275/7565) 95,7–96,6	95,1 (7193/7565) 94,6–95,6
Латинска Америка 1	6115	58,4 (45/77) 46,68–69,6	94,8 (73/77) 87,2–98,6	97,4 (75/77) 90,9–99,7	98,7 (5962/6038) 98,4–99,0	93,9 (5669/6038) 93,3–94,5	93,4 (5637/6038) 92,7–94,0
Латинска Америка 2*	6176	77,9 (53/68) 66,2–87,1	89,7 (61/68) 79,9–95,8	94,1 (64/68) 85,6–98,4	94,1 (5745/6108) 93,4–94,6	94,0 (5742/6108) 93,4–94,6	89,9 (5490/6108) 89,1–90,6
Африка	2925	84,1 (90/107) 75,8–90,5	89,7 (96/107) 82,4–94,8	92,5 (99/107) 85,8–96,7	86,4 (2436/2818) 85,1–87,7	80,0 (2253/2818) 78,4–81,4	76,4 (2152/2818) 74,8–77,9
Азия	1936	97,6 (41/42) 87,4–99,9	100,0 (42/42) 91,6–100,0	100,0 (42/42) 91,6–100,0	76,3 (1445/1894) 74,3–78,2	83,0 (1572/1894) 81,2–85,0	68,0 (1287/1894) 65,8–70,1
САЩ 1	1040	50,0 (1/2) 1,26–98,7	100,0 (2/2) 15,8–100,0	100,0 (2/2) 15,8–100,0	97,6 (1013/1038) 96,5–98,4	96,2 (999/1038) 94,9–97,3	95,5 (991/1038) 94,0–96,7

* Данни от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, където има такива – в противен случай са използвани данни от HCS; данните са комбинирани.

Таблица 12. Оценка на работните характеристики – прогнозни стойности за положителни и отрицателни резултати

Контингент	n	Преваленс	Прогнозна стойност за положителни резултати (%)			Прогнозна стойност за отрицателни резултати (%)		
		CIN 3 (%) (n/N) 95% ДИ	Само цитонамазка	Само HPV	HPV + цитонамазка	Само цитона- мазка	Само HPV	HPV + цитона- мазка
Западна Европа 1	7592	0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)
		0,23–0,52	6,2–17,9	5,5–11,8	4,5–9,7	99,7–99,9	99,9–100,0	99,9–100,0
Латинска Америка 1	6115	1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		0,99–1,57	28,6–46,4	13,2–20,3	12,6–19,4	99,3–99,6	99,8–100,0	99,9–100,0
Латинска Америка 2*	6176	1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)
		0,86–1,39	9,7–16,3	11,1–18,0	7,3–11,8	99,6–99,9	99,8–100,0	99,8–100,0
Африка	2925	3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)
		3,01–4,40	15,6–22,9	11,9–17,4	10,6–15,5	98,9–99,6	99,1–99,8	99,3–99,8
Азия	1936	2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)
		1,57–2,92	6,1–11,2	8,4–15,3	4,7–8,7	99,6–100,0	99,8–100,0	99,7–100,0
САЩ 1	1040	0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		0,02–0,69	0,1–19,6	0,6–16,5	0,5–14,0	99,5–100,0	99,6–100,0	99,6–100,0

* Данни от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, където има такива – в противен случай са използвани данни от HCS; данните са комбинирани.

На всички проучвания се наблюдава последователно и често много съществено подобрение на чувствителността при използване на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test спрямо тази при използване само на цитонамазка. Също като при чувствителността, прогнозната стойност за отрицателните резултати за HPV е по-висока от тази при използване само на цитонамазка във всички случаи, като се доближава до 100%. Тази прогнозна стойност за отрицателните резултати демонстрира голяма вероятност за отсъствие на високостепенно заболяване на маточната шийка или карцином при жени с нормална цитология без HPV инфекция.

Въпреки че специфичността на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test е по-ниска от тази при използването само на цитонамазка, анализ на вероятностното съотношение демонстрира, че наблюдаваното понижаване на специфичността не е достатъчно значимо, за да се отрази на клиничната полезност на използването на теста за идентифициране на жени с малък или без риск от развитие на заболяване на маточната шийка. Независимо от това, е важно решението за направление на пациента за колпоскопия да се основава на пълната информация от клиничните изследвания,

оценката на риска и епикризата, с която лекарят разполага. Важни променливи например са предишните случаи на HPV инфекция и/или абнормна цитонамазка, възрастта при първото полово сношение, броят на сексуалните партньори и съпътстващите предавани по полов път заболявания (37, 38).

Въпреки че преваленсът на високостепенно заболяване не се различава значително при различните проучвания за определянето на работните характеристики, преваленсът на HPV инфекция в населението може да се отрази на работните характеристики и обикновено се различава при различните пациентски контингенти. Освен това е известно, че преваленсът на HPV инфекция намалява рязко с възрастта (17, 24–29, 38–40). Прогнозните стойности за положителните резултати намаляват, когато се тестват контингенти с нисък преваленс или лица, които са изложени на малък риск от инфекция.

Времени анализ е извършен с резултатите от 2 проучвания; едното – проведено в Съединените щати от Националния институт по раковите заболявания (National Cancer Institute, NCI) в Портланд, Орегон, а другото – във Франция от Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims. Тези временни анализи са предприети, за да се демонстрира, че пациентите с отрицателна цитонамазка/отрицателен тест за HPV са изложени на по-малък от риск от заболяване на маточната шийка в сравнение с традиционно дефинираните нискорискови жени с неизвестен HPV статус и в сравнение с пациентите с отрицателна цитонамазка/положителен тест за HPV (вижте таблица 13 и 14 по-долу).

Таблица 13. Времени анализ – относителен риск от високостепенно заболяване

Проучена група	Възраст	Нискорискова класификация	n	Случаи на CIN 3	Честота (на 100 пациент-години)	Относителен риск (95% ДИ)
NCI	30 и повече години	Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	12 054	28	0,043	0,897 (0,596–1,348)
		Последователни нормални цитонамазки*	9429	19	0,048	1,000
	Всички	Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	17 594	48	0,056	0,678 (0,514–0,894)
		Последователни нормални цитонамазки*	13 392	44	0,082	1,000
Франция	30 и повече години	Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	1690	3	0,084	0,849 (0,307–2,35)
		Последователни нормални цитонамазки†	2026	4	0,099	1,000
	Всички	Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	2180	3	0,066	0,491 (0,221–1,09)
		Последователни нормални цитонамазки†	2650	7	0,136	1,000

*Три нормални цитонамазки за период от около 2 години.

† Две нормални цитонамазки за период от около 2 години.

Таблица 14. Времени анализ – заболяемост по начален HPV статус

Проучена група	Възраст	Начален статус	n	Случаи на CIN 3	Честота (на 100 пациент-години)	Относителен риск (95% ДИ)
NCI	30 и повече години	Нормална цитонамазка, положителен тест за HPV	1078	24	0,451	10,50 (6,13–18,0)
		Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	12 054	28	0,043	1,00
	Всички	Нормална цитонамазка, положителен тест за HPV	2561	63	0,096	10,64 (7,33–15,5)
		Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	17 594	48	0,056	1,00
Франция	30 и повече години	Нормална цитонамазка, положителен тест за HPV	419	14	2,346	27,3 (8,41–88,3)
		Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	1696	3	0,084	1,00
	Всички	Нормална цитонамазка, положителен тест за HPV	619	22	2,520	37,0 (11,8–116)
		Нормална цитонамазка, отрицателен тест за HPV	2180	3	0,066	1,00

Клиничната полезност на резултата от теста за HPV се демонстрира допълнително от повишения риск от заболяване на маточната шийка при HPV-положителните жени в сравнение с HPV-отрицателните жени.

Клинични работни характеристики при скрининг на пациенти с резултати с ASC-US от цитонамазка за определяне на необходимостта от направление за колпоскопия

Проучване, озаглавено „Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears (Ползност на тестването за ДНК на HPV при категоризиране на жени с гранични резултати от цитонамазка)“, е проведено в САЩ през 1996 г. под контрола на Kaiser Foundation Research Institute и Kaiser Permanente Medical Group. Цервикални проби за рутинно тестване с цитонамазка и *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test са взети от жени, посещаващи няколко клинични центъра на Kaiser. Началните цитонамазки са оценени по класификацията Бетесда. Информация за еквивалентната терминология за скрининг за цервикален карцином в Европейската общност ще намерите в „Европейските указания за осигуряване на качеството на скрининг за цервикален карцином“ (36). Жени (на 15 или повече години) с резултати от цитонамазка с атипични сквамозни клетки с неопределено значение (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) се връщат за колпоскопия и биопсия. Взетите под колпоскопски контрол хистологични проби са изследвани от патолози и е поставена начална диагноза. Всяка хистологична проба е проверена допълнително от независим патолог и несъответствията между началното и независимото заключение са арбитрирани от трети патолог.

Началната проба е тествана с прототип на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, съдържащ сонди за 11 от 13-те типа HPV (без типове HPV 59 и 68). Тази разлика не би следвало да промени съществено профила на работните характеристики на теста.

Получени са резултати от тестовете за ДНК на високорискови HPV и хистологични диагнози от 885 жени с цитонамазки с ASC-US. Тестването на повечето пациенти е извършено с проби, взети както в STM, така и в PreservCyt Solution. Поради сходството на работните характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test при STM и PreservCyt Solution, са представени работните характеристики на анализа само за PreservCyt Solution.

При случаите с цитонамазка с ASC-US прогнозната стойност за отрицателните резултати на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за HSIL или по-тежко заболяване при колпоскопия е 99% (вижте Таблица 15 по-долу).

Таблица 15. Сравнение на резултатите от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test с хистологичния консенсус; контингент с цитонамазка с ASC-US; проучване на Kaiser, проби в PreservCyt

		HSIL или по-тежко заболяване към момента на колпоскопията		Общо
		+	-	
Резултат от <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	66	317	383
	-	5	497	502
Общо		71	814	885

Чувствителност [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)
 95% ДИ = 84,3–97,7
 Специфичност [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)
 95% ДИ = 57,7–64,4
 Преваленс на заболяването = 8,0% (71/885)
 Прогнозна стойност за положителните резултати от анализа = 17,2% (66/383)
 Прогнозна стойност за отрицателните резултати от анализа = 99,0% (497/502)

Определени са теоретичните прогнозни стойности за положителните и отрицателните резултати при различните преваленси за начални ASC-US с констатирани HSIL или по-тежки заболявания въз основа на резултатите от теста за високорискови HPV (вижте Таблица 16 по-долу).

Таблица 16. Теоретична прогнозна стойност за положителните и отрицателните резултати от тестването за високорискови HPV при резултати от цитонамазка с ASC-US

Теоретичен преваленс за HSIL	Начален резултат от цитонамазка с ASC-US	
	Прогнозна стойност за положителните резултати от анализа	Прогнозна стойност за отрицателните резултати от анализа
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

Определена е вариацията между различните възрастови групи в това проучване (вижте Таблица 17 по-долу).

Таблица 17. Данни от проучването на Kaiser: Работни характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test спрямо резултатите от хистологичния консенсус (HSIL) – по възрастова група

	Възраст < 30	Възраст 30–39	Възраст > 39
n	287	233	365
Преваленс на заболяването (%)	12,2	11,2	2,7
Чувствителност (%)	100	88,46	80,0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95% ДИ	90,0–100,0	69,9–97,6	44,4–97,5
Специфичност (%)	31,4	66,2	79,15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95% ДИ	25,7–37,5	59,3–72,6	74,6–83,3
Прогнозна стойност за отрицателни резултати (%)	100,0	97,86	99,29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Прогнозна стойност за положителни резултати (%)	16,83	24,73	9,76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Клинична чувствителност и специфичност за определянето на риска от високостепенно заболяване при жени с цитонамазки с LSIL или HSIL

Клинично проучване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test в различни центрове е проведено с проби, взети от няколко големи клиники за колпоскопия в болници и медицински центрове с висок преваленс на заболяване на маточната шийка и HPV (3 центъра) в западните и южните Съединени щати. Тестването за HPV е извършено в 3 проучвателни центъра, които не са свързани с клиниките за колпоскопия, от които са взети пробите. Контингентът за това клинично проучване включва жени с диагноза LSIL или HSIL от взета наскоро цитонамазка с направление за контролна колпоскопия. От общо 702 пациенти в проучването, 327 имат резултати от цитонамазка с по-тежко от ASC-US заболяване и достатъчно налична информация; 96 от тях имат окончателна диагноза HSIL или по-тежко заболяване.

