

digene[®] HC2 HPV DNA -kokeen käyttöohjeet

IVD

Σ 96

Mikrolevyjen kemiluminesenssiin perustuva signaalia vahvistava in vitro - nukleinihappohybridisointianalyysi kahdeksantoista matalan riskin ja korkean riskin ihmisen papilloomavirus (HPV) -tyypin DNA:n kvalitatiiviseen tunnistukseen kohdunkaulanäytteistä.

Tarkoitettu käytettäväksi seuraavien kanssa:

digene HC2 DNA Collection Device -laite, jolla kerätään näytteet

digene Specimen Transport Medium (näytteiden siirtoaine)

Hologic PreservCyt[®] -liuos

BD SurePath[®] -säilöntäaine



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
SAKSA

L2126fi Versio 4



SISÄLLYSLUETTELO

NIMI JA KÄYTTÖTARKOITUS	1
TIIVISTELMÄ JA SELITYKSET	2
ANALYYSIMENETELMÄN TOIMINTAPERIAATE	3
TOIMITETUT REAGENSIT JA MATERIAALIT	4
TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY PAKKAUKSEEN	5
VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET	7
VAROTOIMET	7
TARVIKESARJAN OSIEN TURVA- JA VAARALAUSEKKEET	7
KÄSITTELYÄ KOSKEVAT VAROTOIMET	9
REAGENSIIEN VALMISTUS JA SÄILYTYS	10
NÄYTTEIDEN OTTAMINEN JA KÄSITTELY	14
KOHDUNKAULANÄYTTEET NÄYTTEENSIIRTOAINEESSA (STM)	14
KOHDUNKAULAN KOEPALAT	14
KOHDUNKAULANÄYTTEET PRESERVCYT-LIUOKSESSA	14
KOHDUNKAULANÄYTTEET SUREPATH-SÄILÖNTÄNESTEESSÄ	15
KOEMENETELMÄ	16
RAPID CAPTURE SYSTEM -JÄRJESTELMÄN KÄYTTÄMINEN SUURTEN NÄYTEMÄÄRIEN TEHOKKAASSA TESTAUKSESSA	16
MANUAALINEN MENETELMÄ	16
DENATUROIINTI	17
VORTEKSOINTI JA DENATUROIINTI	21
HYBRIDISOINTI: YHDISTELMÄKOETINSEOSTA (CPC) KÄYTTÄVÄ MENETELMÄ JA KAHDEN KOETTIMEN MENETELMÄ	23
HYBRIDIN SIEPPAUS	25
HYBRIDIN TUNNISTUS	26
PESEMINEN	27
SIGNAALIN VAHVISTUS	28
ANALYYSIN KALIBROINNIN VARMENNUSKRITERIT	29
RAJA-ARVON LASKENTA	32
LAADUNTARKKAILU	33
NÄYTTEIDEN TULOSTEN TULKINTA	34
SUORITUSKYKYOMINAISUUDET	35
MATALAN RISKIN JA KORKEAN RISKIN HPV-KÄYTTÖAIHETTA TUKEVAT TIEDOT	35
KORKEAN RISKIN HPV-SEULONTAKOKEEN KÄYTTÖAIHETTA TUKEVAT TIEDOT	39
ANALYYTTINEN HERKKYYS	42
YHDISTELMÄKOETINSEOSTA (CPC) KÄYTTÄVÄN MENETELMÄN SUORITUSKYKY	42
STM-NÄYTTEIDEN JA PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VÄLINEN EKVIVALENSSI	43
SUREPATH-NÄYTTEEN TULOSTEN KORRELAATIO STM-NÄYTTEIDEN KANSSA KLIINISISSÄ POPULAATIOSSA	43
TOISTETTAVUUS	44
KORKEAN RISKIN HPV-KOETIN	44
RISTIREAGOINTI	45
RISTIREAKTIIVISUUSPANEELI	45
RISTIHYBRIDISOITUMINEN	46
VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS STM-NÄYTTEISIIN	46
VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS PRESERVCYT-LIUOKSESSA OLEVIIN NÄYTTEISIIN	46
<i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA -KOKOON TOISTETTAVUUS KLIINISILLÄ, STM:ÄÄN KERÄTYILLÄ NÄYTTEILLÄ	46
RLU/CO	47
<i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA -KOKOON TOISTETTAVUUS KLIINISILLÄ, PRESERVCYT-LIUOKSEEN KERÄTYILLÄ NÄYTTEILLÄ	47
RLU/CO	48
<i>DIGENE</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA -KOKOON TOISTETTAVUUS SUREPATH-SÄILÖNTÄNESTEESÄ KERÄTYILLÄ NÄYTTEILLÄ	48

SUREPATH-TULOKSEN TOISTETTAVUUS KÄYTETTÄESSÄ RAPID CAPTURE SYSTEM - JÄRJESTELMÄÄ ANALYYSIN KÄSITTELYSSÄ	49
MENETELMÄN RAJOITUKSET	50
VIITTEET	51
VIANETSINTÄOPAS	54
KONTAMINAATIOTARKISTUS	58
QIAGEN YHTEYSTIEDOT	59

NIMI JA KÄYTTÖTARKOITUS

In vitro -diagnostiseen käyttöön.

Hybrid Capture® 2 (HC2) -tekniikkaa käyttävä *digene* HC2 HPV DNA -koe on kemiluminesenssipohjainen mikrolevyllä suoritettava signaalia vahvistava nukleinihappohybridisointianalyysi, jolla tunnistetaan kvalitatiivisesti HPV-DNA:n kahdeksantoista matalan ja korkean riskin tyyppiä kohdunkaulanäytteistä.

digene HC2 HPV DNA -kokeella voidaan tutkia seuraavanlaisia kohdunkaulanäytteitä:

- *digene* HC2 DNA Collection Device -näytteenottolaitteella otetut näytteet
- harjalla otetut tai harjan/lastan yhdistelmällä otetut näytteet, jotka on asetettu PreservCyt-liuokseen (katso tarkemmat tiedot *digene* HC2 Sample Conversion Kit -käyttöohjeesta)
- SurePath-säilöntänesteeseen otetut näytteet (VAIN korkeariskiset HPV DNA -kokeet)
- *digene* Specimen Transport Medium (STM) -näytteesiirtoaineeseen otetut koepalat.

Käytettäessä matalan ja korkean riskin HPV-koettimia tämän kokeen käyttö on vasta-aiheista seuraavissa tapauksissa:

- sukupuoliteitse tarttuvien HPV-infektioiden diagnosointi, kun kyseessä ovat HPV-tyypit 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68
- kahden eri HPV DNA ryhmän erottaminen toisistaan: matalan riskin HPV-tyyppien 6, 11, 42, 43 ja 44 ja korkean riskin HPV-tyyppien 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68. Tietyn HPV-tyypin läsnäoloa ei kuitenkaan voida havaita.

Kun käytetään korkean riskin HPV-koetinta, tämän kokeen käyttö on vasta-aiheista seuraavissa tapauksissa:

- korkean riskin HPV-tyyppien 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 tunnistus; näiden HPV-tyyppien on osoitettu olevan ensisijainen syysuhdetekijä kohdunkaulan syövän kehittämisessä.
- alustavana perusväestön seulontakokeena, joko yksin tai yhdessä Papa-kokeen kanssa, sellaisten naisten tunnistamiseksi, joilla on lisääntynyt riski sairastua kohdunkaulan syöpään tai joilla on korkea-asteinen kohdunkaulan sairaus; HPV-diagnoosi osoittaa iän lisääntymisen myötä yhä voimakkaammin kohdunkaulan sairauden
- seurantakokeena potilailla, joiden Papa-näytteessä on ilmennyt poikkeavuutta tai joilla on kohdunkaulan sairaus, määrittämään kolposkopian tai muiden jatkotoimenpiteiden tarpeellisuus.
- seurantakokeena potilailla, joilla on Papa-kokeessa todettu matala-asteinen kohdunkaulan intraepiteelinen leesio (LSIL) tai korkea-asteinen kohdunkaulan intraepiteelinen leesio (HSIL) ennen kolposkopiaa. Näiden potilaiden *digene* HC2 HPV DNA -koetulokset auttavat lääkäreitä potilashallinnassa, sillä ne tukevat naisten riskinarviointia korkea-asteisen sairauden poissulkemiseksi.

digene HC2 HPV DNA -kokeen tuloksia on tarkasteltava yhdessä muiden diagnostisten- ja seulontakokeiden kliinisten tietojen, lääkärin tutkimusten ja sairauskertomustietojen kanssa asianmukaisten potilaan hoitomenetelmien mukaisesti. *digene* HC2 HPV DNA -kokeen tuloksia **ei yksinään** tule käyttää potilaan kliinisen arvioinnin ja hoidon perusteena.

TIIVISTELMÄ JA SELITYKSET

Tietyt naisen genitaalialueella esiintyvät HPV-tyypit liittyvät useisiin sairauksiin, mukaan lukien kondylooma, bowenoidi papuloosi, kohdunkaulan, vaginan ja vulvan intraepiteelieoplasiat ja karsinoma. (1-3). Yleinen käsitys on, että nämä virukset tarttuvat pääasiallisesti sukupuoliteitse, ja korkean riskin HPV-tyyppien on todettu olevan pääasiallisia riskitekijöitä kohdunkaulan syövän kehittymiselle.⁴⁻⁸

Ihmisen papilloomavirukset koostuvat ikosahedraalisesta viruspartikkelista (virioni), joka sisältää proteiinikapsidin ympäröimän, 8000 emäsparin kokoisen kaksijuosteisen rengasmaisen DNA-molekyylin. Epiteelisolujen infektoiduttua virus-DNA jää pysyvästi epiteeliin koko sen paksuudelle, mutta ehjiä virioneja esiintyy vain kudoksen ylemmissä kerroksissa. Sen vuoksi virus-DNA:ta todetaan joko virioneissa tai episomaaleina tai integroituina HPV-sekvensseinä leesio tyypin ja asteen mukaan.

Tähän saakka HPV:n in vitro -viljely ei ole ollut mahdollista eikä immunologisin testein ole pystytty osoittamaan kohdunkaulan HPV-infektiota. Epäsuoraa näyttöä anogenitaalisesta HPV-infektiosta voidaan saada lääkärintarkastuksessa tai kun Papa-näytteissä tai koepaloissa havaitaan tyyppillisiä virusten replikoitumiseen liittyviä solumuutoksia. Vaihtoehtoisesti koepalat voidaan analysoida nukleiinihappohybridisoinnilla HPV:n DNA:n toteamiseksi suoraan.