Проби от ексфолирани цервикални клетки са взети с *digene* HC2 DNA Collection Device и поставени след това в STM или с изделие с метличка, изплакнато след това в PreservCyt Solution. Пробите са взети към момента на колпоскопията. Пробите са тествани с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test и резултатите са сравнени с окончателната диагноза, поставена за всеки пациент. Окончателната диагноза е поставена според резултатите от хистологичната оценка. При отрицателен или липсващ хистологичен резултат обаче диагнозата е определена според цитологичния резултат към момента на колпоскопията (вижте Таблица 18 по-долу).

Тестването с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test е извършено в 3 големи градски медицински центъра, които не са свързани с центровете, взели пробите при колпоскопията. Цитологичното изследване е извършено в референтна патологична лаборатория, а хистологичното – в центровете, извършващи колпоскопията. Резултатите от теста са сравнени с диагнозата, за да се оценят чувствителността, специфичността и прогнозната стойност за отрицателните и положителните резултати за откриване на високостепенна цервикална неоплазия. Поради сходството на работните характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test при STM и PreservCyt Solution, работните характеристики на анализа са представени само за PreservCyt Solution. Не се наблюдава разлика при резултатите от тестването за високорискови HPV от проби в STM и проби в PreservCyt.

Таблица 18. Алгоритъм за поставяне на окончателна диагноза

Цитологичен резултат	Хистологичен резултат	Окончателна диагноза
Отрицателен	Отрицателен или не е извършено*	Отрицателен
LSIL	Отрицателен	LSIL
HSIL	Отрицателен	HSIL
Карцином	Отрицателен	HSIL+
Отрицателен	LSIL	LSIL
LSIL	Не е извършено*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Карцином	LSIL	LSIL
Отрицателен	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Не е извършено*	HSIL
Карцином	HSIL	HSIL
Отрицателен	Карцином	HSIL+
LSIL	Карцином	HSIL+
HSIL	Карцином	HSIL+
Карцином	Не е извършено*	HSIL+
Карцином	Карцином	HSIL+

* Биопсия и/или ендоцервикален кюретаж (Endocervical Curettage, ECC) не са извършени, тъй като не са установени аномалии при колпоскопия или е липсвал хистологичен резултат.

Работните характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test са определени с 327 проби в PreservCyt, 96 от които са взети от жени с диагноза високостепенно заболяване на маточната шийка (вижте таблица 19 и 20 по-долу). Сравненията са направени с всички участващи в проучването пациенти с абнормни резултати от цитонамазката.

Таблица 19. Резултати от тестването за високорискови HPV

		Окончателна диагноза HSIL		Окончателна диагноза LSIL		Отрицателна окончателна диагноза		Общо
		+	-	+	-	+	-	
		Резултат за високорискови HPV						
Резултат от цитонамазката	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Общо	89	7	107	47	33	44	327
Общо		96		154		77		327

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test демонстрира около 93% обща чувствителност за идентифициране на жени с високостепенна неоплазия в контингент с направление за колпоскопия въз основа на диагнозa LSIL, HSIL или еквивалентна от цитонамазка (вижте Таблица 20 по-долу). Тестът също така демонстрира близо 95% прогнозна стойност за отрицателните резултати в този контингент.

Таблица 20. Работни характеристики на тестването за ДНК на високорискови HPV при пациенти с диагноза LSIL или по-висока степен от цитонамазката и окончателна диагноза HSIL

		Окончателна диагноза		
		HSIL	LSIL или отрицателна	Общо
Резултат от <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Общо	96	231	327

Чувствителност $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)
 95% ДИ = 85,6–97,0
 Специфичност $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)
 95% ДИ = 33,1–46,0
 Преваленс на заболяването при LSIL от цитонамазка до окончателна HSIL = 21,4%
 Преваленс на заболяването при HSIL от цитонамазка до окончателна HSIL = 46,6%
 Обща прогнозна стойност за положителните резултати = 38,9% (89/229)
 Обща прогнозна стойност за отрицателните резултати = 92,8% (91/98)

Въпреки че специфичността на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test изглежда сравнително ниска, не се очаква строга корелация между отсъствието на неоплазия и отрицателния резултат за HPV. ДНК на HPV може да присъства при жени, които не са прогресирали до по-високостепенно заболяване. Фактически, когато е извършено тестване за HPV с полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) (анализ само за изследователска употреба) на проби с положителни резултати от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test и съответна окончателна диагноза по-лека от нискостепенна неоплазия, близо 75% са положителни.

Определени са теоретичните прогнозни стойности за положителните и отрицателните резултати от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за начални резултати от цитонамазка LSIL или HSIL с констатирани HSIL или по-тежки заболявания при колпоскопия (вижте Таблица 21 по-долу).

Таблица 21. Теоретична прогнозна стойност за положителните и отрицателните резултати от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test при начални резултати от цитонамазка LSIL или HSIL

Теоретичен преваленс за HSIL	Първоначален резултат от цитонамазка LSIL или HSIL	
	Прогнозна стойност за положителните резултати от анализа	Прогнозна стойност за отрицателните резултати от анализа
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

Работни характеристики при самостоятелно взети и взети от лекар вагинални проби

В цитираната литература за работните характеристики на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test от взети самостоятелно вагинални проби, в проучването са участвали над 141 000 жени на възраст 16 – 54 години. В специфичните за проучването контингенти са включени жени от Китай (41, 42), Мексико (43, 44) и Обединеното кралство (45). Конфигурациите на проучването леко се различават, но като цяло на жените с положителен резултат от теста е предложен допълнителен преглед с колпоскопия и резултатите са съобщени по отношение на чувствителност и специфичност спрямо сравнителния метод.

На две проучвания с налични данни за сравнение между взетите самостоятелно и взетите от лекар проби резултатите показват висока чувствителност за CIN 2+ и при двата метода (42, 45) – 81%–85% за взети самостоятелно спрямо 96%–100% за взети от лекар проби. Резултатите за специфичността са сходни за CIN 2+ и при двата метода (42, 45) – 81%–82% за взети самостоятелно спрямо 83%–85% за взети от лекар проби. На други проучвания с данни за работните характеристики само от взети самостоятелно проби чувствителността на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за CIN 2+ е 3,4 пъти по-висока от тази на цитологичното изследване (43) и 98% преди корекция на отклонението спрямо „златния стандарт“ (verification bias) (44).

Аналитична чувствителност

Неклиничен панел от ДНК от плазмид на клонирани HPV е тестван за определяне дали всеки от 13-те типа HPV се открива от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test и за определяне на аналитичната чувствителност на анализа за всеки тип HPV. Всяка концентрация (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml и 0,2 pg/ml) на всяка прицелна ДНК от 13-те типа HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68) е обработена в три репликата. Средната стойност на RLU за всяка концентрация на всеки тип HPV е изчислена и сравнена с положителния калибратор.

Определена е границата на откриване на всеки тип HPV в STM (вижте Таблица 22 по-долу). Границите на откриване варират в диапазона от 0,62 pg/ml до 1,39 pg/ml в зависимост от тествания тип HPV. Средната граница на откриване на ДНК за всички 13 типа HPV е 1,08 pg/ml със стандартно отклонение 0,05 pg/ml.

Таблица 22. Обобщено представяне на границите на откриване за чувствителността за ДНК на всеки тип HPV в STM

ДНК на тип HPV	Откриваема концентрация на ДНК на HPV (pg/ml)	Стандартно отклонение	95% ДИ
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
Средна (за всички типове)	1,08	0,05	0,95–1,25

Еквивалентност между видовете проби

Еквивалентност между пробите в STM и PreservCyt

Проверена е еквивалентността между пробите в STM и PreservCyt за еднакво извличане на ДНК на HPV 18. Около 106 положителни клетки HeLa, съдържащи интегрирани геноми на HPV 18, са добавени в сборни проби с отрицателни клетки в STM и в PreservCyt. Всеки вид проба е обработен по съответните за него процедури за подготовка на аликвотните части и денатуриране, описани в съответните инструкции за употреба, и тестван с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Резултатите демонстрират, че извличането на ДНК на HPV 18 от човешки карциномни клетки е еквивалентно за двете среди и че подготовката на аликвотните части в PreservCyt Solution не се отразява на аналитичната чувствителност на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Еквивалентност между ръчната подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt и подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Извършени са проучвания с проби в PreservCyt, взети от контингент жени с нормална цитология (n = 1276) и контингент жени с цитология с ASC-US или по-тежко от ASC-US заболяване (n = 402). Ръчна подготовка на аликвотните части и подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit са извършени за всяка проба, последвани от автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (вижте Таблица 23 по-долу).

Таблица 23. Съвпадение на резултатите от проби в PreservCyt с ръчна подготовка на аликвотните части и подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1678)

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Всички положителни	Силен положителен регион RLU/CO \geq 2,5	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион RLU/CO < 0,8
96,0 (409/426)	97,6 (372/381)	96,2 (1204/1252)	99,1 (1173/1184)
93,7–97,5	95,6–98,8	95,0–97,1	98,3–99,5

Относителната чувствителност и специфичност на анализа при проби в PreservCyt, подготвени с QIASymphony DSP HPV Media Kit, са с висока корелация с резултатите, получени с ръчна подготовка на аликвотните части, както се вижда от долната граница на 95% ДИ за съвпадението на положителните и отрицателните резултати.

Еквивалентност между ръчната подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt и подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Извършени са проучвания с проби в PreservCyt, взети от контингент жени на възраст 30 и повече години с нормална цитология (n = 1901) и контингент жени с цитология с ASC-US (n = 398). Ръчна подготовка на аликвотните части и подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit са извършени за всяка проба, последвани от тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (вижте Таблица 24 по-долу).

Таблица 24. Съвпадение на резултатите от проби в PreservCyt с ръчна подготовка на аликвотните части и подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (n = 2299)

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Всички положителни	Силен положителен регион RLU/CO \geq 2,5	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион RLU/CO < 0,8
92,7	96,5	99,1	99,9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89,3–95,2	93,4–98,1	98,6–99,4	99,6–100,0

Относителната чувствителност и специфичност на анализа при проби в PreservCyt, подготвени с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, са с висока корелация с резултатите, получени с ръчна подготовка на аликвотните части, както се вижда от долната граница на 95% ДИ за съвпадението на положителните и отрицателните резултати.

Еквивалентност между STM и ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath

Проведена е клинична оценка на два етапа с 6 центъра за взимане на проби и 3 центъра за тестване в Съединените щати. Пациенти, посещаващи клиника за предавани по полов път заболявания, акушерско-гинекологична клиника, клиника за колпоскопия, болница или център за семейно планиране, са допуснати за участие по предварително определени критерии за включване и изключване.

На етап целесъобразност – за определяне на съответна стойност CO за *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за употреба с аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath – са допуснати около 400 пациенти. Етап клинично валидиране с около 1500 допуснати пациенти – за валидиране на избраната стойност CO – започва, след като междинен анализ на етапа целесъобразност демонстрира, че при CO с 1,0 RLU/CO с аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath се постига приемливо съвпадение с резултатите за пробите в STM.

И на двата етапа от оценката са взети двойка цервикални проби в SurePath и в STM от всяка пациентка, дала съгласие. Пробата в SurePath е изпратена след това в цитологична лаборатория за подготовка на предметни стъкла. След цитологичната подготовка останалите аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath и съответната проба в STM са тествани с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test при CO с 1,0 RLU/CO (вижте Таблица 25 по-долу).

Таблица 25. Съвпадение на резултатите за аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с резултатите за проби в STM (всички възрасти и цитологични класификации) (n = 1490)

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Всички положителни	Силен положителен регион RLU/CO ≥ 2,5	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион RLU/CO < 0,8
93,5	96,4	95,3	96,0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90,7–95,6	94,1–98,0	93,8–96,5	94,6–97,1

Относителната чувствителност и специфичност на анализа при тестване на аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath са с висока корелация с резултатите, получени при тестване на проби в STM, както се вижда от долната граница на 95% ДИ за съвпадението на положителните и отрицателните резултати.

Еквивалентност между ръчната подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath и подготовката на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Извършени са проучвания с проби в SurePath, взети от следните контингенти:

- Жени с нормална цитология (n = 1189)
- Жени с цитология с ASC-US или по-тежко от ASC-US заболяване (n = 199)

За всяка проба в SurePath са извършени подготовка на аликвотните части от пробата в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit и ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчните пелети след градиентно елуиране. Автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (вижте Таблица 26 по-долу) е извършено за всяка от подготвените аликвотни части.

Таблица 26. Съвпадение на резултатите при ръчна подготовка на аликвотните части в SurePath и подготовка на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1388)

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Всички положителни	Силен положителен регион RLU/CO \geq 2,5	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион 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

Относителната чувствителност и специфичност на анализа при проби в SurePath, подготвени с QIASymphony DSP HPV Media Kit, са с висока корелация с резултатите, получени с ръчна подготовка на аликвотните части, както се вижда от долната граница на 95% ДИ за съвпадението на положителните и отрицателните резултати.

Еквивалентност между ръчна подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath и подготовка на аликвотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Извършени са проучвания с проби в SurePath, взети от следните контингенти:

- Жени с нормална цитология (n = 1200)
- Жени с цитология с ASC-US или по-тежко от ASC-US заболяване (n = 183)

Ръчна подготовка на аликвотните части и подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit са извършени за всяка аликвотна част от клетъчна пелета след градиентно елуиране в SurePath, последвани от автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (вижте Таблица 27 по-долу).

Таблица 27. Съвпадение на резултатите за аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath при ръчна подготовка на аликвотните части и подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1383)

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Всички положителни	Силен положителен регион RLU/CO \geq 2,5	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион 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

Относителната чувствителност и специфичност на анализа на аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath, подготвени с QIASymphony DSP HPV Media Kit, са с висока корелация с резултатите, получени с ръчна подготовка на аликвотните части, както се вижда от долната граница на 95% ДИ за съвпадението на положителните и отрицателните резултати.

Съвпадение на резултатите от различни методи на тестване

Проучване в различни центрове (n = 2270) е проведено за оценка на резултатите от клинични тестове с RCS в сравнение с резултатите от тестовете по ръчния метод. Тестването е извършено в 3 центъра извън QIAGEN с пациентски проби, взети от 5 центъра за взимане на проби. Наборът от данни включва 1269 цервикални проби, взети в PreservCyt Solution, и 1001 проби, взети в STM.

Статистическите съвпадения на резултатите за съответните проби, тествани с RCS и с ръчния тест, са изчислени за този пациентски контингент (вижте таблица 28 и 29 по-долу).

Таблица 28. Обобщено представяне на съвпадението на резултатите от автоматизирано тестване с RCS с тези от ръчно тестване – проби в STM (n = 1001)

Цитологична класификация	Преваленс на HPV (%)	Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
		Всички положителни	Силен положителен регион (RLU/CO ≥ 2,5)	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 години	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 години	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
Други	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
Всички проби в STM	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 = в нормалните граници (Within Normal Limits).

Таблица 29. Обобщено представяне на съвпадението на резултатите от автоматизирано тестване с RCS с тези от ръчно тестване – проби в PreservCyt (n = 1269)

Цитологична класификация	Преваленс на HPV (%)	Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
		Всички положителни	Силен положителен регион (RLU/CO ≥ 2,5)	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 години	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 години	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
Други	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
Всички проби в PreservCyt†	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 = в нормалните граници (Within Normal Limits).

† За 4 пациенти няма цитологични данни.

Допълнително клинично проучване е извършено с архивирани остатъчни проби в PreservCyt, взети от контингент жени на възраст 30 и повече години с нормална цитология (вижте Таблица 30 по-долу) с преваленс на HPV 4,8%.

Таблица 30. Обобщено представяне на съвпадението на резултатите от автоматизирано тестване с RCS с тези от ръчно тестване – жени WNL на възраст 30 и повече години (n = 2077)

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Силен положителен регион		Силен отрицателен регион	
Всички положителни	(RLU/CO ≥ 2,5)	Всички отрицателни	(RLU/CO < 0,8)
92,0	91,8	99,3	99,7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84,84–96,48	83,77–96,62	98,88–99,65	99,40–99,92

В 7 случая има разминаване между резултатите от ръчното и автоматизираното тестване с RCS в силния положителен регион. Началните резултати от ръчното тестване на тези 7 проби не попадат в диапазона за препоръчително повторно тестване по алгоритъма за проби в PreservCyt; тъй като конфигурацията на проучването обаче изисква всички проби да се тестват в три репликата, има резултати от повторно тестване за проверка на разминаванията.

Данните от повторното тестване на всяка от 7-те проби с разминаващи се резултати показват, че всички проби с разминаващи се резултати са отрицателни за ДНК на HPV (вижте Таблица 31 по-долу). Предвид отрицателните резултати от повторното тестване и на двата репликата всеки от началните положителни резултати от ръчното тестване най-вероятно е бил грешен положителен.

Таблица 31. Проби в PreservCyt с разминаващи се резултати – жени WNL на възраст 30 и повече години (n = 7)

Аликвотна част	Център	Ръчно тестване (RLU/CO)			Автоматизирано тестване с RCS (RLU/CO)		
		Начален	Повторение 1	Повторение 2	Начален	Повторение 1	Повторение 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	B	11,01	0,16	0,14	0,19	0,15	0,21

Резултатите от това клинично проучване показват общо съвпадение на резултатите от автоматизирано тестване с RCS с тези от ръчно тестване на проби в STM или PreservCyt.

Възпроизводимост

Обща възпроизводимост на ръчното тестване

Проучване за възпроизводимост в различни центрове е извършено за определяне на възпроизводимостта в различни дни, различни центрове и общата възпроизводимост на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test с панел от прицелни ДНК на HPV и HPV-положителни и HPV-отрицателни клинични проби в STM.

Три външни лаборатории извършват тестването с една и съща партида набори *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test в 3 различни дни с един и същ панел за възпроизводимост. Панелът за възпроизводимост включва следните проби:

- 12 сборни денатурирани клинични проби в STM
- 3 сборни неденатурирани клинични проби в PreservCyt
- Отрицателен калибратор
- Положителен калибратор с високорискови HPV при концентрации 0,5, 1, 2,5, 5 и 10 pg/ml.

Всички проби в панела са тествани всеки ден в три репликата с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Резултатите показват, че възпроизводимостта на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test с клинични проби е много добра (вижте Таблица 32 по-долу).

Таблица 32. Обща възпроизводимост – възпроизводимост в различни центрове (всички серии на всички центрове)

Статистическа величина	Резултат
Очакван положителен с наблюдаван положителен резултат (95% ДИ)	100,0% (99,0–100,0)
Очакван положителен с наблюдаван отрицателен резултат (95% ДИ)	99,0% (97,49–99,73)
Съвпадение (95% ДИ)	99,5% (98,70–99,86)
Капа	0,990

Възпроизводимост с клинични проби в STM

Ръчно тестване

Извършено е проучване за възпроизводимостта на ръчно тестване на клинични проби в STM с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Панел от 20 сборни клинични проби (10 положителни и 10 отрицателни) е изготвен с комбиниране на тествани преди това проби в STM.

Пробите са тествани в 4 репликата всеки ден в продължение на 5 дни или общо по 20 репликата на проба. Тестването е извършено с комбинирана смес за сондата, включваща сондата за високорискови HPV и сондата за нискорискови HPV. Възпроизводимостта на теста не би следвало да се различава, когато се използва само сместа за сондата в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Изчислени са средната стойност RLU/CO и 95% ДИ (вижте Таблица 33 по-долу).

Таблица 33. Възпроизводимост на проби в STM – ръчно тестване (в низходящ ред по средна стойност RLU/CO)

Номер на проба	Средна стойност RLU/CO	95% ДИ	Положителен резултат от теста (%) (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)

За 5-те проби със средна стойност RLU/CO с 20% или повече над CO, 100 от 100 репликата (100,0%) са положителни. За 5-те проби със средна стойност RLU/CO в рамките на 20% над или под CO, 60 от 100 (60%; 95% ДИ = 49,7–69,6) репликата са положителни, а 40 от 100 (40%) са отрицателни. За 10-те проби със средна стойност RLU/CO с 20% или повече под CO, 200 от 200 репликата (100%) са отрицателни.

Резултатите показват, че възпроизводимост може да се очаква, когато пробите са на най-малко 20% от CO. Проби, близки до CO, дават приблизително равен брой положителни и отрицателни резултати. Тези данни демонстрират, че ръчното тестване на проби в STM с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test дава възпроизводими резултати.

Автоматизирано тестване с RCS

Извършено е проучване за оценка на възпроизводимостта между различни серии, различни дни и различни лаборатории в рамките на обработката при автоматизирано тестване с RCS на проби в STM с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Панел от 16 сборни клинични проби (вижте Таблица 34 по-долу) е тестван с една и съща партида реактиви по два пъти на ден в 3 различни дни. Всяка проба от панела е тествана в четири репликата.

Таблица 34. Възпроизводимост на проби в STM – състав на панела за автоматизирано тестване с RCS

Тест от панела	Приблизителна RLU/CO	Очакван резултат от теста
1N	< 0,4	Отрицателен
2N	0,4–0,8	Отрицателен
3P	0,8–1,2	Висок отрицателен/нисък положителен
4P	0,8–1,2	Висок отрицателен/нисък положителен
5P	0,8–1,2	Висок отрицателен/нисък положителен
6P	1,2–2,0	Нисък положителен
7P	1,2–2,0	Нисък положителен
8P	1,2–2,0	Нисък положителен
9P	2,0–5,0	Нисък положителен
10P	5,0–10,0	Среден положителен
11N	< 0,4	Отрицателен
12N	< 0,4	Отрицателен
13N	< 0,4	Отрицателен
14XR	Положителен за ДНК на нискорискови HPV клиничен материал в сборна отрицателна клинична проба в STM	Висок отрицателен/нисък положителен
15XR	Плазмид с ДНК на нискорискови HPV в сборна отрицателна клинична проба в STM	Висок отрицателен/нисък положителен
16XR	Контрол с ДНК на плазмиден вектор в сборна отрицателна клинична проба в STM	Висок отрицателен/нисък положителен

Две проби в панела (14XR и 15XR) са включени за оценка на потенциалната кръстосана хибридизация на сместа за сондата на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test с проби, съдържащи само ДНК на нискорискови типове HPV 6, 11, 42, 43 и 44. Проба 16XR от панела е съставена от ДНК на рGEM® при концентрация 1,49 ng/ml и служи като контрола с вектор за проба 15XR от панела. Резултатите от това тестване показват, че няма грешни положителни резултати от теста поради наличието на ДНК на нискорискови типове HPV в клинични проби. Резултатите от ръчното тестване са сходни.

Възпроизводимостта е изчислена по метода, описан в NCCLS E5-A (46) (вижте Таблица 35 по-долу). Този метод изисква изчисляване на компонентите на вариациите за всеки източник на такива: лаборатория, ден, серия и грешка (дефинирана като вариация между различни анализи).

Таблица 35. Възпроизводимост на проби в STM – автоматизирано тестване с RCS; количествена възпроизводимост

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение				Общо	Общ CV (%)
			В една серия	В различни серии	В различни дни	В различни лаборатории		
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	Неприложимо [‡]	Неприложимо [‡]	Неприложимо [‡]	Неприложимо [‡]	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

* Отрицателните компоненти на вариациите се приравняват към нула.

[†] Два невалидни репликата за проба 8P от панела не позволяват анализ на вариациите поради разлика в размерите на сравняваните групи.

[‡] Неприложимо: анализ на вариациите не е възможен поради по-малко репликати от тези на другите проби в панела.

Възпроизводимост на клинични проби в PreservCyt

Ръчно тестване

Възпроизводимостта на ръчното тестване на проби в PreservCyt с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test е определена в проучване с 24 фабрикувани проби при различни концентрации на ДНК на HPV. Пробите се състоят от PreservCyt Solution и левкоцити, с и без бактерии, съдържащи плазмид на HPV 16.

Пробите са тествани в 4 репликата всеки ден в продължение на 5 дни или общо по 20 репликата на проба. Във всеки от 5-те дни на проучването е подготвена и тествана 8-ml аликвотна част от всяка проба по инструкциите за употреба на *digene*

HC2 Sample Conversion Kit. Изчислени са средната стойност и 95% ДИ (вижте Таблица 36 по-долу).

Таблица 36. Възпроизводимост от проби в PreservCyt – ръчно тестване с ръчна подготовка на алиquotните части; качествена възпроизводимост (в низходящ ред по средна стойност RLU/CO)

Номер на проба	Средна стойност RLU/CO	95% ДИ	Положителен резултат от теста (%) (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)

За 6-те проби със средна стойност RLU/CO с 20% или повече над CO, 114 от 120 репликата (95,0%) са положителни. За 7-те проби със средна стойност RLU/CO в рамките на 20% над или под CO, 88 от 139 (63,3%; 95% ДИ = 54,3–70,9) репликата са положителни, а 51 от 139 (36,7%) са отрицателни. За 4 проби в рамките на 10% над или под CO, 41 от 79 (51,9%) репликата са положителни, а 38 от 79 (48,1%) са отрицателни. За 11-те проби със средна стойност RLU/CO с 20% или повече под CO, 220 от 220 репликата (100%) са отрицателни.

Резултатите показват, че възпроизводимост може да се очаква, когато пробите са на най-малко 20% от СО. Проби, близки до СО, дават приблизително равен брой положителни и отрицателни резултати. Тези данни демонстрират, че ръчното тестване на проби в PreservCyt с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test дава възпроизводими резултати.