HPV 16- ja HPV 18 -tyyppejä on pidetty korkean syöpäriskin HPV-tyyppeinä ja tyyppinä 6 ja 11 matalan riskin HPV-tyyppeinä.⁸⁻¹⁰ Lisäksi HPV-tyyppeihin 31, 33 ja 35 on osoitettu liittyvän kohtalainen syöpätautien todennäköisyys.^{2,11-14} Näistä hyödyllisistä käsitteellisistä jaotteluista huolimatta nämä 7 HPV-tyyppiä liittyvät vain noin 70 %:iin kohdunkaulan neoplasmatapauksista.⁹⁻¹¹ Muita HPV-tyyppejä, mukaan lukien tyypit 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68, on tunnistettu keskeisimmiksi HPV-tyypeiksi, joita havaitaan muunlaisissa leesioissa^{15-20,32-36}. Nämä HPV-tyypit voidaan luokitella myös matalan, keskiasteen ja korkean riskin ryhmiin sen mukaan millainen niiden suhteellinen jakauma on eri histopatologisissa diagnoosiluokituksissa.^{21, 32-37}

Vaikka HPV-DNA:ta on todettu esiintyvän noin 10 %:lla naisista, joilla kohdunkaulan epiteeli on normaali, todelliseen esiintyvyyteen tietyissä naisryhmissä vaikuttavat voimakkaasti ikä ja muut väestölliset muuttujat.^{2,10,21,31} Tutkimukset ovat osoittaneet, että 15–28 %:lle HPV-DNA-positiivisista naisista kehittyy okasolujen intraepiteelinen neoplasia (SIL) kahden vuoden sisään, kun taas HPV-DNA-negatiivisilla naisilla vastaava luku on 1-3 %.^{22,23} Varsinkin HPV-tyyppien 16 ja 18 etenemisriski on suurempi (noin 40 %) kuin muilla HPV-tyypeillä.²²

ANALYYSIMENETELMÄN TOIMINTAPERIAATE

HC2-tekniikkaa hyödyntävä *digene* HC2 HPV DNA -koe on signaalivahvistettu hybridisointivasta-aineen sieppausanalyysi, jossa käytetään mikrolevyjen kemiluminesenssipohjaisesta tunnistusta. Kohde-DNA:ta sisältävät näytteet hybridisoituvat spesifiseen HPV-RNA-koettimeen. Näin syntyneet RNA:DNA-hybridit siepataan RNA:DNA-hybrideille spesifisillä vasta-aineilla pinnoitettuun mikrolevyn kuoppaan. Seuraavaksi immobilisoituneiden hybridien annetaan reagoitua alkaliseen fosfataasiin konjugoituihin, RNA:DNA-hybridispesifisiin vasta-aineisiin, ja ne havaitaan kemiluminesenssisubstraattilla. Kuhunkin vasta-aineeseen konjugoituu useita alkalisia fosfataasimolekyylejä. Lukuisat konjugoituneet vasta-aineet sitoutuvat kuhunkin siepattuun hybridiin, mikä aiheuttaa huomattavan signaalin vahvistumisen. Kun sitoutunut alkalinen fosfataasi pilkkoo substraatin, syntyy valoa, jota mitataan suhteellisina valoyksikköinä (Relative Light Unit, RLU) luminometrillä. Syntyvän valon voimakkuus ilmaisee, sisältääkö näyte kohde-DNA:ta vai ei.

Mittauksessa saatu RLU-arvo, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin raja-arvo, osoittaa näytteessä olevan HPV-DNS-sekvenssejä. Raja-arvoa pienempi RLU-tulos osoittaa, että näytteessä ei ole spesifisiä HPV-DNA-sekvenssejä tai että HPV-DNA-tasot jäävät alle analyysin havaitsemisrajan.

Suurten näytemäärien tehokas testaus *digene* HC2 HPV DNA -kokeella onnistuu Rapid Capture[®] System (RCS) -järjestelmää käyttämällä. RCS-laite pystyy käsittelemään jopa 352 näytettä kahdeksassa tunnissa. Suurien näytemäärien tehokas testaaminen on mahdollista, kun analyysin kaikissa menetelmävaiheissa käytetään RCS-järjestelmää, pois lukien näytteen denaturointi, kemiluminesenssisignaalin havaitseminen ja tulosten raportointi.

TOIMITETUT REAGENSIT JA MATERIAALIT

Yhdessä digene HC2 HPV DNA -kokeen tarvikesarjassa (tuotenumero 5196-1330) on 96 koetta. Potilastulosten määrä vaihtelee tarvikesarjakohtaisen käyttömäärän mukaan:

1 käyttö = 40 potilastulosta (matala ja korkea riski)

2 käyttöä = 32 potilastulosta (matala ja korkea riski)

- 1 x 0,35 ml **Ilmaisinväri**
Sisältää 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 50 ml **Denaturointireagenssi**
Laimennettu natriumhydroksidiliuos (NaOH).
- 1 x 5 ml **Koettimen laimennin**
Puskuroitu, 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia sisältävä liuos.
- 1 x 150 µl **Matalan riskin HPV-koetin**
HPV 6/11/42/43/44 -RNA-koetin puskuriliuoksessa (vihreä korkki).
- 1 x 100 µl **Korkean riskin HPV-koetin**
HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 -RNA-koetin puskuriliuoksessa (punainen korkki).
- 1 x 1 ml **Matalan riskin HPV:n laatukontrolli**
5 pg/ml (500 000 kopiota/ml) kloonattua HPV 6 -DNA:ta sekä kantaja-DNA:ta STM:ssä, jossa on 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 1 ml **Korkean riskin HPV:n laatukontrolli**
5 pg/ml (500 000 kopiota/ml) kloonattua HPV 16 DNA:ta ja kantaja-DNA:ta STM:ssä, jossa on 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 2,0 ml **Negatiivinen kalibraattori**
Kantaja-DNA Specimen Transport Medium -näytteen siirtoaineessa, jossa on 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 1,0 ml **Matalan riskin HPV-kalibraattori**
1 pg/ml kloonattua HPV 11 -DNA:ta sekä kantaja-DNA:ta STM:ssä, jossa on 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 1,0 ml **Korkean riskin HPV-kalibraattori**
1 pg/ml kloonattua HPV 16 -DNA:ta sekä kantaja-DNA:ta STM:ssä, jossa on 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 1 **Sieppausmikrolevy**
Pinnoitettu anti-RNA:DNA-hybridivasta-aineilla.
- 1 x 12 ml **Tunnistusreagenssi 1**
Alkaliseen fosfataasiin konjugoituja RNA:DNA-hybridien vasta-aineita puskuroidussa liuoksessa, jossa on 0,05 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.
- 1 x 12 ml **Tunnistusreagenssi 2**
CDP-Star[®] + Emerald II (kemiluminesenssisubstraatti).
- 1 x 100 ml **Pesupuskurikonsentraatti**
Sisältää 1,5 % (paino/tilavuus) natriumatsidia.

TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY PAKKAUKSEEN

Hybridien sieppausjärjestelmän *in Vitro* -diagnostiset laitteet ja lisävarusteet^A

digene Hybrid Capture 2 -järjestelmä ("*digene* HC2 -järjestelmä"), joka sisältää QIAGENin hyväksymän luminometrin ("DML-laite"), QIAGENin hyväksymän tietokoneen sekä tietokoneen oheislaitteet (näyttö, näppäimistö, hiiri, tulostin ja tulostimen kaapeli), *digene* HC2 -järjestelmän ohjelmiston ("*digene*-analyysiohjelmisto"), *digene* HC2 -järjestelmän analyysiprotokollat HPV:n analysointia varten, LumiCheck-levyohjelmiston ja *digene* HC2 -järjestelmän ohjelmiston käyttöoppaan.

Hybrid Capture System Rotary Shaker I (kiertoravistelijä)

Hybrid Capture System Microplate Heater I (mikrolevyjen lämmitysalaite)

Hybrid Capture System Automated Plate Washer (levykonepesuri)

Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (vorteksointilaitte, lisävaruste)^B

Sekoitusteline ja telineen kansi (lisävaruste)

digene-näyteteline ja -telineen kansi (lisävaruste)

EXPAND-4-pipetti ja -teline (lisävaruste)^C

digene HC2 DNA Collection Device (näytteenottoalaite)^D

Putkitiivisteiden annostelija ja leikkuri (lisävaruste, käytetään MST Vortexer 2:n kanssa)

Rapid Capture System (lisävaruste suurten näytemäärien tehokkaaseen testaukseen)^E

Pesulaite

Hybridisointimikrolevyt

Mikrolevyn kannet

Tyhjät mikrolevyliuskat (valmistaja Costar, mallinro 2581); käytetään valinnaisesti levykonepesurin kanssa

Erikoispitkät pipetinkärjet näytteiden siirtämiseen

Näytteenottoputket

Näytteenottoputkien teline

Näytteenottoputkien kierrekorkit

Kertakäyttöiset reagenssisäiliöt

DuraSealTM-putkitiivistekalvo

Hybridisointimikroputket

Mikroputkiteline

Mikrolevyn tiivisteet

Yleisiä laboratoriossa käytettäviä laitteita ja varusteita

Riittävän suuri 65 ± 2 °C:n vesihaude, johon mahtuu joko yksi sekoitusteline (36 x 21 x 9 cm) tai näytetelineitä

Mikrosentrifugi (lisävaruste koetinpullojen sentrifugointiin maksimaalisen koetintilavuuden saamiseksi)

Astialiitännällä varustettu vortex-sekoitin

Yksikanavainen mikropipetori, tilavuutta voidaan säätää välillä 20–200 µl ja 200–1 000 µl

Ylipainesyrjäytykseen perustuva toistopipetori, kuten Eppendorf[®] Repeater[®] -pipetti tai vastaava

8-kanavainen pipetori: asetukset säädeltävissä 25–200 µl:n tilavuuksille

Ajastin

Natriumhypokloriittiliuos, 5 % (tilavuus/tilavuus) (tai kotitalouskäyttöön tarkoitettu valkaisuaine)

Parafilm[®] tai vastaava

Aerosolilta suojatut kertakäyttöpipettikärjet yksikanavaisiin pipettoreihin (20–200 µl ja 200–1 000 µl)

Kertakäyttökärjet Eppendorf-toistopipetteihin (25–500 µl)

Kertakäyttökärjet 8-kanavaisen pipetoriin (25–200 µl)

Kimtowels[®]-pyyhkeet tai muut nukkaamattomat paperiliinat

Kertakäyttöinen pöytäsuojus

Puuterittomat suojakäsineet

5 ml:n ja/tai 15 ml:n painokorkilliset, pyöreäpohjaiset polypropeeniputket (koetimen laimennukseen)

2,0 ml:n polypropeeniset mikrosentrifugiputket, joissa on korkit

Lisälaitteet ja -varusteet Surepath-säilöntäaineeseen kerättyjen näytteiden käsittelyyn

Swing-bucket-roottorilla varustettu sentrifugi, joka saavuttaa 800 ± 15 x g:n kiihtyvyyden ja johon voidaan sijoittaa 15 ml:n kartiomaisia polypropeenista valmistettuja sentrifugiputkia*

digene HC2 Sample Conversion Tube -putket (15 ml:n kartiomaiset putket)^F

7 ml:n vakiokärkiset siirtopipetit tai vastaavat

QIAGEN-näytteesiirtoaine

Kertakäyttökärjet Eppendorf-toistopipetteihin (100 µl)

Lisälaitteet ja -varusteet PreservCyt-liuosnäytteiden käsittelyyn

Swing-bucket-roottorilla varustettu sentrifugi, joka pystyy saavuttamaan 2 900 ± 150 x g:n kiihtyvyyden ja johon voidaan sijoittaa 10 ml:n tai 15 ml:n kartiomaisia

polypropeenista valmistettuja sentrifugiputkia

5 ml:n serologiset pipetit tai siirtopipetit

digene HC2 Sample Conversion Kit^A (näytteen

sekoitustarvikesarja)

Kertakäyttökärjet Eppendorf-toistopipetteihin (50–100 µl)

Manuaalinen vorteksointimenetelmä:

digene HC2 Sample Conversion Tube -putket (näytteen sekoitusputket; 15 ml:n kartioputkia)^F Sarstedtin 10 ml:n

korkilliset kartioputket tai 15 ml:n VWR[®]- tai Corning[®]-merkkiset polypropeenista valmistetut korkilliset

kartiopohjaiset sentrifugiputket

Putkiteline ja siihen sopivat 10 ml:n tai 15 ml:n kartioputket

Multi-Specimen Tube Vortexer 2 -menetelmä

digene HC2 Sample Conversion Tubes (15 ml kartiomainen)^F

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Sekoitusteline ja kansi (tarkoitettu 15 ml:n kartiopohjaisille putkille)

Putkitiivisteiden annostelija ja leikkuri

DuraSeal-putkitiivistekalvo (käytetään MST Vortexer 2:n kanssa)

^A QIAGEN toimittaa ainoastaan sellaisia laitteita ja lisävarusteita, jotka on varmennettu *digene* HC2 HPV DNA -kokeen kanssa toimiviksi.

^B Tarvitaan myös puoliautomaattisessa RCS-sovelluksessa.

^C Mukautettu tuote. Muita käyttäjän laajennettavissa olevia monikanavapipettejä voidaan käyttää, jos kärkiväliksi voi säätää 3,2 cm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää yksikanavapipettä, jonka annostelukapasiteetti on 75 µl.

- ^D *digene* HC2 HPV DNA -kokeen suorituskykyominaisuudet on määritetty vain mainittujen keruutarvikesarjojen kanssa.
- ^E Katso *Rapid Capture System -järjestelmän käyttöoppaasta* tarkat ohjeet, jotka on erityisesti huomioitava järjestelmän käytössä suurten näytemäärien tehokkaassa testauksessa.
- ^F QIAGENin toimittamia *digene* HC2 Sample Conversion Tube -putkia (merkki VWR tai Corning®) on käytettävä asianmukaisen analyysin toiminnan varmistamiseksi käytettäessä Multi-Specimen Tube Vortexer 2 -menetelmää.

VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET

LUE KAIKKI OHJEET HUOLELLISESTI ENNEN KOKEEN KÄYTTÖÄ.

VAROTOIMET

KAIKKIA NÄYTTEITÄ on pidettävä tartuntavaarallisina. Mikään tunnetuista koemenetelmistä ei voi taata täysin varmasti, ettei näyte ei sisällä tartunnanaiheuttajia. Ihmisperäisten näytteiden käsittelyssä suositellaan noudatettavan asianmukaisia maakohattaisia ja paikallisia bioturvallisuutta koskevia käytäntöjä. Noudata bioturvallisuutta koskevia käytäntöjä käsitellessäsi materiaaleja, jotka sisältävät tai joiden epäillänsä sisältävän tartunnanaiheuttajia. Noudatettavia varotoimenpiteitä ovat mm. seuraavat:

1. Älä pipetoi suun avulla.
2. Älä tupakoi äläkä syö tai juo tiloissa, joissa käsitellään reagensseja tai näytteitä.
3. Käytä reagensseja- tai näytteitä käsitellessäsi kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä. Pese kädet huolellisesti kokeen suorittamisen jälkeen.
4. Puhdista kaikki näytteistä peräisin olevat roiskeet tuberkulosidisella (esim. 0,5-prosenttisella (tilavuus/tilavuus) natriumhypokloriitilla) tai muulla sopivalla desinfiointiaineella.^{42,43}
5. Dekontaminoi ja hävitä kaikki näytteet, reagenssit ja muut mahdollisesti saastuneet materiaalit kansallisten ja paikallisten säännösten edellyttämällä tavalla.

Jotkut reagenssit sisältävät natriumatsidia. Natriumatsidin on ilmoitettu muodostavan lyijy- tai kupariatsidia laboratorion viemäristössä. Iskut, kuten vasarointi, voivat johtaa näiden atsidien räjähtämiseen. Jottei lyijy- tai kupariatsidia pääse muodostumaan, huuhtelee viemärit huolellisesti hävitettyäsi natriumatsidia sisältäviä liuoksia. Kontaminaation poistamiseen vanhoista viemäreistä, joihin atsidia epäillänsä kertyneen, Yhdysvaltain työsuojeluvirasto OSHA suosittelee seuraavaa: (1) neste juoksetetaan pois lukosta kumi- tai muoviletkulla, (2) täytetään 10 % (tilavuus/tilavuus) - natriumhydroksidiliuoksella, (3) sen annetaan seistä 16 tunnin ajan, ja (4) se huuhdotaan runsaalla vedellä.

Automaattinen testaus RCS-järjestelmässä

Katso *Rapid Capture System -järjestelmän käyttöoppaasta* lisävaroitukset ja varotoimenpiteet, jotka on erityisesti huomioitava järjestelmän käytössä suurten näytemäärien tehokkaassa testauksessa.

TARVIKESARJAN OSIEN TURVA- JA VAARALAUSEKKEET

Seuraavat vaara- ja turvalausekkeet koskevat *digene* HC2 HPV DNA -kokeen tarvikesarjan osia:

Pesupuskuritiiviste



Sisältö: natriumatsidi. Varoitus! Terveydelle haitallista nieltynä. Haitallista vesieliöille, pitkävaikutteiset haittavaikutukset. Älä päästä tuotetta luontoon. Hävitä sisältö/pakkaus hyväksytyssä jätteenkäsittelylaitoksessa.

Denaturointireagenssi



Sisältö: natriumhydroksidi. Vaara! Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Saattaa syövyttää metalleja. Hävitä sisältö/pakkaus hyväksytyssä jätteenkäsittelylaitoksessa. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhtelee runsaalla vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE (tai hiuksiin): Riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhdo/suihkuta iho vedellä. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille. Varastoi lukitussa tilassa. Käytä

suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

Koettimen laimennin



Sisältö: etikkahappo, polyakryylihappo. Vaara! Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Hävitä sisältö/pakkaus hyväksytyssä jätteenkäsittelylaitoksessa. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhtele runsaalla vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE (tai hiuksiin): Riisu saastunut vaatetus välittömästi. Huuhdo/suihkuta iho vedellä. Soita heti MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkärille. Varastoi lukitussa tilassa. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta.

Korkean riskin HPV-kalibraattori

Varoitus! Ärsyttää lievästi ihoa. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.

Matalan riskin HPV-kalibraattori

Varoitus! Ärsyttää lievästi ihoa. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.

Korkean riskin HPV:n laatukontrolli

Varoitus! Ärsyttää lievästi ihoa. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.

Matalan riskin HPV:n laatukontrolli

Varoitus! Ärsyttää lievästi ihoa. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.


Negatiivinen kalibraattori

Varoitus! Ärsyttää lievästi ihoa. Jos ilmenee ihoärsytystä: Hakeudu lääkäriin.


Lisätietoja

Käyttöturvallisuustiedotteet: www.qiagen.com/safety

KÄSITTELYÄ KOSKEVAT VAROTOIMET

1. In vitro -diagnostiseen käyttöön.
2. Kohdunkaulaharja on tarkoitettu käytettäväksi vain naisille, jotka eivät ole raskaana.
3. Reagensseja ei saa käyttää ulkopakkauksessa olevan -merkin viereen merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
4. Kokeen suorittaminen sille tarkoitettujen aika- ja lämpötilarajojen ulkopuolella voi tuottaa virheellisiä tuloksia. Kokeet, jotka on suoritettu määritettyjen aika- ja lämpötilarajojen ulkopuolella eivät ole kelvollisia, ja ne on suoritettava uudestaan.
5. *digene* HC2 HPV DNA -kokeen suoritustapaa, analyysin kalibroinnin varmistuskriteerejä, laatukontrollia ja näytetulosten tulkintaa koskevia ohjeita on noudatettava tarkasti, jotta koetulokset ovat luotettavia.
6. On tärkeää, että reagenssia pipetoidaan täsmälleen ilmoitettu määrä ja että se sekoitetaan hyvin jokaisen reagenssilisäyksen jälkeen. Jos näin ei menetellä, kokeista saatavat tulokset voivat olla virheellisiä. Värimuutosten ilmeneminen odotetulla tavalla on varmistus siitä, että kyseiset edellytykset on täytetty.
7. Tarvikesarjan osat on testattu yhtenä kokonaisuutena. Osia **ei saa** vaihtaa muista lähteistä tai toisista eristä peräisin olevien osien kanssa.
8. Nukleiinihapot on hyvin herkkiä nukleaasien hajoamiselle ympäristössä. Nukleaaseja on ihmisen iholla sekä ihmisen käsittelemillä pinnoilla tai materiaaleilla. Puhdista työpinnat ja peitit ne kertakäyttösuojuksella **sekä käytä puuterittomia käsineitä kaikissa analyysivaiheissa.**
9. Estä sieppausmikrolevyn ja tunnistusreagenssi 2:n (DR2) kontaminoituminen eksogeenisellä alkalisella fosfataasilla analyysin aikana. Aineita, jotka voivat sisältää alkalisia fosfataasia, ovat tunnistusreagenssi 1, bakteerit, sylki, hiukset ja ihon öljyt. **On erittäin tärkeää, että sieppausmikrolevy peitetään pesuvaiheen jälkeen ja tunnistusreagenssi 2:n inkuboinnin ajaksi, koska eksogeeninen alkalinen fosfataasi voi reagoida tunnistusreagenssi 2:n kanssa ja antaa vääriä positiivisia tuloksia.**
10. Suojaa tunnistusreagenssi 2:ta pitkäaikaiselta altistumiselta suoralle valolle. Tunnistusreagenssi 2 on käytettävä heti osanäytteiden ottamisen jälkeen, ja suoraa auringonvaloa on vältettävä.
11. Toistoannostelija on esitäytettävä ennen reagenssin annostelua sekä tarkastaa määrääjain suurten ilmakuplien varalta. Jos toistoannostelijan kärjessä on liikaa suuria ilmakuplia, ne voivat aiheuttaa epätarkkuutta annostelussa, mikä voidaan välttää täyttämällä annostelija, tyhjentämällä kaikki neste laitteesta ja täyttämällä se uudelleen. Ks. annostelijan toimittajan antamat yksityiskohtaiset käyttöohjeet.
12. Tunnistusreagenssi 1:n ja 2:n annostelussa tulee monikanavapipetointi suorittaa käänteispipetointimenetelmällä (ks. *Hybridin osoittaminen*). Tarkista, että jokainen monikanavapipetin kärki on tiiviisti kiinni ja asianmukaisesti täytetty.
13. Varmista, että jokainen mikrolevy pestään huolellisesti Manuaalisen pesun ohjeet -kohdassa kuvatulla tavalla. Puutteellinen pesu lisää taustaa ja voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Pesupuskurin jäämät kuopissa voivat heikentää signaalia tai huonontaa toistettavuutta.
14. Anna Microplate Heater I -laitteen tasapainottua kylmäkäynnistyksen jälkeen vähintään 60 minuutin ajan 65 ± 2 °C:n lämpötilaan manuaalista testausta varten. Jos lämpiämisaikaa koskevaa vaatimusta ei noudateta, seurauksena saattaa olla hybridisoitimikrolevyn sulaminen. Katso lisätietoja *Microplate Heater I* -käyttöoppaasta.

REAGENSSIEN VALMISTUS JA SÄILYTYS

1. Säilytä tarvikesarjaa toimituksen jälkeen 2–8 °C:n lämpötilassa. Pesupuskurikonsentraattia, denaturointireagenssia ja ilmaisinväriä voidaan tarvittaessa säilyttää 2–30 °C:n lämpötilassa.
2. Älä käytä ulkopakkauksessa olevan  -merkin vieressä annetun viimeisen käyttöpäivämäärän tai valmistettujen reagenssien viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen (ks. alla).
3. Kaikki reagenssit ovat käyttövalmiita, paitsi denaturointireagenssi, matalan riskin ja korkean riskin HPV-koettimet ja pesupuskuritiiviste.

Näytteiden testaamiseen jonkin 18 HPV-tyyppi tunnistamiseksi käytetään yhdistelmäkoetinseosta (CPC) käytävää menetelmää. Tämän menetelmän käyttö edellyttää yhdistelmäkoetinseoksen (Combined-Probe Cocktail, CPC) valmistamista sekoittamalla laimennettua matalan riskin HPV-koetinseosta laimennettuun korkean riskin HPV-koetinseokseen ennen *digene* HC2 HPV DNA -kokeen tekemistä. Kahden koettimen menetelmässä käytetään matalan riskin ja korkean riskin HPV-koetinseoksia erikseen. Ks. alla olevat ohjeet.

Katso *Rapid Capture System* -järjestelmän käyttöoppaasta suurten näytemäärien tehokkaaseen testaukseen liittyvät HPV-koetinseosten, pesupuskurin, tunnistusreagenssi 1:n ja tunnistusreagenssi 2:n valmistusohjeet, sillä nämä ohjeet koskevat RCC-järjestelmän käyttöä suurten näytemäärien tehokkaaseen testaukseen.