Автоматизирано тестване с RCS с ръчна подготовка на аликвотните части

Вътрешно проучване на автоматизираното тестване с RCS е извършено с клинични проби в PreservCyt, получени предимно от жени с цитологичен резултат с ASC-US или по-тежко от ASC-US заболяване (преваленс на HPV 57%). Пробите са разделени на 2 аликвотни части; всяка аликвотна част след това е поотделно обработена с *digene* HC2 Sample Conversion Kit и тествана в репликат с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Като при другите качествени инвитро диагностични тестове, вариациите в резултатите от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, получени от клинични проби, се свързват предимно с един или повече от следните фактори: процедура за взимане на пробата, подготовка на аликвотните части и тестване. Тъй като сравнените резултати от теста са получени от една и съща клинична проба, експерименталната конфигурация контролира вариациите поради процедурата за взимане на пробата. Повторяемостта на резултатите, получени от 2 поотделно приготвени аликвотни части от една и съща клинична проба (наричана по-долу „в различни подготвени аликвотни части“), отразява вариациите поради комбинация от двата фактора: процедура за подготовка на аликвотните части и тестването. Повторяемостта на резултатите, получени от една и съща аликвотна част (наричана по-долу „в една подготвена аликвотна част“), отразява само вариациите поради процедурата за тестването (вижте Таблица 37 по-долу).

Таблица 37. Възпроизводимост на проби в PreservCyt – автоматизирано тестване с RCS с ръчна подготовка на аликвотните части; качествена възпроизводимост

Анализ	Съвпадение на положителните резултати (%)	Съвпадение на отрицателните резултати (%)	Общо съвпадение (%)	
	(n/N) 95% ДИ	(n/N) 95% ДИ	(n/N) 95% ДИ	
В една подготвена аликвотна част	Всички данни	99,62 (261/262)	94,7 (160/169)	97,7 (421/431)
		97,9–100,0	90,1–97,5	95,8–98,9
	Силен положителен и силен отрицателен регион	100,0 (249/249)	98,2 (160/163)	99,3 (409/412)
		98,5–100,0	94,7–99,6	97,9–99,9
В различни подготвени аликвотни части	Всички данни	99,6 (264/265)	98,2 (163/166)	99,1 (427/431)
		97,9–100,0	94,8–99,6	97,6–99,8
	Силен положителен и силен отрицателен регион	100,0 (249/249)	99,4 (161/162)	99,8 (410/411)
		98,5–100,0	96,6–100,0	98,7–100,0

Допълнително проучване е извършено за оценка на количествената възпроизводимост на резултати, получени с автоматизирано тестване с RCS на симулирани проби в PreservCyt. Три центъра за тестване, включително QIAGEN, участват в проучването.

Всяка лаборатория за тестване извършва както автоматизирано с RCS, така и ръчно тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test два пъти на ден в 5 различни дни с предоставен панел за възпроизводимост от 6 проби. Всяка проба от панела е съставена от култивирани клетки, прибавени в PreservCyt Solution, така че да дават определена приблизителна стойност RLU/CO (вижте Таблица 38 по-долу).

Положителните за ДНК на HPV проби в панела са приготвени с прибавяне на различни количества ДНК на HPV-положителни клетки SiHa (от лабораторна клетъчна линия). Отрицателната проба от панела е съставена от HPV-отрицателни клетки Jurkat (от различна лабораторна клетъчна линия). Окончателната клетъчна концентрация на всички 6 проби в панела е около 5×10^4 клетки/ml.

Таблица 38. Възпроизводимост от проби в PreservCyt – автоматизирано тестване с RCS с ръчна подготовка на аликвотните части; проби в панела за количествена възпроизводимост

Тест от панела	Тип клетка	Приблизителна RLU/CO	Очакван резултат от теста
1N	Jurkat	< 1,0	Отрицателен
2N	Jurkat	< 1,0	Отрицателен
3P	SiHa и Jurkat	5,0–8,0	Нисък положителен
4P	SiHa и Jurkat	5,0–8,0	Нисък положителен
5P	SiHa	30,0–50,0	Среден положителен
6P	SiHa	200,0	Висок положителен

Възпроизводимостта е изчислена по метода, описан в NCCLS E5-A (46) (вижте Таблица 39 по-долу). Този метод изисква изчисляване на компонентите на вариациите за всеки източник на такива: лаборатория, ден, серия и грешка (дефинирана като вариация между различни анализи). Всяка от 6-те проби в панела е тествана в четири репликата във всяка от 10-те серии (2 серии на ден в продължение на 5 дни тестване) във всяка от 3-те лаборатории.

Таблица 39. Възпроизводимост от проби в PreservCyt – автоматизирано тестване с RCS с ръчна подготовка на аликвотните части; количествена възпроизводимост

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение				Общо	Общ CV (%)
			В една серия	В различни серии	В различни дни	В различни лаборатории		
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

* Отрицателните компоненти на вариациите се приравняват към нула.

В допълнение към това начално проучване за възпроизводимост с данни от проби, много близки до стойността cut-off на анализа, допълнително проучване за прецизност е проведено в център извън QIAGEN с RCS.

Панелът се състои от 1 отрицателна, 2 отрицателни или ниски положителни и 2 ниски положителни проби. Всяка проба от панела е приготвена с прибавяне на култивирани клетки Jurkat и SiHa в PreservCyt Solution, така че да дават прицелните стойности RLU/CO (вижте Таблица 40 по-долу).

Този външен център извършва автоматизирано тестване с RCS с една партида реактиви за *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за всяко изпълнение на теста, като извършва теста 2 пъти на ден в 3 различни дни с предоставен панел от 5 симулирани проби в PreservCyt. Всяка проба от панела е разделена на 4 аликвотни части и всичките 4 аликвотни части са тествани на една и съща микроплака (вижте Таблица 41 по-долу).

Таблица 40. Възпроизводимост от проби в PreservCyt – автоматизирано тестване с RCS с ръчна подготовка на аликвотните части; количествена възпроизводимост на проби в панела, близки до стойността CO на анализа

Тест от панела	Приблизителна RLU/CO	Очакван резултат от теста
1N	0,2	Отрицателен
2N	0,8–1,2	Висок отрицателен/нисък положителен
3P	0,8–1,2	Висок отрицателен/нисък положителен
4P	1,2–2,0	Нисък положителен
5P	1,2–2,0	Нисък положителен

Таблица 41. Възпроизводимост от проби в PreservCyt – автоматизирано тестване с RCS с ръчна подготовка на аликвотните части; количествена възпроизводимост близо до стойността CO на анализа

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение				Общо	Общ CV (%)
			В една серия	В различни серии	В различни дни			
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	

* Отрицателните компоненти на вариациите се приравняват към нула.

Подготовка на аликвотните части с QIA Symphony DSP HPV Media Kit

Вътрешно проучване на подготовката на аликвотните части с QIA Symphony DSP HPV Media Kit е извършено с клинични проби в PreservCyt, взети от жени с един от следните два цитологични резултата:

- ASC-US или по-тежко от ASC-US заболяване
- Отрицателен за интраепителна лезия или злокачествено образуване (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, NILM)

Две аликвотни части са отделени от всяка проба. Всяка аликвотна част е подготвена поотделно с QIASymphony DSP HPV Media Kit и резултатите са определени с автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Като при другите качествени инвитро диагностични тестове, вариациите в резултатите от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, получени от клинични проби, се свързват предимно с един или повече от следните фактори: процедура за взимане на пробата, подготовка на аликвотните части и тестване. Тъй като сравнените резултати от теста са получени от една и съща клинична проба (наричани по-долу „в различни аликвотни части“), експерименталната конфигурация контролира вариациите поради процедурата за взимане на пробата. Възпроизводимостта на резултатите (вижте Таблица 42 по-долу), получени от 2 поотделно подготвени аликвотни части от една и съща клинична проба, отразява вариациите поради двата фактора: процедура за подготовка на аликвотните части и тестването.

Таблица 42. Възпроизводимост на проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; качествена възпроизводимост в различни аликвотни части

Съвпадение на положителните резултати (%)	Съвпадение на отрицателните резултати (%)	Общо съвпадение (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95% ДИ	95% ДИ	95% ДИ
99,0	96,4	97,3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94,3–99,8	92,4–98,3	94,6–98,7

Допълнително проучване е извършено за оценка на възпроизводимостта на резултатите със симулирани проби в PreservCyt. Подготовката на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit е последвана от автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 8-те положителни проби в панела са приготвени с прибавяне на положителни за ДНК на HPV клетки SiHa или HeLa в отрицателни за ДНК на HPV клетки C-33 A в PreservCyt Solution, докато 2-те отрицателни за ДНК на HPV проби в панела съдържат само отрицателни за ДНК на HPV клетки C-33 A.

Трима различни оператори извършват тестването в един ден с 3 различни апарата QIASymphony SP и 3 различни партиди QIASymphony DSP HPV Media Kit с проби 2N, 3E, 5P, 7P и 9P от панела. Проби 2N, 3E, 5P и 7P от панела са тествани с 18 репликата на 3 различни серии, за да се получат 54 елемента с данни за всяка проба от панела. Проба 9P от панела е тествана с 16 репликата на 3 различни серии, за да се получат 48 елемента с данни.

Един оператор извършва *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test в 3 различни дни с 3 различни аппарата QIAAsymphony SP и една партида QIAAsymphony DSP HPV Media Kit с проби 1N, 4E, 6P, 8P и 10P от панела. Проби 1N, 4E, 6P и 8P от панела са тествани с 18 репликата на 8 различни серии, за да се получат 144 елемента с данни за всяка проба от панела. Проба 10P от панела е тествана с 16 репликата на 8 различни серии, за да се получат 128 елемента с данни.

От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече над CO, 572 от 572 (100,0%) са положителни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO в рамките на 20% над или под CO, 98 от 198 (49,5%) са положителни, а 100 от 198 (50,5%) са отрицателни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече под CO, 198 от 198 (100,0%) са отрицателни (вижте Таблица 43 по-долу).

Таблица 43. Възпроизводимост на проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIAAsymphony DSP HPV Media Kit; качествена възпроизводимост

Тест от панела	Тип клетка	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение	Положителен резултат от теста (%) (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 и C-33 A	0,81	0,11	6 (3/54)
4E	SiHa и C-33 A	1,09	0,18	66 (95/144)
5P	HeLa и C-33 A	3,17	0,46	100 (54/54)
6P	SiHa и C-33 A	4,81	0,74	100 (144/144)
7P	HeLa и C-33 A	6,77	0,97	100 (54/54)
8P	SiHa и C-33 A	9,41	1,39	100 (144/144)
9P	HeLa и C-33 A	13,72	2,81	100 (48/48)
10P	SiHa и C-33 A	28,13	5,08	100 (128/128)

Резултатите показват, че възпроизводимост може да се очаква, когато пробите са на най-малко 20% от CO. Проби, близки до CO, дават приблизително равен брой положителни и отрицателни резултати. Тези данни демонстрират, че подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, последвана от тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, дава възпроизводими резултати.

Резултатите от вътрешното проучване са използвани също така за оценка на количествената възпроизводимост на резултатите, получени с подготовка на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIAAsymphony DSP HPV Media Kit (вижте Таблица 44 и Таблица 45 по-долу).

Таблица 44. Възпроизводимост на проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; количествена възпроизводимост с един и същ оператор

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение			Приблизително общо стандартно отклонение	Приблизителен общ CV (%)
			В една серия	В различни серии	В различни комбинации*		
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

* В различни комбинации от апарати QIASymphony SP и различни дни.

Таблица 45. Възпроизводимост от проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; количествена възпроизводимост в един и същ ден

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение		Приблизително общо стандартно отклонение	Приблизителен общ CV (%)
			В една серия	В различни серии†		
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

† Една серия включва една комбинация от QIASymphony DSP HPV Media Kit, апарат QIASymphony SP и оператор.

Количествената възпроизводимост е много висока, както се вижда от факта, че всички стойности на CV остават под 25%. Стандартните отклонения в различните серии са сравними със съответната стойност в една серия, което означава възпроизводимост на резултатите независимо от използвания апарат или партида набори.

Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Вътрешно проучване на подготовката на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit е извършено с клинични проби в PreservCyt, взети от жени с цитологичен резултат ASC-US или NILM. Две аликвотни части са отделени от всяка проба. Всяка аликвотна част е подготвена поотделно с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit и резултатите са определени с автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Като при другите качествени инвитро диагностични тестове, вариациите в резултатите от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, получени от клинични проби, се свързват предимно с един или повече от следните фактори: процедура за взимане на пробата, подготовка на аликвотните части и тестване. Тъй като сравнените резултати от теста са получени от една и съща клинична проба (наричани по-долу „в различни аликвотни части“), експерименталната конфигурация контролира вариациите поради процедурата за взимане на пробата. Възпроизводимостта на резултатите (вижте Таблица 46 по-долу), получени от 2 поотделно подготвени аликвотни части от една и съща клинична проба, отразява вариациите поради двата фактора: процедура за подготовка на аликвотните части и тестването.