REAGENSSI	VALMISTUSMENETELMÄ
Denaturointireagenssi	<p>Valmista ensin:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lisää denaturointireagenssipullon viisi pisaraa ilmaisinväriä ja sekoita huolellisesti. Denaturointireagenssin tulee olla väriltään tasaisen tumma violettiä. • Valmistettu denaturointi pysyy stabiilina kolme kuukautta, kun sitä säilytetään 2–8 °C:n lämpötilassa. Merkitse siihen uusi viimeinen käyttöpäivä. Jos väri haalistuu, lisää kolme tippaa ilmaisinväriä ja sekoita perusteellisesti ennen käyttöä. <p>Varoitus: Denaturointireagenssi on syövyttävää. Käytä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmien- tai kasvonsuojainta. Käsittele varoen.</p>
Matalan riskin HPV-koetinseos (valmistettu matalan riskin HPV-koettimen ja koettimen laimentimen reagensseista)	<p>Valmista näytteen denaturointi-inkuboinnin aikana:</p> <p>Tärkeää: koetinta tarttuu joskus pullon kanteen.</p> <p>Huomautus: Estä koettimen ja koetin seoksen RNAasi-kontaminaatio. Koettimen pipetointiin käytetään aerosolien kulun estäviä pipetinkärkiä. Koettimen laimennin on viskoosia.</p> <p>Varmista, että HPV-koettimia valmistellessa koettimet sekoittuvat huolella. Sekoittamisvaiheessa tulee nesteeseen muodostua näkyvä pyörre. Riittämätön sekoittaminen voi heikentää signaalia.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sentrifugoi matalan riskin HPV-koetinta hetken, jotta nesteet kertyvät pullon pohjalle. Napauta kevyesti, jotta se sekoittuisi. • Määritä tarvittava koetinseoksen määrä (25 µl/koe). Koetinseosta suositellaan valmistettavan sen verran enemmän, että voidaan korvata mahdollisesti pipetin kärkiin tai pullon reunoihin tarttuva määrä. Ks. viitetilavuudet alla olevasta luettelosta. Jokaisella käyttökerralla suositeltava kuoppien vähimmäismäärä on 24. Jos halutaan käyttää vähemmän kuin 24 kuoppaa analyysia kohti, kokeiden kokonaismäärä tarvikesarjaa kohden saattaa jäädä pienemmäksi riittämättömien koettimen ja koettimen laimentimen määrien vuoksi. • Siirrä tarvittava määrä koettimen laimenninta uuteen kertakäyttöiseen säiliöön. Kokeiden määrän mukaan suositellaan joko 5 ml:n tai 15 ml:n pyöreäpohjaisia painokorkillisia polypropeeniputkia. Sekoita koetinseoksen (Probe Mix) valmistamiseksi matalan riskin HPV-koetinta (LowRisk HPV Probe) ja koettimen laimenninta (Probe Diluent) suhteessa 1:25.

		Kokeiden/liuskojen määrä	Koettimen laimentimen	Koettimen määrä*
		48/6	2,0 ml	80,0 µl
		24/3	1,0 ml	40,0 µl
		Per kuoppa	0,045 ml	1,8 µl

*Näihin arvoihin sisältyy suositeltu ylimäärä.

- Pipetoi matalan riskin HPV-koetin koettimen laimentimeen asettamalla pipetin kärki putken sisäseinämää vasten juuri nivelkerukan yläpuolelle ja tyhjentämällä sisältö. **Kärkeä ei saa upottaa koettimen laimentimeen.**
- Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla enimmäisnopeudella vähintään 5 sekuntia. **Näkyvän nestepyrteän pitää muodostua.** Varusta "Matalan riskin HPV-koetinseos" -merkinnällä ja säilytä puhtaassa, suljetussa astiassa, kunnes se käytetään. **Käyttämätön koetinseos on hävitettävä.**

Korkean riskin HPV-koetinseos	Valmista samalla tavalla kuin edellä on kuvattu matalan riskin HPV-koetinseokselle. Varusta "Korkean riskin HPV-koetinseos" -merkinnällä. Käyttämätön koetinseos on hävitettävä.
Yhdistelmäkoetinseos	Valmista matalan riskin ja korkean riskin HPV-koetinseokset edellä kuvatulla tavalla. Lisää laimennettu matalan riskin HPV-koetinseos kokonaisuudessaan laimennettua korkean riskin HPV-koetinseosta sisältävään putkeen. Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla maksiminopeudella vähintään viiden minuutin ajan. Näkyvän nestepyrteän pitää muodostua. Varusta "Yhdistelmäkoetinseos" -merkinnällä. Käyttämätön koetinseos on hävitettävä.

<p>Pesupuskuri</p>	<p>Valmista sieppausvaiheen aikana:</p> <p>Jos käytät Hybrid Capture System -järjestelmän levykonepesuria, valmista pesupuskuri alla kuvatulla tavalla ja säilytä sitä kannellisessa astiassa tai valmista 1 litra pesupuskuria kerrallaan ja laita se levykonepesurin pesusäiliöön. Katso sekoitettavat määrät seuraavasta taulukosta:</p> <p>Katso levykonepesurin huolto- ja käyttöohjeet sen käyttöoppaasta.</p> <p>Varoitus: Pesupuskuritiiviste on myrkyllistä nieltynä. Käytä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Vähennä pesupuskuritiivisteelle altistumista lisäämällä siihen vettä valmistuksen yhteydessä.</p> <table border="1" data-bbox="552 483 1356 661"> <thead> <tr> <th>Pesupuskuritiivisteen määrä</th> <th>Tislattun veden tai deionisoidun veden määrä</th> <th>Pesupuskurin lopullinen määrä</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 l</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1 933,4 ml</td> <td>2 l</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2 900 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>Huomautus: Levykonepesurissa pitää olla aina virta päällä. Tällöin huoltohuuhtelut voidaan suorittaa kahdeksan tunnin käyttämättömyyden jälkeen.</p> <p>Tarkista ennen kutakin analyysiä, että automaattisen pesurin jätessäiliö on tyhjä ja että huuhteluallas on täynnä tislattua tai deionisoitua vettä.</p> <p>Levyn manuaalinen pesumenetelmä:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekoita puskurikonsentraatti huolella. • Laimenna pesulaitteessa 100 ml pesupusurikonsentraattia 2,9 litraan tislattua tai deionisoitua vettä ja sekoita hyvin (lopullisen määrän on oltava 3 l). • Sulje säiliö, jottei kontaminaatiota tai haihtumista tapahdu. <p>Valmistettu pesupuskuri pysyy stabiilina kolme kuukautta, kun sitä säilytetään 2–30 °C:n lämpötilassa. Merkitse siihen uusi viimeinen käyttöpäivä. Jos pesupuskuria on säilytetty jääkaapissa, anna sen lämmetä 20–25 °C:een ennen käyttöä.</p> <p>Pesulaitteen ja putkien puhdistamista 0,5 % natriumhypokloriittiliuoksella ja perusteellista huuhtelua tislattulla tai deionisoidulla vedellä suositellaan kolmen kuukauden välein, jotta estettäisiin bakteerien ja homeiden sisältämän alkalisen fosfaatin mahdollisesti aiheuttama kontaminoituminen.</p>	Pesupuskuritiivisteen määrä	Tislattun veden tai deionisoidun veden määrä	Pesupuskurin lopullinen määrä	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1 933,4 ml	2 l	100 ml	2 900 ml	3 l
Pesupuskuritiivisteen määrä	Tislattun veden tai deionisoidun veden määrä	Pesupuskurin lopullinen määrä											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1 933,4 ml	2 l											
100 ml	2 900 ml	3 l											

KÄYTTÖVALMIIDEN REAGENSSIEN MÄÄRÄT**Tunnistusreagenssi
1 ja
tunnistusreagenssi
2****Välittömästi ennen käyttöä:**

Sekoita reagenssi huolellisesti ja mittaa huolellisesti tarvittava määrä tunnistusreagenssi 1:tä tai tunnistusreagenssi 2:ta puhtaaseen säiliöön seuraavien ohjeiden mukaisesti. Jottei kontaminaatiota tapahdu, näitä reagensseja **EI SAA** siirtää takaisin alkuperäisiin pulloihin: **Hävitä käyttämättä jäänyt aine käytön jälkeen**. Jos 8-kanavaista pipettiä ei käytetä, se voidaan korvata sopivalla toistoannostelijalla. Tässä tapauksessa reagenssista on otettava osanäytteet sopivan kokoiseen polypropeeniputkeen, johon mahtuu alla merkitty tarvittava määrä.

**Kokeiden/liuskojen
määrä****Tilavuuden tunnistus,
reagenssi 1 tai 2**

96/12

Pullon sisältö

72/9

7,0 ml

48/6

5,0 ml

24/3

3,0 ml

1 koe

0,125 ml

NÄYTTEIDEN OTTAMINEN JA KÄSITTELY

Kohdunkaulan näytteet, jotka kerättiin ja siirrettiin *digene* DNA Collection -keruulaitteella (joka koostuu kohdunkaulan harjasta ja *digene* Specimen Transport Medium -näytteensiirtoaineesta), tai näytteet, jotka kerättiin käyttämällä harjan tapaista keruulaitetta tai yhdessä harjaa ja lastaa ja jotka asetettiin PreservCyt-liuokseen, tai kohdunkaulan näytteet, jotka kerättiin SurePath-säilöntänesteeseen, ovat ainoita *digene* HC2 HPV DNA -kokeen kanssa käytettäväksi suositeltavia näytteitä. Muilla näytteenottovälineillä otetut tai muissa kuljetusaineissa siirretyt näytteet eivät sovellu tähän tutkimukseen. Tämän tarvikesarjan suorituskykyominaisuudet on määritetty vain tässä mainituille näytteenoton tarvikesarjoille. Mikäli tehdään kolposkopia, kohdunkaulanäytteet on kerättävä ennen etikkahappo- tai jodikäsittelyä. Katso *digene* HC2 DNA Collection Device -laitteen käyttöohjeesta lisätietoja muista näytteenotto- ja käsittelytoimenpiteistä.

KOHDUNKAULANÄYTTEET NÄYTTEENSIIRTOAINEESSA (STM)

Näytteitä voidaan pitää näytteensiirtoaineessa (Sample Transfer Medium, STM) huoneenlämmössä enintään kaksi viikkoa, jona aikana niiden toimittaminen koelaboratorioon ei vaadi kylmäkuljetusta. Näytteet tulee lähettää eristetyssä säiliössä joko seuraavan päivän tai kahden päivän toimituksena. Näytteitä säilytetään laboratoriossa 2–8°C:ssa, jos analysointi tehdään viikon kuluessa. Jos analyysi tehdään yli 1 viikon kuluessa, näytteitä on säilytettävä –20 °C:n lämpötilassa enintään kolme kuukautta (katso lisätietoja *Kohdunkaulan koepalat* -osion *Huomautuksia*-kohdasta ennen pakastamista.) STM:ään on lisätty säilöntäainetta, joka hidastaa bakteerien kasvua ja pitää DNA:n eheänä. Sen tarkoituksena ei ole eliöiden tai solujen elinkyvyn säilyttäminen. *digene* HC2 DNA Collection -näytteenottolaitetta ei saa käyttää näytteiden keräämiseen raskaana olevilta naisilta.

KOHDUNKAULAN KOEPALAT

digene HC2 korkean riskin HPV DNA -kokeella voidaan testata juuri otettuja kohdunkaulan koepaloja, joiden poikkileikkaus on 2–5 mm. Aseta koepala viipymättä 1,0 ml:aan STM:ää ja säilytä sitä pakastettuina -20 °C:ssa. Koepalanäytteet voidaan lähettää testauslaboratorioon 2-30 °C:n lämpötilassa seuraavaan päivään mennessä, ja niitä säilytetään -20 °C:ssa, kunnes ne käsitellään. Halkaisijaltaan alle 2 mm:n kokoisia koepaloja ei saa käyttää.