Таблица 46. Възпроизводимост на проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; качествена възпроизводимост в различни аликвотни части

Съвпадение на положителните резултати (%)	Съвпадение на отрицателните резултати (%)	Общо съвпадение (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95% ДИ	95% ДИ	95% ДИ
95,3	96,7	96,2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89,4–98,0	92,3–98,5	93,3–97,9

Допълнително проучване е извършено за оценка на възпроизводимостта на резултатите със симулирани проби в PreservCyt. Подготовката на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit е последвана от автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Трима различни оператори извършват *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test в различни дни с различни апарати и различни партии реактиви с панел от 9 проби. Всяка проба от панела е тествана в репликат на 24 различни серии, за да се получат 48 елемента с данни за всяка проба от панела. 8-те положителни проби в панела са приготвени с прибавяне на положителни за ДНК на HPV клетки SiHa или HeLa в отрицателни за ДНК на HPV клетки H9 в PreservCyt Solution, докато отрицателната за ДНК на HPV проба от панела съдържа само отрицателни за ДНК на HPV клетки H9.

От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече над CO, 237 от 240 (98,8%) са положителни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO в рамките на 20% над или под CO, 95 от 144 (66,0%) са положителни, а 49 от 144 (34,0%) са отрицателни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече под CO, 48 от 48 (100,0%) са отрицателни (вижте Таблица 47 по-долу).

Таблица 47. Възпроизводимост на проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; качествена възпроизводимост

Тест от панела	Тип клетка	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение	Положителен резултат от теста (%) (n/N)
1N	H9	0,17	0,03	0 (0/48)
2E	H9 и HeLa	1,00	0,16	56 (27/48)
3E	H9 и HeLa	1,16	0,57	54 (26/48)
4E	H9 и SiHa	1,18	0,23	88 (42/48)
5P	H9 и SiHa	1,89	0,20	100 (48/48)
6P	H9 и HeLa	2,05	0,43	96 (46/48)
7P	H9 и SiHa	2,97	0,45	100 (48/48)
8P	H9 и HeLa	5,67	0,61	100 (48/48)
9P	H9 и SiHa	9,91	1,63	98 (47/48)

Резултатите показват, че възпроизводимост може да се очаква, когато пробите са на най-малко 20% от CO. Проби, близки до CO, дават приблизително равен брой положителни и отрицателни резултати. Тези данни демонстрират, че подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, последвана от тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, дава възпроизводими резултати.

Резултатите от вътрешното проучване са използвани също така за оценка на количествената възпроизводимост на резултатите, получени с подготовката на аликвотните части от проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (вижте Таблица 48 по-долу).

Таблица 48. Възпроизводимост при проби в PreservCyt – подготовка на аликвотните части с QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit; количествена възпроизводимост

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение			Приблизително общо стандартно отклонение	Приблизителен общ CV (%)
			В една серия	В различни серии	В различни комбинации*		
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

* В различни комбинации от използвани набори *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, набори QIAAsymphony DSP AXpH DNA, RCS, апарати QIAAsymphony SP и оператор.

Възпроизводимост на клинични проби в SurePath

Ръчно тестване

Възпроизводимостта на ръчното тестване на аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test е определена в проучване с 3 различни лаборатории. Проби в панела са тествани при CO с 1,0 RLU/CO в различни дни и различни серии с еднакво множество проби в панела с известен положителен или отрицателен HPV статус. Панелът се състои от 5 положителни, 2 високи отрицателни/ниски положителни и 5 отрицателни проби.

Всяка проба от панела е приготвена с комбиниране на уникални клинични проби, взети в SurePath Preservative Fluid, с известен положителен или отрицателен HPV статус, за да се получат необходимите прицелни стойности RLU/CO. Всяка проба от панела е тествана в репликат, два пъти на ден, в продължение на 5 дни във всяка от 3-те участващи лаборатории (вижте Таблица 49 по-долу).

Таблица 49. Възпроизводимост при аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath – ръчно тестване; качествена възпроизводимост

Тест от панела	Средна стойност RLU/CO	Положителен резултат от теста (%) (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)

Автоматизирано тестване с RCS

Възпроизводимостта на резултатите за аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с автоматизирано тестване с RCS е определена със сравняване на резултатите, получени с ръчно тестване. Тествани са две отделни аликвотни части от една и съща клетъчна пелета след градиентно елуиране в SurePath (от една и съща проба) (вижте Таблица 50 по-долу).

Таблица 50. Възпроизводимост при аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath – автоматизирано тестване с RCS; съвпадение на резултатите от автоматизирано тестване с RCS с тези от ръчно тестване

Съвпадение на положителните резултати (%) (n/N) 95% ДИ		Съвпадение на отрицателните резултати (%) (n/N) 95% ДИ	
Всички положителни	Силен положителен регион (RLU/CO ≥ 2,5)	Всички отрицателни	Силен отрицателен регион (RLU/CO < 0,80)
99,0 (417/421)	100,0 (375/375)	97,7 (1057/1079)	98,7 (1050/1064)
97,6–99,7	99,0–100,0	96,9–98,75	97,8–99,28

Подготовка на алиquotните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Извършено е проучване за оценка на възпроизводимостта на резултатите със симулирани проби в SurePath. Подготовката на алиquotните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit е последвана от автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 4-те положителни проби в панела са приготвени с прибавяне на положителни за ДНК на HPV клетки SiHa в отрицателни за ДНК на HPV клетки H9 в SurePath Preservative Fluid, докато отрицателната за ДНК на HPV проба от панела съдържа само отрицателни за ДНК на HPV клетки H9 в SurePath Preservative Fluid.

Трима различни оператори извършват тестване в 6 различни дни с 3 различни апарата QIASymphony SP и 3 различни партиди QIASymphony DSP HPV Media Kit с проби 1N, 2E, 3P, 4P и 5P от панела. Проби 1N, 2E, 3P и 4P от панела са тествани с 18 репликата на 37 различни серии, за да се получат 666 елемента с данни за проби 2E и 3P от панела и 665 елемента с данни за проби 1N и 4P от панела. Проба 5P от панела е тествана с 16 репликата на 37 различни серии, за да се получат 590 елемента с данни. Четири елемента с данни са изключени поради недостатъчен обем, отбелязан със съответния флаг от QIASymphony SP по време на подготовката на алиquotните части.

От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече над CO, 1921 от 1921 (100,0%) са положителни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO в рамките на 20% над или под CO, 410 от 666 (61,6%) са положителни, а 256 от 666 (38,4%) са отрицателни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече под CO, 664 от 665 (99,8%) са отрицателни (вижте Таблица 51 по-долу).

Таблица 51. Възпроизводимост на проби в SurePath – подготовка на алиquotните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; качествена възпроизводимост

Тест от панела	Тип клетка	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение	Положителен резултат от теста (%) (n/N)
1N	H9	0,38	0,06	0,2 (1/665)
2E	SiHa и H9	1,06	0,17	61,6 (410/666)
3P	SiHa и H9	4,51	0,78	100,0 (666/666)
4P	SiHa и H9	8,34	1,57	100,0 (665/665)
5P	SiHa и H9	24,69	5,12	100,0 (590/590)

Резултатите показват, че възпроизводимост може да се очаква, когато пробите в SurePath са на най-малко 20% от CO. Проби в SurePath, близки до CO, дават приблизително равен брой положителни и отрицателни резултати. Тези данни демонстрират, че подготовката на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit, последвана от тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, дава възпроизводими резултати.

Резултатите от вътрешното проучване са използвани също така за оценка на количествената възпроизводимост на резултатите, получени с подготовка на аликвотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Трима различни оператори извършват тестване в 6 различни дни с 3 различни апарата QIASymphony SP и 3 различни партиди QIASymphony DSP HPV Media Kit с проби 1N, 2E, 3P, 4P и 5P от панела. Проби 1N, 2E, 3P и 4P от панела са тествани с 18 репликата, за да се получат 162 елемента с данни за всяка проба от панела. Проба 5P от панела е тествана с 16 репликата, за да се получат 144 елемента с данни (вижте Таблица 52 по-долу).

Таблица 52. Възпроизводимост при проби в SurePath – подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; количествена възпроизводимост

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение			Приблизително общо стандартно отклонение	Приблизителен общ CV (%)
			В една серия	В различни дни	В различни комбинации*		
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

* Една серия включва една комбинация от QIASymphony DSP HPV Media Kit, апарат QIASymphony SP и оператор в един конкретен ден.

Количествената възпроизводимост е много висока, както се вижда от факта, че всички стойности на CV остават под 26%. Стандартните отклонения в различните серии са сравними със съответната стойност в една серия, което означава възпроизводимост на резултатите независимо от използвания апарат или партида набори.

Подготовка на алиquotни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Извършено е проучване за оценка на възпроизводимостта на резултатите със симулирани алиquotни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath. Подготовката на алиquotните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit е последвана от автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Материал от посявка на клетки в 70% SurePath Preservative Fluid е използван за симулиране на алиquotни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath. 4-те положителни проби в панела са приготвени с прибавяне на положителни за ДНК на HPV клетки SiHa в отрицателни за ДНК на HPV клетки H9 в SurePath Preservative Fluid, докато отрицателната за ДНК на HPV проба от панела съдържа само отрицателни за ДНК на HPV клетки H9 в SurePath Preservative Fluid.

Четирима различни оператори извършват тестване в 6 различни дни с 3 различни апарата QIASymphony SP и 3 различни партиди QIASymphony DSP HPV Media Kit с проби 1, 2, 3, 4 и 5 от панела. Проби 1, 2, 3 и 4 от панела са тествани с 18 репликата на 37 различни серии, за да се получат 666 елемента с данни за проби 1 и 3 от панела и 665 елемента с данни за проби 2 и 4 от панела. Два елемента с данни са изключени поради недостатъчен обем, отбелязан със съответния флаг от QIASymphony SP по време на подготовката на алиquotните части. Проба 5 от панела е тествана с 16 репликата на 37 различни серии, за да се получат 592 елемента с данни.

От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече над CO, 1923 от 1923 (100,0%) са положителни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO в рамките на 20% над или под CO, 416 от 665 (62,6%) са положителни, а 249 от 665 (37,4%) са отрицателни. От пробите в панела със средна стойност RLU/CO с 20% или повече под CO, 666 от 666 (100%) са отрицателни (вижте Таблица 53 по-долу).

Таблица 53. Възпроизводимост при алиquotни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath – подготовка на алиquotните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; качествена възпроизводимост

Тест от панела	Тип клетка	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение	CV (%)	Положителен резултат от теста (%) (n/N)
1	H9	0,12	0,02	18,77	0,0 (0/666)
2	SiHa и H9	0,96	0,11	11,15	62,6 (416/665)
3	SiHa и H9	4,72	0,56	11,89	100,0 (666/666)
4	SiHa и H9	9,34	0,98	10,46	100,0 (665/665)
5	SiHa и H9	24,9	3,37	13,55	100,0 (592/592)

Резултатите показват, че възпроизводимост може да се очаква, когато аликувотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath са на най-малко 20% от CO. Аликувотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath, близки до CO, дават приблизително равен брой положителни и отрицателни резултати. Тези данни демонстрират, че подготовката на аликувотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit, последвана от тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, дава възпроизводими резултати.

Резултатите от вътрешното проучване са използвани също така за оценка на количествената възпроизводимост на резултатите, получени с подготовка на аликувотните части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Четири различни оператори извършват тестване в 6 различни дни с 3 различни апарата QIASymphony SP и 3 различни партиди QIASymphony DSP HPV Media Kit с проби 1, 2, 3, 4 и 5 от панела. Проби 1, 2, 3 и 4 от панела са тествани с 18 репликата, за да се получат 162 елемента с данни за всяка проба от панела. Проба 5 от панела е тествана с 16 репликата, за да се получат 144 елемента с данни (вижте Таблица 54 по-долу).

Таблица 54. Възпроизводимост на аликувотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath – подготовка на аликувотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit; количествена възпроизводимост

Тест от панела	n	Средна стойност RLU/CO	Стандартно отклонение			Приблизително общо стандартно отклонение	Приблизителен общ CV (%)
			В една серия	В различни дни	В различни комбинации*		
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

* В различни комбинации от различни дни, оператори, партиди QIASymphony DSP HPV Media Kit и апарати QIASymphony SP.

Количествената възпроизводимост е много висока, както се вижда от факта, че всички стойности на CV остават под 20%. Стандартните отклонения в различните серии са сравними със съответната стойност в една серия, което означава възпроизводимост на резултатите независимо от използвания апарат или партида набори.