Huomautuksia: Korkkien irtoamisen estäminen pakastettuina lähetettävistä tai säilytettävistä näyteputkista:

- Peitä korkit Parafilm-kalvolla ennen aiemmin pakastettujen näyteputkien lähettämistä. Näytteet voidaan lähettää pakastettuina tai 20–25 °C:ssa.
- Otettuasi näytteet pakkasesta testausta varten vaihda korkkien tilalle välittömästi Specimen Collection Tube -näytteenottoputkien kierrekorkit.

KOHDUNKAULANÄYTTEET PRESERVCYT-LIUOKSESSA

digene HC2 HPV DNA -kokeessa voidaan käyttää harjalla otettuja tai harjan ja lastan yhdistelmällä otettuja näytteitä, jotka on asetettu PreservCyt-liuokseen ThinPrep®-Papa-kokeessa käytettävien objektilasien valmistusta varten. Ota näytteet tavalliseen tapaan ja valmistele ThinPrep-Papa-koeliuskat Hologicin antamien ohjeiden mukaisesti.

Huomautus: PreservCyt-liuosta on oltava vähintään 4 ml *digene* HC2 HPV DNA -koetta varten. Alle 4 ml Papa-kokeen valmistelun jälkeen sisältävät näytteet sisältävät riittämättömän määrän materiaalia ja voivat aiheuttaa väärän negatiivisen tuloksen *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa.

PreservCyt-liuosnäytteitä voidaan säilyttää kolmen kuukauden ajan 2–30 °C:ssa näytteenoton jälkeen ja ennen kuin niitä käsitellään *digene* HC2 HPV DNA -kokeella. PreservCyt-liuosnäytteitä ei voida pakastaa. Katso lisätietoja näytteiden käsittelystä *PreservCyt-liuosnäytteen valmistusmenetelmä* -kohdasta.

KOHDUNKAULANÄYTTEET SUREPATH-SÄILÖNTÄNESTEESSÄ

(VAIN korkean riskin HPV-DNA-kokeet)

SurePath-näytteiden manuaalinen valmistus tehdään käyttämällä gradientin jälkeistä solupellettiä, joka on saatu SurePath-Papa-koeliuskojen valmistuksesta. SurePath Pap -koeliuskat valmistellaan BD PrepStain[®] liuskojen käsittelylaitteen käyttöoppaan mukaisesti.

Tärkeää: 2,0 ml SurePath-säilöntänestettä on pipetoitava jäljelle jääneen solupelletin sisältämään sentrifugiputkeen heti SurePath-Papa-koeliuskan valmistuksen jälkeen. Näin säilytetään gradientin jälkeisen solupelletin eheys *digene* HC2 HPV DNA -koetta varten.

Gradientin jälkeistä solupellettiä saa säilyttää SurePath-säilöntänesteessä enintään 4 viikkoa 2–30 °C:n lämpötilassa ennen näytteen valmistelua *digene* HC2 HPV DNA -koetta varten.

SurePath-säilöntänesteessä olevat gradientin jälkeiset solupellettinäytteet valmistellaan tässä käyttöohjeessa kuvatulla tavalla. Manuaalisen näytteen valmistelun tuloksena on denaturoitu näyte, joka voidaan siirtää kokeen hybridisointivaiheeseen.

KOEMENETELMÄ

Näytteet saattavat sisältää tartunnanaiheuttajia, ja näytteitä on käsiteltävä asianmukaisesti. *digene* HC2 HPV DNA -koe voi suorittaa manuaalisesti tämän käyttöohjeen mukaisesti tai käyttämällä Rapid Capture System -järjestelmää suurten näytemäärien tehokkaaseen testaukseen.

RAPID CAPTURE SYSTEM -JÄRJESTELMÄN KÄYTTÄMINEN SUURTEN NÄYTEMÄÄRIEN TEHOKKAASSA TESTAUKSESSA

Rapid Capture System (RCS) -järjestelmä on yleiskäyttöinen automaattinen pipetointi- ja laimennusjärjestelmä, jota voidaan käyttää *digene* HC2 HPV DNA -kokeiden kanssa suurten näytemäärien tehokkaaseen testaukseen. Järjestelmällä voidaan käsitellä enimmillään 352 näytettä kahdeksassa tunnissa, mihin sisältyy 3,5 tunnin jakso, jonka aikana käyttäjän ei tarvitse tehdä mitään; 13 tunnissa voidaan tuottaa enintään 704 näytetelosta. Näytteiden denaturointi koetta varten tehdään erillään RCS-järjestelmästä ennen näytteiden laittamista RCS-alustaan. Lisäksi kemiluminesenssisignaalin tunnistus ja tulosten raportointi tapahtuvat erillisellä DML-laitteella sekä manuaalisessa testauksessa että RCS-järjestelmässä tehtävässä automaattisessa testauksessa. *digene* HC2 HPV DNA -kokeen menetelmävaiheet suoritetaan samassa järjestyksessä kuin manuaalisessa koemenetelmässä. RCS-sovellus mahdollistaa enintään neljän mikrolevyn käsittelyn lomittain, jolloin kukin mikrolevy sisältää näytteet ja tarvittavat analyysin kalibraattorit ja laatukontrollit.

Jos käytät Rapid Capture System -järjestelmää, katso laitteen mukana toimitetusta *Rapid Capture System -järjestelmän käyttöoppaasta* sekä tästä käyttöohjeesta tarvittavat tiedot menetelmistä ja niiden kuvauksista.

MANUAALINEN MENETELMÄ

Valmistelut

1. Jos käytössä on Microplate Heater I -lämmitinlaite, **anna sen tasapainottua kylmäkäynnistyksen jälkeen vähintään 60 minuutin ajan 65 ± 2 °C:seen.** Katso lisätietoja *Microplate Heater I* -käyttöoppaasta.
2. Varmista, että vesihautteen lämpötila on 65°C ja että vettä on niin paljon, että koko näyteputkien sisältö peittyy.
3. Ota näytteet ja **kaikki** tarvittavat reagenssit jääkaapista **ennen analyysin aloittamista.** Anna niiden lämmetä 20–25 °C:n lämpötilaan 15–30 minuutin ajan.
Huomautus: Valmista PreservCyt-liuosnäytteet ja SurePath-näytteet ennen aiemmin denaturoitujen näytteiden ja yhdistelmävalmisteen reagenssin huoneenlämpöiseksi lämmittämistä.
4. Luo analyysilevyasettelu *digene*-analyysiohjelmistolla. Katso levyasettelun luomisohjeet kyseisen ohjelmiston käyttöoppaasta.
5. Aseta kalibraattorit, laatukontrollit ja testattavat näytteet näyteputkelineeseen siinä järjestyksessä, jossa ne on tarkoitus tutkia. **Negatiivinen kalibraattori, matalan riskin HPV-kalibraattori ja korkean riskin HPV-kalibraattori on testattava ENSIN.** Negatiivinen kalibraattori (NC), matalan riskin HPV-kalibraattori (LRC) tai korkean riskin HPV-kalibraattori (HRC), matalan riskin laatukontrolli (QC1-LR) ja korkean riskin laatukontrolli (QC2-HR) ja näytteiden ajo suoritetaan kahdeksan mikrolevykuoppalstan kokoonpanossa. Katso alla oleva *esimerkkiasettelu*.

Asettelyesimerkki 24 mikrolevyn kuopan ajoa varten:			
Rivi	Palsta		
	1	2	3
A	NC	Näyte 1	Näyte 9
B	NC	Näyte 2	Näyte 10
C	NC	Näyte 3	Näyte 11

D	LRC tai HRC	Näyte 4	Näyte 12
E	LRC tai HRC	Näyte 5	Näyte 13
F	LRC tai HRC	Näyte 6	Näyte 14
G	QC1-LR	Näyte 7	Näyte 15
H	QC2-HR	Näyte 8	Näyte 16

6. Jos käytät yhdistelmäkoetinseosta (CPC) käyttävää menetelmää, testaa NC, LRC ja HRC kolmena rinnakkaiskokeena yhdistelmäkoetinseoksen kanssa samalla mikrolevyllä. Käytä kuoppia A1, B1 ja C1 NC:tä varten ja kuoppia D1, E1, F1, G1, H1 ja A2 LRC:ta ja HRC:ta varten. Käytä kuoppia B2 ja C2 QC1-LR- ja QC2-HR-laatukontrolleja varten sekä näytteitä varten aloittaen D2:sta. **CPC-menetelmää ei ole varmennettu käytettäväksi Rapid Capture System -järjestelmässä.**
7. Suorita kahden koettimen menetelmässä matalan riskin HPV-koetinseoskokeet mikrolevyn vasemmanpuoleisessa ja korkean riskin HPV-koetinseoskokeet oikeanpuoleisessa osassa.
- Testaa ENSIN negatiivinen kalibraattori (NC) ja matalan riskin kalibraattori (LRC) kolmena rinnakkaiskokeena matalan riskin HPV-koetinseoksella. Testaa sen jälkeen myös laatukontrollit (QC1-LR ja QC2-HR) ja näytteet yksitellen, myöskin matalan riskin HPV-koetinseoksella. Laita NC-replikaatit A1:een, B1:een, C1:een; LCR-replikaatit D1:een, E1:een, F1:een; laita QC1-LR G1:een; laita QC2-HR H1:een; ja näytteet aloittaen A2:sta.
- Testaa SEURAAVAKSI NC ja korkean riskin kalibraattori (HRC) kolmena rinnakkaiskokeena korkean riskin HPV-koetinseoksella. Testaa sen jälkeen QC1-LR ja QC2-HR-näytteet yksitellen, myöskin korkean riskin HPV-koetinseoksella. Laita NC-replikaatit A7:ään, B7:ään, C7:ään; HRC-replikaatit D7:ään, E7:ään, F7:ään; laita QC1-LR G7:ään; laita QC2-HR H7:ään ja näytteet aloittaen A8:sta. Ks. edellä oleva esimerkkiasettelu.
- Katso kalibraattorin, laatukontrollin ja näytteiden valmistelujen ohjeet asianmukaisen ohjelmiston käyttöoppaasta.
8. Voit vaihtoehtoisesti käyttää kahta eri mikrolevyä matalan riskin ja korkean riskin HPV-koettimella testattuihin kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin. Testaa NC ja LRC kolmena rinnakkaiskokeena ja QC1-LR sekä QC2-HR yksittäin matalan riskin HPV-koetinseoksella toisessa mikrolevyssä, testaa NC sekä HRC kolmena rinnakkaiskokeena ja testaa QC1-LR sekä QC2-HR yksittäin korkean riskin HPV-koetinseoksella toisessa mikrolevyssä. Käytä NC:tä varten kuoppia A1, B1 ja C1 ja LRC:tä tai HRC:tä varten kuoppia D1, E1 ja F1. Käytä kuoppaa G1 QC1-LR-kontrollille ja kuoppaa H1 QC2-HR-laatukontrollille.
9. Jos käytät yhdistelmäkoetinseosta käyttävää menetelmää, voit testata näytteet yksittäin yhdistelmäkoetinseoksella tai yksittäin matalan riskin HPV-koetinseoksella ja yksittäin korkean riskin HPV-koetinseoksella, jos käytät kahden koettimen menetelmää.

DENATUROIINTI

Huomautuksia:

- **Varoitus:** Denaturointireagenssi on syövyttävää. Ole varovainen ja käytä puuterittomia-hansikkaita käsittelyn aikana.
- **Tärkeää:** Jotkut kohdunkaulanäytteet voivat sisältää verta tai muuta biologista materiaalia, joka voi peittää värimuutokset denaturointireagenssin lisäämisen jälkeen. Oikeaa värimuutosta ei välttämättä huomata tässä vaiheessa näytteistä, jotka ovat tummanvärisiä ennen denaturointireagenssin lisäämistä. Näissä tapauksissa oikean värimuutoksen näkymättömyys ei vaikuta analyysin tuloksiin. Asianmukainen sekoittuminen voidaan varmistaa tarkkailemalla kalibraattorien ja laatukontrollien värimuutosta.
- Jos denaturointi- ja hybridisointivaiheiden aikana käytetään vesihaudetta, varmista, että vesihauteessa on riittävästi vettä niin, että koko näyteputkessa oleva näytemäärä on veden alla.
- Kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet voidaan valmistaa denaturointivaiheeseen saakka, ja niitä voidaan säilyttää 2-8 °C:ssa yön yli tai -20 °C:ssa enintään kolmen kuukauden ajan. Enintään

kolme pakastus-sulatusjaksoa on sallittu niin, että näytteet ovat enintään 2 tuntia huoneenlämmössä kunkin sulatusjakson aikana. Sekoita hyvin ennen käyttöä.

- Denaturoinnin ja inkuboinnin jälkeen näytteitä ei enää pidetä tartuntavaarallisina.²⁶ Laboratoriohenkilökunnan on kuitenkin noudatettava maakohtaisia ja paikallisia varotoimenpiteitä.
- Älä poista näytteenottovälinettä ennen denaturointia.
- Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on ratkaisevan tärkeää, että koko kalibraattori, laatukontrolli ja STM-näyte joutuu kosketuksiin denaturointireagenssin kanssa. Denaturointireagenssin lisäämisen jälkeinen sekoittaminen on kriittinen vaihe: **Varmista, että Multi-Specimen Tube Vortexer 2 -laitteen asetuksena on 100 (enimmäisnopeus) ja että sekoituksen aikana putkessa näkyy nestepyörre, joka huuhtelee putken koko sisäpinnan. Jos vorteksointi tapahtuu manuaalisesti, varmista, että jokainen kalibraattori, laatukontrolli ja näyte sekoitetaan yksitellen vorteksioimalla kutakin vähintään viiden sekunnin ajan maksiminopeudella siten, että nestepyörre pesee putken sisäpinnan kauttaaltaan, minkä jälkeen putki käännetään kerran.**

Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja STM-näytteiden valmistus

1. Poista ja hävitä kalibraattoreiden, laatukontrollien ja STM-näyteputkien korkit.

Huomautus: Näyteputkista poistetut tulpat ovat mahdollisia infektiolähteitä. Niiden hävittämisessä tulee noudattaa kansallisia/paikallisia määräyksiä.

2. Pipetoi denaturointireagenssia sekä ilmaisinväriä kuhunkin kalibraattoriin, laatukontrolliin tai STM-näytteeseen toistoannostelijalla tai säädettävällä pipetillä. Varo koskettamasta putken reunoja, sillä se voisi johtaa näytteiden ristikontaminaatioon. Tarvittavan denaturointireagenssin määrä on puolet näytteen määrästä. Kalibraattori-, laatukontrolli- ja näytetyyppikohtaiset tarkat tilavuudet on annettu alla olevassa taulukossa.

Laimenna jäljellä oleva denaturointireagenssi pullossa ennen hävitystä kansallisten ja paikallisten laboratorion työskentelykäytäntöjen mukaisesti.

Kalibraattori, laatukontrolli tai näyte	Denaturointireagenssin tarvittava määrä
Negatiivinen kalibraattori	1000 µl
Matalan riskin tai korkean riskin HPV-kalibraattori	500 µl
Matalan riskin tai korkean riskin laatukontrollit	500 µl
Kohdunkaulanäytteet	500 µl

3. Sekoita näytteet toisella seuraavista menetelmistä.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 -menetelmä

Huomautus: *digene* HC2 DNA Collection -keruulaitteen näytteet, jotka sekoitetaan MST Vortexer 2 -laitteella, on hybridisoitava hybridisointimikrolevyä ja Microplate Heater I -menetelmää käyttäen.

- a) Peitä kalibraattori-, laatukontrolli- ja STM-näyteputket DuraSeal Tube Sealer -kalvolla vetämällä kalvo telineessä olevien putkien päälle.
- b) Aseta telineen kansi kalvolla peitettyjen putkien päälle ja lukitse kansi paikalleen kahdella sivupidikkeellä. Leikkaa kalvo leikkurilla.
- c) Aseta teline Multi-Specimen Tube Vortexer 2 -laitteeseen ja kiinnitä teline puristimella. Varmista, että nopeusasetus on 100 (enimmäisnopeus), ja kytke vorteksointilaitteen virtakytkin ON (Päälle) -asentoon. Vorteksoi putkia 10 sekuntia.

Manuaalinen yksittäisten putkien vorteksointimenetelmä

- a) Sulje kalibraattori-, laatukontrolli- ja STM-näyteputket puhtailla näytteenottoputkien kierrekorkeilla.

- b) Sekoita jokaista putkea erikseen vorteksoimalla suurella nopeudella 5 sekuntia.
- c) Käännä kaikki näyteputket kerran, jotta neste huuhtelee putken, korkin ja reunan sisäpinnat.
- d) Aseta putki takaisin telineeseen.

Huolimatta siitä, kumpaa vorteksointimenetelmää käytetään, **jokaisessa putkessa on sekoittamisen aikana oltava näkyvä nestepyörre, joka pesee putken sisäpinnan kauttaaltaan.** Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden värin tulee muuttua violetiksi.

4. Inkuboi putkia telineessä 65 ± 2 °C:ssa vesihauteessa 45 ± 5 minuuttia (denaturoidut kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet voidaan testata heti tai varastoida edellä olevien huomautusten mukaisesti). Valmista HPV-koetinseos (tai -koetinseokset) tämän inkuboinnin aikana. Ks. *Reagenssien valmistus ja säilytys*.

PreservCyt-liuosnäytteen valmistusmenetelmä

Huomautuksia:

- Katso täydelliset tiedot *digene* HC2 Sample Conversion Kit -käyttöohjeesta.
- Käsittelemällä yksi 4 ml:n osanäyte PreservCyt-liuosta saadaan riittävä määrä kahteen manuaalisesti suoritettavaan kokeeseen. Käsiteltävän määrän on oltava vähintään 4 ml.
- Valmista PreservCyt-liuosnäytteet enintään 36 näytteen erissä, sillä muuten pelletit saattavat irrota supernatanttia dekantaitaessa. Tämä on tärkeää solupelletin eheyden säilyttämiseksi dekantointivaiheen aikana. Jos valmistat useampia PreservCyt-liuospulloja, älä aloita niiden valmistusta ennen kuin ensimmäisen erän valmistus on tehty.

Reagenssin valmistus

Käytä joko denaturointireagenssia (DNR), joka on toimitettu *digene* HC2 HPV DNA -kokeen mukana (katso *Reagenssin valmistus ja säilytys*), tai *digene* HC2 Sample Conversion Kit -tarvikesarjan mukana toimitettua NDR-reagenssia. Valmista *digene* HC2 Sample Conversion Kit -tarvikesarjan mukana toimitettu DNR lisäämällä DNR-pulloon 3 pisaraa ilmaisinväriä. Liuoksen tulee olla väriltään tasaisen tumma violetti. Käytä taulukkoa 1 määrävaatimusten määrittämiseen.

Taulukko 1

Tarvittavat määrät: Reagenssin valmistus

Kokeiden lukumäärä	PreservCyt-liuoksen määrä	Sekoituspuskurin määrä
1–2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Merkitse näytteen tunnusnumero *digene* HC2 Sample Conversion Tube -putkeen, 10 ml:n korkilliseen Sarstedt-kartioputkeen tai 15 ml:n VWR- tai Corning-merkkiseen kartioputkeen.
2. Näytteiden käsittely yksi kerrallaan:
 - a. Ravistele PreservCyt-pulloa voimakkaasti käsin, kunnes solut näyttävät jakautuneen tasaisesti.
 - b. Koska solut laskeutuvat nopeasti, pipetoi välittömästi haluttu määrä PreservCyt-näytettä valmiiksi merkittyyn putkeen. Annostele PreservCyt-liuos kartiopohjaisen putken pohjalle, jotta soluaines ei kiinnity putken sisäpinnalle.
3. Lisää sopiva määrä Sample Conversion Buffer -puskuria jokaiseen putken (katso taulukko 1).

4. Aseta korkit paikoilleen ja sekoita kunkin putken sisältöä perusteellisesti astialla varustetussa vortex-sekoittimessa.
Huomautus: MST Vortexer 2 -menetelmää ei ole varmennettu PreservCyt-liuosnäytteiden Sample Conversion Buffer -puskurin kanssa vorteksointiin ennen sentrifugointia, ja siksi sitä ei saa käyttää tässä vaiheessa.
5. Sentrifugoi putkia Swing-bucket-roottorilla varustetussa sentrifugissa $2\ 900 \pm 150 \times g$:n kiihtyvyydellä 15 ± 2 minuuttia.
6. Valmista sentrifugoinnin aikana näytteen siirtoaineen ja denaturointireagenssin seos (STM-DNR) suhteessa 2:1 taulukon 2 mukaisesti.

Huomautus: Kunkin testauspäivänä on valmistettava uusi STM/DNR-seos.

- a. Tarvittavan STM-DNR-seoksen kokonaismäärän määrittämisessä vertailukohtena toimii PreservCyt-liuosnäytteen aloitusmäärä, ja STM:n ja DNR:n putkikohtaiset määrät kerrotaan käsiteltävien näytteiden määrällä (katso taulukko 2).

Taulukko 2
Tarvittavat määrät: STM/DNR

Kokeiden lukumäärä	PreservCyt-liuoksen määrä	STM-määrä putkea kohti lopullista STM/DNR-seosta varten*	DNR-määrä putkea kohti lopullista STM/DNR-seosta varten*	Putkeen lisätyn STM/DNR-seoksen määrä
1–2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* Näissä sarakkeissa mainittuja määriä ei saa suoraan lisätä näyteputkeen.

- b. Sekoita liuos perusteellisesti vorteksoimalla.
7. Poista putket sentrifugista yksitellen ja aseta ne telineeseen tai sekoitustelineeseen. Jokaisen putken pohjalla on oltava vaaleanpunainen/oranssi pelletti.
Huomautus: näytteet, joissa ei näy pellettiä sentrifugoinnin jälkeen, eivät kelpaa testaukseen, ja ne on hävitettävä.
8. Käsittele jokainen putki yksitellen ja toimi seuraavasti:
 - a. Poista putken korkki ja aseta se puhtaalle nukkaamattomalle paperiliinalle.
 - b. Dekantoi supernatantti varovasti.
 - c. Pidä putki käännettynä ja blottaa varovasti (noin kuusi kertaa) imukykyisiin nukkaamattomiin paperipyyhkeisiin, kunnes putkesta ei enää tipu nestettä. Käytä joka kerralla puhdasta pyyhkeen kohtaa. Varo, **etteivät** solupelletit liu'u putken pohjaan blottausten aikana.
Huomautuksia:
 - Älä blottaa putkea useammin kuin yhden kerran imukykyisen nukkaamattoman paperipyyhkeen samaan kohtaan.
 - On tärkeää poistaa mahdollisimman suuri määrä PreservCyt-liuosta blottauksessa. On kuitenkin normaalia, että PreservCyt-liuosjäämiä näkyy blottausten jälkeen.
 - d. Aseta putki telineeseen tai sekoitustelineeseen.