Кръстосана реактивност

Панел от бактерии, вируси и плазмиди, често срещани в женския аногенитален тракт, и избрани типове HPV, обитаващи външните слоеве на кожата, с достъпни клонинги са анализирани за определяне на вероятността от възникване на кръстосана реактивност с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Всички микроорганизми са анализирани при концентрации 1×10^5 и 1×10^7 организма на ml. Пречистени ДНК на вируси и плазмиди са анализирани при концентрация 4 ng/ml.

Следните бактерии са тествани и всички дават отрицателен резултат в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter Iwoffii* (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 hyorhinis*
- *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*

* Анализирани са както щамът на *E. coli*, използван за получаването на плазмидите (HB101), така и клиничен изолат от *E. coli*.

- *Staphylococcus aureus* (щам Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

Следните вирусни или плазмидни ДНК или човешки серум са тествани и всички дават отрицателен резултат в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Аденовирус 2
- Цитомегаловирус
- Вирус на Епщайн-Бар
- Положителен за повърхностен антиген на хепатит В серум
- Херпес симплекс I
- Херпес симплекс II
- Вирус на човешката имунна недостатъчност (ДНК на HIV, обратна транскриптаза (Reverse Transcriptase, RT))
- HPV тип 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 и 30
- Маймунски вирус тип 40 (SV40)

Единственият плазмид, проявил кръстосана реактивност в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, е pBR322. Кръстосана реактивност между pBR322 и сместа за сондата не се очаква да възникне, защото е трудно да се отдели цялата ДНК на вектора pBR322, когато се изолира вмъкнатата част на HPV. Има сведения за човешки генитални проби с хомологични на pBR322 секвенции и затова могат да се получат грешни положителни резултати при наличие на високи нива на бактериалните плаزمиди. Независимо от това, 298 клинични проби с положителни резултати от тестване с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test не дават положителни резултати поради pBR322, когато са тествани със сонда за pBR322. Затова вероятността от грешни положителни резултати от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test поради хомологични на pBR322 секвенции в клинични проби явно е малка.

Кръстосана хибридизация

Осемнадесет различни типа HPV (високорискови и нискорискови) са тествани с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test при концентрации 4 ng/ml ДНК на HPV. Всички високорискови прицелни HPV са положителни. На същото проучване се наблюдава и малко кръстосана хибридизация между HPV тип 6 и 42 и *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Пациентски проби с високи нива (4 ng/ml или повече) на HPV тип 6 или 42 може да дадат грешни положителни резултати с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Клиничната значимост на тази констатация е, че пациенти с 4 ng/ml или повече HPV тип 6 или 42 могат ненужно да получат направление за колпоскопия.

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test демонстрира също така кръстосана реактивност с HPV тип 40, 53 и 66. Тези типове са редки и има няма достатъчно данни за установяване на точна корелация между инфекция с тези типове и развитие на високостепенно заболяване (15). В литературата също така има сведения, че комплексни сонди, подобни на използваните в този тест, може да предизвикат грешни положителни резултати поради кръстосана хибридизация с HPV тип 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 или MM9 (35). Въпреки че няколко от тези типове HPV са редки или нови и не се срещат често с високостепенно заболяване, пациенти, чиито проби съдържат високи нива на ДНК на тези типове HPV, може погрешно да получат направление за колпоскопия.

Отражение на кръв и други вещества върху пробите в STM

Оценено е отражението на кръв и други потенциално интерфериращи определени или неопределени вещества в *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Цяла кръв, дамски душ, противогъбичен крем и противозачатъчен гел (които често се срещат в цервикални проби) са прибавени в отрицателни и положителни проби в STM (сборни клинични и неклинични проби) при концентрации, които се срещат в цервикални проби.

Грешни положителни резултати не са получени с нито едно от четирите вещества при нито една концентрация. Грешен отрицателен резултат може да бъде съобщен обаче при клинични проби с нива на ДНК на HPV, близки до стойността CO за теста (1 pg/ml), при наличие на високи концентрации на противогъбичен крем или противозачатъчен гел. Въпреки това е много малко вероятно една клинична проба да се състои почти изцяло от някое от тези вещества, защото цервиксът рутинно се почиства, преди да се взимат проби за цитонамазка и тестване за HPV.

Отражение на кръв и други вещества върху пробите в PreservCyt

Ръчна подготовка на аликвотни части

Оценено е отражението на кръв и други потенциално интерфериращи определени или неопределени вещества, които може да присъстват в проби в PreservCyt, върху *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Цяла кръв, дамски душ, противогъбичен крем и противозачатъчен гел (които често се срещат в цервикални проби) са прибавени в сборни отрицателни и положителни клинични проби в PreservCyt при концентрации, които се срещат в цервикални проби. Грешни положителни или грешни-отрицателни резултати не са получени с нито едно от 4-те вещества при нито една концентрация. Освен това веществата, характерни за някои клинични проби, не инхибират откриването на ДНК на HPV от *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Оценено е отражението на кръв и други потенциално интерфериращи вещества в проби в PreservCyt с QIASymphony DSP HPV Media Kit за подготовката на аликвотните части и автоматизираното тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Тествано е отражението на следните потенциално интерфериращи вещества:

- Противогъбичен крем
- Противовъзпалителен крем
- Кръв
- Противозачатъчен гел
- Дамски душ
- Женски дезодорант-супозитории
- Лубрикант
- Спермицид

Всяко вещество е прибавено в сборни отрицателни и положителни клинични проби. Грешни положителни или грешни-отрицателни резултати не са получени с нито едно от веществата при концентрации, които се срещат в цервикални проби. Грешен отрицателен резултат може да бъде съобщен обаче в клинични проби с нива на ДНК на HPV, близки до стойността CO за теста, при наличие на високи концентрации на противогъбичен крем, вагинален лубрикант или кръв. Въпреки това е много малко вероятно една клинична проба да се състои почти изцяло от някое от тези вещества, защото цервиксът рутинно се почиства, преди да се взимат проби за цитонамазка и тестване за HPV.

Подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Оценено е отражението на цяла кръв в проби в PreservCyt с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit за подготовката на аликвотните части и *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test за тестването. Видимо кървави клинични проби са избрани и тествани с двата метода – ръчна подготовка на аликвотните части и автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit. Сравнени са резултатите за 238 проби и са отчетени общо съвпадение на резултатите 94,12% и стойност „p“ на McNemar 0,2850, което показва, че няма статистически значима разлика в клиничните работни характеристики между метода за ръчна подготовка на аликвотните части и метода за автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

Тествано е отражението на следните потенциално интерфериращи вещества:

- Дамски душ
- Противогъбичен крем
- Противозачатъчен гел
- Мононуклеарни клетки от периферна кръв (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)
- Лубрикант
- Дамски спрей
- Спермицид
- Магнитни частици
- TopElute Fluid

Всяко вещество е прибавено в отрицателни и положителни сборни клетъчни проби при концентрации, които се срещат в цервикални проби или може да бъдат прибавени по време на подготовката на аликвотните части. Грешни положителни резултати не са получени при нито едно от веществата при нито една концентрация. Грешни отрицателни резултати не са получени, освен при противозачатъчния гел.

Не взимайте цервикална проба в PreservCyt за автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, ако има противозачатъчен гел.

Отражение на кръв и други вещества върху пробите в SurePath

Подготовка на аликувотните части от проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Оценено е отражението на кръв и други потенциално интерфериращи вещества в проби в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit за подготовката на аликувотните части и автоматизираното тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Тествано е отражението на следните потенциално интерфериращи вещества:

- Противогъбичен крем
- Противовъзпалителен крем
- Кръв
- Противозачатъчен гел
- Дамски душ
- Женски дезодорант-супозитории
- Лубрикант
- Спермицид

Всяко вещество е прибавено в сборни отрицателни и положителни клинични проби. Грешни положителни резултати не са получени с нито едно от веществата при концентрации, които се срещат в цервикални проби.

Грешни отрицателни резултати не са получени, освен при следните вещества:

- Противозачатъчният гел предизвиква грешни отрицателни резултати при много ниска концентрация.
- При висока концентрация на противогъбичен крем в пробата грешен отрицателен резултат може да бъде съобщен в клинични проби с нива на ДНК на HPV, близки до стойността CO за теста. Въпреки това е много малко вероятно една клинична проба да се състои почти изцяло от противогъбичен крем, защото цервиксът рутинно се почиства, преди да се взимат проби за цитонамазка и тестване за HPV.

Не взимайте цервикална проба в SurePath за автоматизирана подготовка на аликувотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit, ако има противогъбичен крем или противозачатъчен гел.

Подготовка на аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit

Оценено е отражението на кръв и други потенциално интерфериращи вещества в аликвотни части от клетъчни пелети след градиентно елуиране в SurePath с QIASymphony DSP HPV Media Kit за подготовката на аликвотните части и автоматизираното тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Тествано е отражението на следните потенциално интерфериращи вещества:

- Противогъбичен крем
- Противовъзпалителен крем
- Кръв
- Противозачатъчен гел
- Дамски душ
- Женски дезодорант-супозитории
- Лубрикант
- Спермицид

Всяко вещество е прибавено в сборни отрицателни и положителни клинични проби, които след това са обработени с BD PrepMate System, за да имитират аликвотна част от клетъчна пелета след градиентно елуиране в SurePath. По един грешен положителен резултат е получен за кръв и противогъбичен крем; статистическият анализ обаче не показва значителна интерференция. Грешни положителни резултати не са получени с нито едно от останалите вещества при концентрации, които се срещат в цервикални проби.

Грешни отрицателни резултати са получени за противогъбичен крем, противовъзпалителен крем и противозачатъчен гел. Не взимайте цервикална проба в SurePath за автоматизирана подготовка на аликвотните части с QIASymphony DSP HPV Media Kit, ако има противогъбичен крем, противовъзпалителен крем или противозачатъчен гел.

Пренасяне

RCS е конструирана за свеждане до минимум на замърсяването на пробите или пренасянето на остатъчна алкална фосфатаза при използване на връхчета за пипети за еднократна употреба за аспирирането на реактиви и проби. За да провери тази конструктивно заложена характеристика, QIAGEN провежда няколко проучвания, за да оцени дали използването на RCS увеличава вероятността за пренасяне или кръстосано замърсяване на проби в сравнение с използването на ръчния метод. Различни апарати RCS са използвани за оценката на потенциалното пренасяне от една система в друга.

В едно проучване 2 ng и 20 ng плазмидна ДНК на HPV са прибавени в материал за отрицателна контрола, за да бъдат приготвени високи положителни проби в STM. При концентрация 20 ng/ml са получени стойности RLU, около 3–5 пъти по-високи от тези при най-високата положителна клинична проба, която може да се очаква да постъпи при рутинно клинично тестване. Тези симулирани високи положителни проби са поставени по цялата микроплака в шахматно разположение с ямките, съдържащи само отрицателна контрола (ямки за теста). Тази конфигурация отчита потенциалното допълнително отражение на последователно обработваните високи положителни проби. Микроплаките са тествани след това по двата метода – ръчно и автоматизирано тестване с RCS. След обработката е сравнен броят на ямките за теста с грешни положителни резултати. При автоматизираното тестване с RCS не се получават повече ямки за теста с грешни положителни резултати от тези при ръчното тестване с тези симулирани проби в STM, дори когато на микроплаката има изключително много последователно обработвани положителни проби.

На втора оценка на пренасянето HPV-положителни пациентски проби в PreservCyt са комбинирани, за да се състави панел от проби с различни нива на хемилуминесценция със стойности RLU/CO, представителни за очаквания диапазон при рутинно клинично автоматизирано тестване с RCS. Положителните проби са в приблизителен диапазон 200–1800 RLU/CO. За оценка на потенциалното пренасяне, включително потенциалното отражение на последователно обработвани високи положителни проби, тези положителни проби от панела са поставени на микроплаки в шахматно разположение до отрицателни контролни ямки. Тези плаки са тествани след това по метода за автоматизирано тестване с RCS.

Въз основа на резултатите от тази оценка на пренасянето със сборни пациентски проби вероятността от получаване на грешни положителни резултати поради отражението на пренасянето е 0,3% при автоматизирано тестване с RCS с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Опитът на QIAGEN от провеждане на тестове със сборни проби в PreservCyt показва, че при събирането на пациентски проби в PreservCyt се получават проби, които нямат сходни характеристики с тези на отделните пациентски проби. Въпреки че отражението на това събиране върху вероятността за пренасяне при автоматизирано тестване с RCS е неизвестно, допълнителна предклинична проверка на автоматизираното тестване с RCS не показва повишена вероятност за грешни положителни резултати поради пренасяне. Тези оценки са направени с изкуствени плазмидни проби с концентрации на ДНК, близо 5 пъти по-високи от срещаните в клинични условия.