VORTEKSOINTI JA DENATUROINTI

Manuaalinen vorteksointimenetelmä

1. Lisää sopiva määrä STM-DNR-seosta jokaiseen pellettiin (taulukko 2). Sulje putket korkilla ja suspendoi pelletit vorteksoimalla kutakin putkea yksitellen maksiminopeudella vähintään 30 sekunnin ajan. Jos pelletin suspendoiminen uudelleen on hankalaa, vorteksoi vielä 10–30 sekuntia tai kunnes pelletti irtoaa putken pohjasta. Jos pelletti ei ole liuennut lisävorteksoinnin jälkeen (yhteensä enintään 2 minuuttia), merkitse näytteen tunnistekoodi muistiin ja jatka seuraavaan vaiheeseen.
2. Aseta putket telineeseen.
3. Aseta teline 65 ± 2 °C:seen vesihauteeseen 15 ± 2 minuutiksi. Varmista, että vettä on riittävästi peittämään kaiken putkien sisältämän nesteen.
4. Poista näytteet sisältävä teline vesihauteesta ja vorteksoi näytteitä yksitellen 15–30 sekuntia.
Huomautus: Varmista tässä vaiheessa, että kaikki pelletit ovat täysin suspendoituneet. Näytteet, joissa vielä näkyy pellettejä, eivät kelpaa testattaviksi, ja ne on hävitettävä.
5. Laita teline takaisin 65 ± 2 °C:seen vesihauteeseen ja jatka denaturointia vielä 30 ± 3 minuuttia.
6. Jatka *hybridisointivaiheeseen* tai katso *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta* -kohdasta lisätietoja denaturoitujen näytteiden varastoinnista ja käsittelystä.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 -menetelmä

Huomautuksia:

- Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 -menetelmä on varmennettu PreservCyt-liuosnäytteiden käsittelyyn sentrifugoinnin ja supernatantin dekantoinnin jälkeen.
 - Vain MST Vortexer 2 on suunniteltu käytettäväksi PreservCyt-liuosnäytteiden käsittelyssä.
 - Sekoitusteline ja kansi on suunniteltu erityisesti niin, että siihen voidaan sijoittaa *digene* HC2 Sample Conversion Tube -putkia (sekä VWR- tai Corning-merkkisiä 15 ml:n kartioputkia). Sekoitustelineessä saa käyttää vain yhtä putkityyppiä kerrallaan. Muita tuotemerkkejä ei ole varmennettu käytettäväksi tässä.
 - Sekoitustelineelle ja telineen kannelle määritetyt vorteksointiaikoja tulee noudattaa tarkasti.
 - Sekoitustelinettä ja kantta ei voi käyttää vorteksoitaessa *digene* HC2 DNA Test -tarvikesarjan kalibraattoreita tai laatukontrolleja. STM-putkien korkeus estää kunnollisen vorteksoinnin sekoitustelinettä ja kantta käytettäessä.
1. Kun olet blotannut jokaisen merkityn 15 ml:n kartioputken, aseta jokainen putki oikeaan paikkaan sekoitustelineeseen.
 2. Lisää sopiva määrä STM-DNR-seosta jokaiseen pellettiin (taulukko 2).
 3. Peitä 15 ml:n kartioputket DuraSeal-putkitiivistekalvolla vetämällä kalvo telineessä olevien putkien päälle.
 4. Aseta telineen kansi kalvon peittämien putkien päälle ja lukitse se paikoilleen kahdella reunapidikkeellä. Leikkaa kalvo leikkurilla, kun kansi on kiinnitetty kunnolla.
 5. Käännä punainen käsivipu ylöspäin vaaka-asentoon.
 6. Aseta sekoitusteline ja kansi MST Vortexer 2 -laitteeseen niin, että sekoitustelineen suurin lovettu kulma sijaitsee oikeassa etukulmassa. Aseta teline ja kansi MST Vortexer 2 -alustalle niin, että ne ovat tukevasti kiinni ohjaimissa. Lukitse sekoitusteline paikalleen painamalla punainen käsivipu alaspäin pystyasentoon. Tämä lukitsee telineen paikalleen.
 7. Varmista, että nopeusasetuksena on 100 (enimmäisnopeus) ja sykäskytkin on OFF (Pois) -asennossa.
 8. Käännä vorteksointilaitteen virtakytkin ON (Päällä) -asentoon. **Vorteksoi putkia 30 sekuntia.**
 9. Kytke vorteksointilaitteen virtakytkin OFF (Pois) -asentoon.

10. Poista sekoitusteline ja telineen kansi MST Vortexer 2:sta nostamalla punakahvainen vipu ylös.
11. Aseta teline 65 ± 2 °C:n vesihauteeseen 15 ± 2 minuutin ajaksi. Varmista, että putkien sisältämä neste on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
12. Ota näytteet sisältävä teline pois vesihauteesta 15 minuutin inkuboinnin jälkeen.
13. Roiskeiden välttämiseksi kuivaa liika vesi, ennen kuin asetat sen MST Vortexer 2 -laitteeseen.
14. Kiinnitä sekoitusteline ja kansi MST Vortexer 2 -laitteeseen *vaiheen 6* mukaisesti.
15. Varmista, että nopeusasetus on 100, ja kytke vorteksointilaitteen virtakytkin ON (Päälle) -asentoon.
Vorteksoi putkia 1 minuutin ajan.
16. Käännä vorteksointilaitteen virtakytkin OFF (Pois) -asentoon.
Huomautus: MST Vortexer 2 -menetelmässä käytetään vakioitua sekoitusnopeutta, -aikaa ja -tapaa, joten solupellettejä ei tarvitse tarkistaa silmämääräisesti kuten manuaalisessa vorteksoinnissa.
17. Laita sekoitusteline takaisin 65 ± 2 °C:seen vesihauteeseen ja jatka denaturointia vielä 30 ± 3 minuuttia.
18. Poista teline vesihauteesta, kuivaa teline ja kiinnitä se vorteksointilaitteeseen.
19. Kytke vorteksointilaitteen virtakytkin ON (Päällä) -asentoon. **Vorteksoi 10 sekuntia enimmäisasetuksella.**
20. Kytke vorteksointilaitteen virtakytkin OFF (Pois) -asentoon. Ota teline pois.
21. Ota telineen kansi ja DuraSeal-putkitiivistekalvo pois näytteistä.
22. Jatka *hybridisointivaiheeseen* tai katso *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta* -kohdasta lisätietoja denaturoitujen näytteiden varastoinnista ja käsittelystä.

SurePath-näytteen valmistelumenetelmä (VAIN korkean riskin HPV DNA -testaus)

Toimi seuraavasti sytologisen käsittelyn jälkeen:

1. Varmista, että havaittu nestemäärä on 2,8 ml.

HUOMIO: jos jäljelle jäänyt solupelletti vaikuttaa sisältävän alle 1 ml nestettä, on mahdollista, ettei SurePath-säilöntäainestettä lisätty sytologian jälkeen ja että näyte EI sovellu testattavaksi korkean riskin HPV:n DNA-testauksella.

2. Varmista, että näytteiden lämpötila on tasapainottunut huoneenlämpöön.
3. Sentrifugoi näytettä swing-bucket-roottorilla varustetussa sentrifugissa 800 ± 15 x g:n kiihtyvyydellä 10 ± 1 minuuttia.
4. Poista putket sentrifugista.
5. Dekantoi supernatantti varovasti välittömästi sentrifugikäsittelyn jälkeen ja blottaa jokaista putkea varovasti imukykyisillä paperipyyhkeillä ylimääräisen nesteen poistamiseksi (noin kolme kertaa). Tarkkaile kunkin putken pellettiä. **Varo, etteivät solupelletit liu'u putken pohjaan blottauksen aikana.**
6. Aseta putket telineeseen.
7. Lisää 200 µl STM:ää jokaiseen pellettiin toisto- tai säädettävällä pipettorilla.
Huomautus: putket voivat sekaantua ilman korkkeja.
8. Suspendoi jokainen pelletti uudelleen vorteksoimalla jokaista putkea erikseen 15 sekunnin ajan suurella nopeudella. Jos pelletin suspendointi on vaikeaa, vorteksoi vielä 5–30 sekuntia tai kunnes pelletti kelluu irti putken reunoista ja näyttää liukenevan.
9. Pipetoi 100 µl valmisteltua denaturointireagenssia (jossa on ilmaisinväriä) jokaiseen näytteeseen käyttäen toisto- tai säädettävää pipettiä.

HUOMIO: Varo koskettamasta putken reunoja, sillä se voisi johtaa näytteiden ristikontaminaatioon.

Jos jäljellä oleva denaturointireagenssi hävitetään, noudata paikallisia syövyttävien aineiden poistomääräyksiä.

10. Sekoita jokainen putki perusteellisesti vorteksoimalla niitä erikseen suurella nopeudella 5 sekunnin ajan.

Huomautus: putket voivat sekaantua ilman korkkeja.

Merkitse jokaiseen 15 ml:n kartioputkeen näytetunniste ja tyyppi (esim. "SP" SurePath-näytteelle) ja aseta putket telineeseen.

Huomautus: Jos käytät Rapid Capture System -järjestelmää puoliautomaattisessa analyysin käsittelyssä, käytä aina VWR- tai Corning-merkkisiä 15 ml:n kartioputkia, jotta näytteet tulevat oikein *digene* -sekoitustelineeseen (hopeinen teline).

11. Siirrä koko putken sisältö 15 ml:n kierrekorkilla varustettuun kartioputkeen kertakäyttöisellä 7 -ml:n vakiokärkisellä siirtopipetillä tai muulla vastaavalla¹.

12. Laita korkki kaikkiin 15 ml:n kartioputkiin.

13. Inkuboi 65 ± 2 °C:ssa vesihauteessa 90 ± 5 minuuttia.

HUOMIO: tämä inkubointiaika on muille hyväksytyille näytetyypeille vaadittua aikaa pidempi.

14. Jos HPV-testaus suoritetaan samana päivänä, denaturoi *digene* HC2 DNA -kokeen kalibraattori tämän käyttöohjeen mukaisesti.

15. Poista näyteteline vesihauteesta.

Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta

Denaturoinnin jälkeen STM-näytteitä ja muunnettuja PreservCyt- ja SurePath-näytteitä voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa seuraavaan päivään tai –20 °C:ssa enintään kolme kuukautta. Kun näytteitä säilytetään jääkaapissa yön yli, ne voidaan jättää sekoitustelineeseen DuraSeal-kalvolla ja telineen kannella peitettynä. Ennen näytteiden säilyttämistä –20 °C:ssa on telineen kansi ja DuraSeal-kalvo poistettava näytteistä ja näyteputket suljettava korkeilla. Näytteiden on kummassakin tapauksessa annettava lämmitä huoneenlämpöön (20–25 °C) ja vorteksoitava perusteellisesti ennen hybridisointivaiheeseen jatkamista.

Huomautus: älä säilytä tai kuljeta denaturoituja näytteitä kuivajäissä.

Enintään kolme pakastus-sulatusjaksoa on sallittu niin, että näytteet ovat enintään 2 tuntia huoneenlämmössä kunkin sulatusjakson aikana.

HYBRIDISOINTI: YHDISTELMÄKOETINSEOSTA (CPC) KÄYTTÄVÄ MENETELMÄ JA KAHDEN KOETTIMEN MENETELMÄ

Huomautuksia:

- HPV-koetinseokset ovat viskooseja. Varmista, että koetinseos sekoitetaan perusteellisesti ja että koko tarvittava määrä annostellaan jokaiseen mikrolevyn kuoppaan. Katso lisätietoja *Reagenssien valmistus ja säilytys* -kohdasta.
- Jos denaturoitua näytettä on säilytetty –20 °C:ssa, anna näytteen lämmitä 20–25 °C:seen ja vorteksoi näyte perusteellisesti ennen hybridisoinnin jatkamista.
- Lämmitä Microplate Heater I -laitetta etukäteen vähintään 60 minuutin ajan 65 ± 2 °C:ssa. Katso tarvittaessa lisätietoja *Microplate Heater I* -käyttöoppaasta.

¹ QIAGEN-varmennuskokeissa käytettiin VWR:n 15 ml:n kartioputkia

Hybridisointimenetelmä, jossa käytetään hybridisointimikrolevyä ja Microplate Heater I:tä

Huomautus: *digene* HC2 DNA Collection -keruulaitteella STM:ään kerätyt, MST Vortexer 2 -menetelmällä käsitellyt näytteet voidaan hybridisoida **vain** Microplate Heater I -menetelmällä.