За трета оценка на пренасянето са приготвени тестови проби с прибавяне на флуоресцентен оцветител при концентрации, представителни за динамичния диапазон на RLU на анализа, в изходни матрикси с приблизителната гъстота на клиничните проби и реактивите на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Тези тестови проби след това са обработени с 3 отделни апарата RCS и е оценена вероятността за пренасяне на всяка от следните основни процедурни стъпки на RCS:

- Прехвърляне на проби
- Прехвърляне от една плака в друга
- Прибавяне на сонда
- Разбъркване на микроплаката на шейкър
- Промиване на микроплаката

Полученият флуоресцентен сигнал е измерен при дължина на вълната на възбуждане 485 nm и дължина на вълната на излъчване 535 nm с достатъчна чувствителност за откриване на случай на пренасяне в съотношение 1:20 000, което би съответствало на грешен положителен резултат с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (тоест 1 pg в 20 ng). Резултатите от тази оценка не показват нито един случай на пренасяне по време на нито една от основните процедурни стъпки на RCS, който би довел до грешен положителен резултат с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Стабилност на реактивите след зареждане в апарата

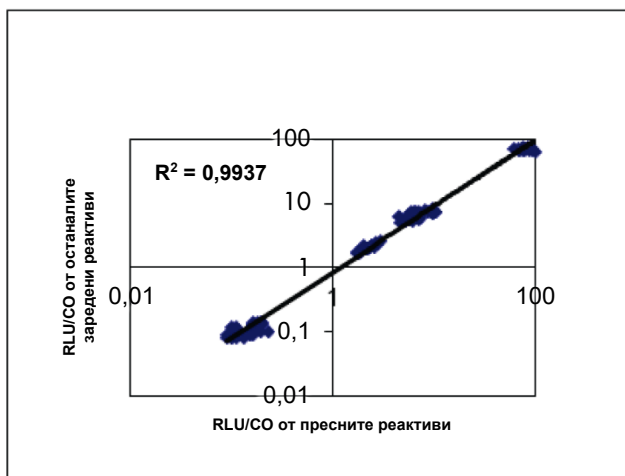
QIAGEN прави оценка на работните характеристики на автоматизираното тестване с RCS, когато се използват реактиви, оставащи продължително време заредени на платформата на системата. Реактивите, които е най-вероятно да останат заредени продължително време в апарата, са сместа за сондата, DR1, DR2 и микроплаката за улавяне.

Работните характеристики на теста са оценени както с прясно приготвени реактиви, така и с реактиви, останали заредени в апарата RCS при стайна температура в продължение на 16 часа (за симулация на 2 работни смени в лабораторни условия). Тестване на симулирани клинични проби е извършено с 2 апарата RCS във всеки от 2-та дни на тестването с определена конфигурация реактиви (вижте Таблица 55 по-долу).

Таблица 55. Конфигурация на проучването на стабилността на реактивите след зареждане в апарата

Апарат RCS	Ден 1	Ден 2
1	Останали заредени реактиви	Пресни реактиви
2	Пресни реактиви	Останали заредени реактиви

Графика с всички елементи с данни за RLU/CO е представена на Фигура 3 по-долу. Графиката и регресионният анализ показват съвпадение на резултатите от останалите заредени реактиви с резултатите от пресните реактиви.



Фигура 3. Сравнителна графика на стойностите от калибратори и контроли с останали заредени и пресни реактиви.

Допълнителна проверка на съвпадението на резултатите показва, че няма промяна в качествените резултати, когато се използват останали заредени реактиви (вижте Таблица 56 по-долу).

Таблица 56. Съвпадение на резултатите от пресни реактиви с резултатите от останали заредени реактиви

Статистическа величина	Резултат
Общо съвпадение (%)	100,0%
(n/N)	(96/96)
95% ДИ	97,97–100,0
Съвпадение на положителните резултати (%)	100,0%
(n/N)	(64/64)
95% ДИ	97,97–100,0
Съвпадение на отрицателните резултати (%)	100,0%
(n/N)	(32/32)
95% ДИ	97,97–100,0
R ²	0,9937
Слоуп	0,97
Интерсепт	0,47
Капа	1,0

Анализът на данните показва, че резултатите са статистически еднакви при пресни и останали заредени реактиви, което означава, че реактивите са достатъчно стабилни до 16 часа след зареждане в апарата.

Цитирани източници

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.

СИМВОЛИ

Символите в следващата таблица се използват при етикетирането на съответните продукти.

Символ	Определение на символа
 96/384	Съдържанието е достатъчно за 96/384 теста
	Код на партида
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Символ за CE-IVD маркировка
	Каталожен номер
	Производител
	Упълномощен представител в Европейската общност
	Използвайте до
	Ограничение на температурата
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Глобален номер на търговска единица

Ръководство за отстраняване на проблеми

Коментари и предложения

Не се наблюдава промяна на цвета или промяната е неправилна по време на денатуриране

- | | |
|--|---|
| a) DNR не е приготвен правилно | DNR трябва да съдържа индикаторния оцветител и трябва да бъде с тъмнолилав цвят. |
| b) DNR не е прибавен | DNR трябва да се прибави в пробата, като се измери нейният обем (очаква се 1,5 ml). Ако обемът показва, че не е прибавен DNR, прибавете, както следва, разбъркайте и продължете с изпълнението на теста, ако след това се наблюдава правилната промяна на цвета. |
| c) Пробата съдържа кръв или други материали, които възпрепятстват промяната на цвета | При такива видове проби промяната на цвета не се очаква да бъде точно описаната; това не би следвало да се отрази на резултатите от теста. |
| d) рН на пробата може да е необичайно киселинна | Ако нито една от другите причини не е налице, пробата може да е необичайно киселинна и тогава очакваната промяна на цвета няма да се наблюдава. Вземете нова проба преди обработката на цервикса с оцетна киселина, защото неподходящата рН на пробата ще се отрази неблагоприятно на резултатите от теста. |

Коментари и предложения

Контролите дават грешни резултати

- a) За теста е избран грешен протокол за анализа Ако протоколът за анализа е грешен за извършвания тест, измерете отново микроплаката в рамките на 30 минути след прибавянето на DR2 с правилния протокол за анализа.
- b) Разменени са местата на QC1-LR и QC2-HR Тествайте отново пробите.
- c) Разменени са местата на HRC и QC2-HR Тествайте отново пробите.

Неправилна промяна на цвета се наблюдава по време на хибридизация

- a) Недостатъчно разбъркване на сместа за сондата с денатурираните калибратори, контролите и/или пробите; или не е прибавена смес за сондата; или е прибавен грешен обем реактив Разбъркайте микроплаката за хибридизация или статива с микроепруветки на шейкъра още 2 минути. Ако има микроепруветки или ямки на микроплаката, които са останали лилави, прибавете още 25 µl от правилната смес за сондата и разбъркайте добре. Ако след прибавянето на сместа за сондата и повторното разбъркване пак не се наблюдава правилната промяна на цвета и пробата не е съдържала кръв или други материали, тествайте повторно пробата.
- b) Пробата съдържа кръв или други материали, които възпрепятстват промяната на цвета При такива видове проби промяната на цвета не се очаква да бъде точно описаната; това не би следвало да се отрази на резултатите от теста.
- c) Пробата е съдържала < 1000 µl STM Проверете обема на изходната проба. Обемът трябва да бъде 1425 µl ± 20 µl (след отделянето на 75 µl аликвотна част за тестване). Ако обемът е < 1425 µl, изходната проба е съдържала < 1000 µl STM. Вземете нова проба.

Коментари и предложения

Тестът не издържа валидирането; не е засечен сигнал при положителните калибратори, контролите или пробите

- a) Не е прибавена сонда в дилуента за сондата
- Пригответе сместа за сондата, както е описано в тези инструкции за употреба. Надпишете внимателно епруветките.
- b) Сондата е замърсена с рибонуклеаза по време на подготовката
- Използвайте връхчета с аерозолна бариера за пипетите, когато пипетирате сондата, и носете ръкавици. Пригответе сместа за сондата в стерилен контейнер. Използвайте само чисти, нови съдове за еднократна употреба за реактиви.
- c) Недостатъчно разбъркване на сместа за сондата
- След прибавянето на сондата в дилуента за сондата разбъркайте много добре на вортекса на висока скорост поне 5 секунди. Трябва да се вижда характерният въртоп.
- d) Недостатъчно разбъркване на сместа за сондата и денатурираната проба
- След прибавянето на сместа за сондата и пробата във всяка ямка на микроплаката за хибридизация или микроепруветка за хибридизация разбъркайте на Rotary Shaker I, настроен на 1100 ± 100 оборота в минута, 3 ± 2 минути. Проверете за промяна на цвета от лилав на жълт във всяка ямка на микроплаката или микроепруветка.
- e) Неправилно време или температура по време на стъпката за хибридизация
- Хибридизирайте 60 ± 5 минути при 65 ± 2 °C. Проверете температурата на Microplate Heater I или водната баня. Microplate Heater I или водната баня трябва да бъдат настроени да загряват пробите до правилната температура и да се подгреят 60 минути преди употреба. Нивото на водата трябва да бъде достатъчно, за да се загреят пробите до правилната температура. Водната баня трябва редовно да се калибрира.

Коментари и предложения

- | | |
|---|---|
| f) Недостатъчно разбъркване по време на стъпката за улавяне | Разбъркайте 60 ± 5 минути на Rotary Shaker I при $20-25^{\circ}\text{C}$, както е описано в тези инструкции за употреба. Проверете калибрираната скорост на Rotary Shaker I. (Информация ще намерите в ръководството за потребителя на Rotary Shaker I). |
| g) Не е прибавено точното количество DR1 или инкубацията не е продължила посоченото време | Пипетирайте $75\ \mu\text{l}$ DR1 във всяка ямка на микроплаката с 8-канална пипета. Инкубирайте при $20-25^{\circ}\text{C}$ $30-45$ минути. |
| h) Не е прибавено точното количество DR2 или инкубацията не е продължила посоченото време | Пипетирайте $75\ \mu\text{l}$ DR2 във всяка ямка на микроплаката с 8-канална пипета. Инкубирайте при $20-25^{\circ}\text{C}$ $15-30$ минути. |
| i) Неизправност или грешно програмиране на апарата DML | Прочетете допълнителните инструкции в съответното ръководство за потребителя на апарата DML и ръководството за потребителя на софтуера или се обърнете към „Техническо обслужване“ на QIAGEN. |

Повишени стойности на RLU в калибраторите, контролите и/или пробите (≥ 200 RLU в много или всички ямки на микроплаката); тестът може да не издържи валидирането

- | | |
|---|---|
| a) DNR не е прибавен; прибавен е грешен обем реактив; недостатъчно разбъркване на DNR с пробите, калибраторите или контролите | Проверете дали пипетата с многократно действие накапва точно, преди да прибавяте DNR. Задължително трябва да се използват калибрирани пипети. Прибавете половин обем DNR във всяка епруветка и разбъркайте добре. За да се предотвратят грешни положителни резултати, течността трябва да мие цялата вътрешна повърхност на епруветката. Калибраторите, контролите и пробите трябва да станат лилави след прибавяне на DNR. |
|---|---|

Коментари и предложения

- | | |
|---|--|
| b) В апарата DML прониква светлина; вратата не се затваря добре; уплътнението около вратата е повредено | Проверете фоновите стойности (измерване на сурови данни) на апарата DML, като измерите празна микроплака. Показание над 50 RLU означава, че влиза светлина. Прочетете инструкциите в съответното ръководство за потребителя на апарата DML или се обърнете към „Техническо обслужване“ на QIAGEN. |
| c) Замърсяване на DR2 или ямки на микроплаката за улавяне с DR1 или екзогенна алкална фосфатаза | Вижте „Проверка за замърсяване на DR2“ на страница 134. |
| d) Замърсен буфер за промиване | Вижте „Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода“ на страница 134. |
| e) Замърсен Automated Plate Washer | Вижте „Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода“ на страница 134. |
| f) Недостатъчно промиване на ямките на микроплаката за улавяне след инкубация на DR1 | Промийте щателно ямките на микроплаката за улавяне с буфер за промиване 6 пъти – с препълване на ямките или с Automated Plate Washer. След промиването в ямките на микроплаката не трябва да се забелязва остатъчна розова течност. В <i>ръководството за потребителя на Automated Plate Washer</i> ще намерите инструкции за проверките за замърсяване или неизправности. |
| g) Замърсяване на ямките на микроплаката с DR1 | Всички работни повърхности трябва да бъдат чисти и сухи. Внимавайте, когато боравите с DR1. Избягвайте аерозоли. |

Коментари и предложения

- | | |
|--|---|
| h) Попиване на разтвор за хибридизация с една и съща част на кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички | Не попивайте с вече използвани кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички. |
| i) Използване на неподходящи кърпички за попиване | Използвайте кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички за попиване. |

Ниски съотношения PC/NC или висок брой ниски положителни проби със съотношения < 2,0 (> 20%); тестът може да не издържи валидирането

- | | |
|---|---|
| a) Недостатъчна подготовка на пробата | <p>Прибавете точния обем DNR и разбъркайте добре на вортекса. За да се предотвратят грешни положителни резултати, течността трябва да мие цялата вътрешна повърхност на епруветката.</p> <p>За проби в PreservCyt клетъчната пелета трябва да бъде добре разбъркана и ресуспендирана преди денатурирането и инкубацията.</p> <p>Трябва да се забелязва ясна промяна на цвета от прозрачен до тъмнолилав. Инкубирайте 45 ± 5 минути при 65 ± 2 °C.</p> |
| b) Сместа за сондата не е достатъчно разбъркана или не е прибавена достатъчно смес за сондата | Пригответе сместа за сондата, както е описано. Разбъркайте добре на вортекса – трябва да се вижда характерният въртоп. Сместа за сондата трябва да се прибавя в епруветките с пипета „резила“ или многоканална пипета, за да се осигури точно на капване. |

Коментари и предложения

- | | |
|---|--|
| c) Недостатъчен обем смес за сондата е прибавен във всяка микроепруветка за хибридизация или ямка на микроплаката | Проверете дали 8-каналната пипета налива точно, преди да прибавяте сместа за сондата. Прибавете 25 µl смес за сондата във всяка микроепруветка или ямка на микроплаката, съдържаща денатурирани калибратори, контроли и проби. Цветът трябва да се промени от тъмнолилав на жълт след прибавяне и добро разбъркване. Пробите в PreservCyt трябва да порозовеят, вместо да пожълтеят. |
| d) Загуба на активност на DR1 | Съхранявайте DR1 при 2–8 °C. Използвайте преди датата на изтичане на срока на годност. |
| e) Недостатъчно улавяне | Стъпката за улавяне трябва да се изпълни на Rotary Shaker I, настроен на 1100 ± 100 оборота в минута. Проверете калибрираната скорост на шейкьра. |
| f) Недостатъчно промиване | Промийте щателно ямките на микроплаката с буфер за промиване 6 пъти – с препълване на ямките или с Automated Plate Washer. |
| g) Замърсен буфер за промиване | Вижте „Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода“ на страница 134. |

Поредица от положителни проби с приблизително еднакви стойности на RLU

- | | |
|---|--|
| a) Замърсяване на ямките на микроплаката за улавяне по време на теста | Покривайте микроплаката за улавяне по време на всяка инкубация. Предотвратявайте замърсяването на епруветките с аерозоли, докато извършвате анализа. Носете ръкавици без талк по време на манипулациите. |
| b) Замърсяване на DR2 | Внимавайте да не замърсите течността, когато пипетирате DR2 в ямките на микроплаката за улавяне. Предотвратявайте замърсяване на DR2 с аерозоли от DR1, прах в лабораторията и пр. |

Коментари и предложения

- c) Неизправност в Automated Plate Washer В „Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода“ на страница 134 или в *ръководството за потребителя на Automated Plate Washer* ще намерите инструкции за проверките за замърсяване или неизправности.

Големи разлики в CV между репликите

- a) Неточно пипетиране Проверете дали пипетата налива последователно точните обеми. Калибрирайте редовно пипетите.
- b) Недостатъчно разбъркване Разбърквайте добре на всички стъпки. Разбърквайте на вортекса преди и след денатурирането и инкубацията и след прибавянето на сместа за сондата. Трябва да се вижда характерният въртоп.
- c) Непълно прехвърляне на течността от микропруветките за хибридизация или ямките на микроплаката за хибридизация в ямките на микроплаката за улавяне Проверете дали последователно се прехвърлят точните обеми по време на стъпката за прехвърляне от микроплаката за хибридизация или микропруветките за хибридизация в ямките на микроплаката за улавяне.
- d) Неправилна процедура за промиване Промийте щателно ямките на микроплаката с буфер за промиване 6 пъти – с препълване на ямките или с Automated Plate Washer.
- e) Замърсяване на ямките на микроплаката с DR1 Всички работни повърхности трябва да бъдат чисти и сухи. Внимавайте, когато боравите с DR1. Избягвайте аерозоли.

Коментари и предложения

Грешни положителни резултати се получават от известни отрицателни проби

- a) DR2 е замърсен Внимавайте да не предизвикате кръстосано замърсяване на пробите, когато отделяте аликвотни части от DR2 между пробите. Ако използвате само част от набора, отделете само необходимия обем за съответния тест в чист резервоар за реактив за еднократна употреба, преди да пълните пипетата.
- b) Замърсяване на ямките на микроплаката с DR1 Промийте щателно ямките на микроплаката с буфер за промиване 6 пъти – с препълване на ямките или с Automated Plate Washer. След промиването в ямките на микроплаката не трябва да се забелязва остатъчна розова течност.
- c) Попиване на няколко реда с една и съща част на кърпички Kimtowels или еквивалентни немъхести хартиени кърпички Не попивайте с вече използвана част от кърпичката.
- d) Недостатъчна подготовка на пробата Прибавете точния обем DNR и разбъркайте добре на вортекса. За да се предотвратят грешни положителни резултати, течността трябва да мие цялата вътрешна повърхност на епруветката.

За ръчна подготовка на проби в PreservCyt клетъчната пелета трябва да бъде добре разбъркана и ресуспендирана преди денатурирането и инкубацията. Информация ще намерите в инструкциите за употреба на *digene* HC2 Sample Conversion Kit.

Трябва да се забелязва ясна промяна на цвета от прозрачен до тъмнолилав. Инкубирайте 45 ± 5 минути при 65 ± 2 °C. За ръчна подготовка на проби в SurePath пробите трябва да се инкубират 90 ± 5 минути при 65 ± 2 °C.

Коментари и предложения

- | | |
|---|---|
| e) Неправилна процедура за промиване | Промийте щателно ямките на микроплаката с буфер за промиване 6 пъти – с препълване на ямките или с Automated Plate Washer. |
| f) Замърсяване на връхчето на пипетата с неденатуриран материал по време на прехвърляне на денатурираната проба в микроепруветката за хибридизация или ямката на микроплаката за хибридизация | Процедурата за обработка на стъпката за денатуриране на пробата трябва да се извърши, както е указано в тези инструкции за употреба. Неправилно разбъркване на пробите на вортекса, обръщане и бъркане на епруветките могат да доведат до непълно денатуриране на неспецифични РНК–ДНК хибриди, ендогенни за цервикални проби. Специално за пробите в PreservCyt или SurePath тези хибриди е вероятно да присъстват на вътрешните стени на епруветката за денатуриране на пробата. За да се предотврати пренасяне на такъв неденатуриран клетъчен материал, връхчето на пипетата не трябва да докосва страните на епруветката за денатуриране на пробата по време на прехвърлянето на денатурираната проба в микроепруветката за хибридизация или ямката на микроплаката за хибридизация. |

Повишени стойности RLU (> 200 RLU) за NC; останалата част от теста работи според очакванията

- | | |
|--|---|
| a) DR2 е бил инкубиран при температура, по-висока от 20–25 °C | Изпълнете отново теста, като следите стъпките за улавяне и откриване да се изпълняват с инкубация при 20–25 °C. |
| b) DR2 е бил инкубиран повече от 30 минути | Измерете микроплаката след 15 (но не повече от 30) минути инкубация при 20–25 °C. |
| c) DR2 или буферът за промиване е бил замърсен с алкална фосфатаза или DR1 | Вижте „Проверка за замърсяване на DR2“ на страница 134 или „Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода“ на страница 134. |

Коментари и предложения

Тестът не издържа валидирането; повишени стойности на РС \bar{X} /NC \bar{X}

Разменени са местата на HRC и QC2-HR

Тествайте отново пробите. Четете внимателно етикетите на шишетата с калибратори и контроли, за да предотвратите размяна на местата на тези реактиви.

Проверка за замърсяване на DR2

1. Пипетирайте 75 µl от аликвотната, остатъчната част или оригиналното шише с DR2 в празна ямка на микроплаката за улавяне.

Забележка: Тестване на DR2 в 3 репликата осигурява оптимална оценка на работните характеристики.

2. Инкубирайте при 20–25 °C 15 минути. Избягвайте излагане на пряка слънчева светлина.
3. Измерете микроплаката с апарат DML.

Стойността за контролния DR2 трябва да бъде < 50 RLU.

Ако стойностите за DR2 са < 50 RLU, DR2 може да се използва за повтаряне на теста.

Ако е замърсен (> 50 RLU), вземете нов набор и повторете теста.

Проверка за замърсяване на апаратурата за промиване и/или източника на вода

1. Надпишете ямки 1–4. Пипетирайте 75 µl DR2 в 4 отделни ямки на микроплаката за улавяне.

Ямка 1 служи за контролен DR2.

2. Пипетирайте 10 µl буфер от шишето за промиване в ямка 2 на микроплаката.
3. Оставете буфера да тече по шлаухите за промиване. Пипетирайте 10 µl буфер за промиване от шлаухите в ямка 3 на микроплаката.
4. Вземете аликвотна част от водата, използвана за приготвянето на буфера за промиване. Пипетирайте 10 µl от водата в ямка 4 на микроплаката.
5. Инкубирайте при 20–25 °C 15 минути. Избягвайте излагане на пряка слънчева светлина.
6. Измерете микроплаката с апарат DML.

Стойността за контролния DR2 (ямка 1) трябва да бъде < 50 RLU.

Сравнете RLU от ямки 2, 3 и 4 с RLU за контролния DR2. Отделните RLU за ямки 2, 3 и 4 не трябва да превишават 50 RLU от RLU за контролния DR2.

Стойности над 50 RLU от RLU за контролния DR2 показват замърсяване. В „Метод за ръчно промиване“ на страница 55 ще намерите инструкции за почистването и поддръжката на апаратурата за промиване.

Проверка за замърсяване на Automated Plate Washer

1. Надпишете ямки 1-5. Пипетирайте 75 µl DR2 в 5 отделни ямки на микроплаката за улавяне.
Ямка 1 служи за контролен DR2.
2. Пипетирайте 10 µl буфер от шишето за промиване на Plate Washer в ямка 2 на микроплаката.
3. Пипетирайте 10 µl течност от шишето за изплакване на Plate Washer в ямка 3 на микроплаката.
4. Натиснете бутона **Prime** (Запълване) на клавиатурата на Plate Washer, за да протече буфер за промиване по тръбопроводите. Пипетирайте 10 µl буфер за промиване от улея в ямка 4 на микроплаката.
5. Натиснете бутона **Rinse** (Изплакване) на клавиатурата на Plate Washer, за да протече течност за изплакване по тръбопроводите. Пипетирайте 10 µl буфер за промиване от улея в ямка 5 на микроплаката.
6. Затворете и инкубирайте 15 минути при 20–25 °C. Избягвайте излагане на пряка слънчева светлина.
7. Измерете микроплаката с апарат DML.

Стойността за контролния DR2 (ямка 1) трябва да бъде < 50 RLU.

Сравнете RLU от ямки 2, 3, 4 и 5 с RLU за контролния DR2. Отделните RLU за ямки 2, 3, 4 и 5 не трябва да превишават 50 RLU от RLU за контролния DR2.

Стойности над 50 RLU от RLU за контролния DR2 показват замърсяване на Plate Washer.

В *ръководството за потребителя на Automated Plate Washer* ще намерите процедурата за обеззаразяване.

Информация за контакт

Информация за връзка с местния представител на QIAGEN ще намерите в листовката за връзка с QIAGEN, доставена с набора за теста.

Значими промени

Съществените промени в тази редакция на инструкциите за употреба на *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test са обобщени в следващата таблица:

Раздел	Страница	Промяна (Промени)
Предупреждения и предпазни мерки	20	Нова информация за Глобалната хармонизирана система за класифициране и етикетиране на химични вещества (GHS)
Проби от цервикална биопсия	26	Тъкани от биопсия до 5 mm
Търговски марки	139	Изтрети патенти

Тази страница умишлено е оставена празна

Търговски марки: 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); PreservCy® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Регистрираните наименования, търговски марки и пр., използвани в този документ, дори да не са изрично обозначени като такива, не следва да се считат за незащитени от закона.

Ограничено лицензно споразумение за *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test

Използването на продукта означава, че закупилите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящата листовка, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да е компоненти, които не са включени в него, с изключенията, описани в протоколите, предоставени с продукта и настоящата листовка.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават, освен ако не е посочено друго от QIAGEN.
4. QIAGEN изрично се освобождава от отговорност за всякакви други лицензи – явни или подразбиращи се – освен изрично посочените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които могат да улеснят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

Актуалните условия на лиценза ще намерите на www.qiagen.com.

© 2012–2018 QIAGEN, всички права запазени.