1. Varusta hybridisointimikrolevy tunnistusmerkinnällä.
2. Poista inkuboinnin jälkeen kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet vesihauteesta. Jos käytössä on Multi-Specimen Tube Vortexer 2, vorteksoi koko STM-näytetelinettä vähintään 5 sekuntia enimmäisnopeusasetuksella. Vorteksoi PreservCyt- tai SurePath-näytteiden koko sekoitusteline vähintään 10 sekunnin ajan maksiminopeudella. Vorteksoi vaihtoehtoisesti putkia yksitellen vähintään viiden sekunnin ajan.
3. Pipetoi 75 µl sekä kalibraattoria, laatukontrollia että näytettä tyhjän hybridisointimikrolevyn kuopan **pohjalle** *Valmistelut*-kohdassa kuvatun levyasettelun mukaisesti. Vältä koskettamasta kuoppien sivuja ja pyri rajoittamaan ilmakehien syntymistä. Käytä kalibraattoreiden, laatukontrollien tai näytteiden ristikontaminaation estämiseksi kuhunkin siirtoon puhdasta, erikoispitkää pipetinkärkeä. Näytteenottovälinettä ei saa poistaa näytteenkuljetusputkesta. Denaturoidut näytteet voidaan sulkea näytteenottoputkien kierrekorkeilla ja säilyttää yhdessä putkiin jäävien näytteenottovälineiden kanssa. Denaturoidut PreservCyt-näytteet voidaan sulkea uudelleen alkuperäisillä korkeillaan.

Huomautus: Virheellisiä positiivisia tuloksia voidaan saada, jos näytteitä ei siirretä varovasti. Näytteen siirron aikana pipetin kärki ei saa koskettaa putken sisäpintaa 75 µl:n osanäytettä otettaessa.

4. Siirrettyäsi viimeisen näytteen peitä levy levyn kannella ja **inkuboi hybridisointimikrolevyä 10 minuuttia 20–25 °C:n lämpötilassa**.
5. Ota valmistetusta ja perusteellisesti sekoitetusta koetinseoksesta osanäyte kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön. Pipetoi varovasti 25 µl koetinseosta jokaiseen kalibraattoreita, laatukontrolleja ja näytteitä sisältävään kuoppaan 8-kanavaisella pipetillä. Käytä uutta kärkeä jokaiselle riville. Koetin annostellaan hybridisointikuoppiin takaisin roiskumista välttämällä. Varo koskettamasta kuoppien seinämiin. Laita mikrolevyn kansi mikrolevylle denaturointi-inkuboinnin ajaksi.
6. Peitä hybridisointimikrolevy levyn kannella ja ravistele sitä 3 ± 2 minuuttia Hybrid Capture System Rotary Shaker I -laitteessa $1\ 100 \pm 100$ kierroksen minuuttinopeudella. *Kalibraattorien, laatukontrollien ja näytteiden on muututtava keltaisiksi ravistelun jälkeen.* Violetin väriksi jäävissä kuopissa ei ehkä ole ollut tarpeeksi koetinseosta. Lisää vielä 25 µl koetinseosta violeteiksi jääneisiin näytteisiin ja ravistele uudelleen. Jos kuopat jäävät violeteiksi tämän menetelmän suorittamisen jälkeen, näytteet on testattava uudelleen.

Huomautuksia:

- PreservCyt-liuosnäytteiden tulee ravistamisen jälkeen muuttua vaaleanpunaisiksi eikä keltaisiksi.
- Kun asetat hybridisointimikrolevyn Microplate Heater I -laitteeseen, varmista, ettei ainetta läiky yli.

7. Inkuboi ennalta kuumennetussa ja 65 ± 2 °C:seen säädettyssä Microplate Heater I -laitteessa 60 ± 5 minuuttia.

Hybridisointimenetelmä mikroputkia ja vesihaudetta käyttäen

Huomautuksia:

- *digene* HC2 DNA Collection -keruulaitteella STM:ään kerättyjen näytteiden käsittelyä MST Vortexer 2 -menetelmän mukaisella sekoituksella ja vesihaudemenetelmän mukaisella hybridisoinnilla **ei ole varmennettu**. *digene* HC2 DNA Collection -keruulaitteella STM:ään

kerätyt, MST Vortexer 2 -menetelmällä käsitellyt näytteet voidaan hybridisoida **vain** Microplate Heater I -menetelmällä.

- Jos denaturoitua näytettä on säilytetty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, anna näytteen lämmetä $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen ja vorteksoi näyte perusteellisesti ennen hybridisoinnin jatkamista.

1. Merkitse tarvittava määrä puhtaita hybridisointimikroputkia ja aseta ne mikroputkitelineeseen.
2. Poista kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet vesihauteesta inkuboinnin jälkeen. Vorteksoi kutakin putkea erikseen vähintään viiden sekunnin ajan juuri ennen osanäytteiden ottamista.
3. Pipetoi $75\text{ }\mu\text{l}$ sekä kalibraattoria, laatukontrollia että näytettä tyhjän hybridisointimikrolevyn **pohjalle** Valmistelut-kohdassa kuvatun levyasettelun mukaisesti. Vältä koskettamasta mikroputken seinämiä ja pyri rajoittamaan ilmakuplien syntymistä. Käytä kalibraattoreiden, laatukontrollien tai näytteiden ristikontaminaation estämiseksi kuhunkin siirtoon puhdasta, erikoispitkää pipetinkärkeä. Näytteenottovälinettä ei välttämättä tarvitse poistaa näytteenkuljetusputkesta. Denaturoidut näytteet voidaan sulkea näytteenottoputkien kierrekorkeilla ja säilyttää yhdessä putkiin jäävien näytteenottovälineiden kanssa.

Huomautus: Virheellisiä positiivisia tuloksia voidaan saada, jos näytteitä ei siirretä varovasti. Näytteen siirron aikana pipetin kärki ei $75\text{ }\mu\text{l}$:n osanäytettä otettaessa saa koskettaa putken sisäpintaa.

4. Siirrettyäsi viimeisen näytteen **inkuboi hybridisointimikroputkia 10 minuuttia $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa.**
 5. Ota valmistetusta ja perusteellisesti vorteksoidusta koetinseoksesta osanäyte kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön. Annostele kalibraattoreita, laatukontrolleja ja näytteitä sisältäviin mikroputkiin varovasti $25\text{ }\mu\text{l}$ koetinseosta käyttämällä 8-kanavaista pipettiä, johon vaihdetaan uudet kärjet kullakin rivillä. Annostele koetin hybridisointimikroputkiin takaisin roiskumista välttäen. Vältä koskettamasta putkien seinämiin. Tarkista teline alapäin, jotta saat varmistettua kaikissa putkissa olevan sopiva määrä koetinseosta.
 6. Peitä mikroputket mikrolevyn tiivisteellä. Aseta telineen suojus telineen päälle. Ravistele mikroputkitelinettä 3 ± 2 minuuttia Rotary Shaker I -laitteessa $1\ 100 \pm 100$ kierroksen minuuttinopeudella. *Kalibraattorien, laatukontrollien ja näytteiden on muututtava keltaisiksi ravistelun jälkeen.* Violetin värisiksi jäävissä kuopissa ei ehkä ole ollut tarpeeksi koetinseosta. Lisää vielä $25\text{ }\mu\text{l}$ koetinseosta violeteiksi jääneisiin näytteisiin ja ravistele uudelleen. Jos putket jäävät violeteiksi tämän menetelmän suorittamisen jälkeen, näytteet on testattava uudelleen.
- Huomautus:** Ravistelun jälkeen PreservCyt-liuosnäytteiden pitää muuttua keltaisen sijasta vaaleanpunaisiksi.
7. Inkuboi $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa vesihauteessa 60 ± 5 minuuttia. Varmista, että vesihauteessa on riittävästi vettä peittämään koko hybridisointiseoksen määrä. Mikroputkitelineen voidaan antaa kellua vesihauteessa.

Huomautus: luo levyn asettelutiedosto käyttämällä *digene*-analyysiohjelmistoa, jos asettelutiedostoa ei ole luotu aiemmin.

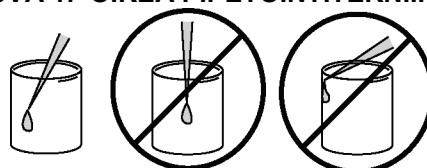
HYBRIDIN SIEPPAUS

1. Poista levykehikosta sieppausmikrolevyn kuopat, joita ei tarvita. Palauta käyttämättömät mikrolevykuopat niiden alkuperäiseen pussiin ja sulje se. Merkitse palstat numeroimalla jokainen 1, 2, 3 . . . Varusta mikrolevy asianmukaisella tunnisteella. Näytteet lisätään kuoppiin Valmistelut-kohdan mukaisesti luodun esimerkkiasettelun mukaisesti.
2. Poista kalibraattoreita, kontrolleja ja näytteitä sisältävä hybridisointimikrolevy varovasti Microplate Heater I:stä. Poista levyn kansi välittömästi ja aseta se puhtaalle pinnalle. Vaihtoehtoisesti poista

mikroputkeline vesihauteesta. Poista telineen kansi heti ja vedä levytiivistettä hitaasti ylöspäin telineen yli.

- Siirrä kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden koko määrä (noin 100 µl) hybridisointimikrolevyn kuopista tai mikroputkista vastaavan sieppausmikrolevyn kuopan pohjalle 8-kanavaisella pipetillä. Käytä jokaisen kuoppapalstan siirtoon uusia pipetin kärkiä kahdeksankanavaisessa pipettorissa ja anna jokaisen pipetin kärjen tyhjentyä kokonaan, jotta koko näyte siirtyy putkeen. Pipetti voidaan haluttaessa vakauttaa tukemalla pipetinkärkien **keskivälin** kohtaa sieppausmikrolevyn kuoppien yläreunaa vasten (ks. kuva 1).

KUVA 1: OIKEA PIPETOINTITEKNIikka



OIKEIN

Älä pipetoi pystysuoraan. Vältettävä takaisin roiskumista.

Älä kosketa kärjellä kuopan reunaa.

- Sulje sieppausmikrolevy levyn kannella tai levytiivisteellä ja ravistele levyä 60 ± 5 minuuttia Rotary Shaker I -laitteessa $1\ 100 \pm 100$ kierroksen minuuttinopeudella $20\text{--}25$ °C:n lämpötilassa.
- Valmista pesupuskuri ja tarkista levykonepesurin huuhtelu- ja jätesäiliöt tämän inkuboinnin aikana. Katso lisätietoja Reagenssien valmistus ja säilytys -kohdasta.
- Kun sieppausvaihe on suoritettu, poista sieppausmikrolevy Rotary Shaker I -laitteesta ja poista mikrolevyn kansi tai mikrolevyn tiiviste varovasti. Kaada kuoppien neste viemärialtaaseen; käännä mikrolevy ylösalaisin viemärialtaan päällä ja ravistele voimakkein, alaspäin suuntautuvien liikkein varoen dekantoimasta liian lähellä viemärialtaan pohjaa, jolloin syntyisi takaisinroiskeita. **Älä käännä levyä uudelleen**, vaan blottaa taputtelemalla lujasti 2–3 kertaa puhtaan Kimtowels-liinan tai vastaavan nukkaamattoman paperiliinan päällä. Varmista, että missään kupassa ei ole yhtään nestettä ja että levyn päällysosa on kuiva.

HYBRIDIN TUNNISTUS

Huomautuksia:

- Tee lisäys koko levyllä vasemmalta oikealle 8-kanavaisella pipettorilla.
 - On suositeltavaa käyttää käänteispiipetointitekniikkaa, sillä se parantaa reagenssin annostelun yhdenmukaisuutta. Tässä menetelmässä pipetinkärjet ensin ylitätetään käyttämällä pipetin imu-tyhjennysäädön (männän) toista vastetta. Ks. toimenpide jäljempänä. Pyyhi kärjet kertakäyttöiseen reagenssialtaaseen ylimääräisen reagenssin poistamiseksi ennen tyhjentämistä mikrolevylle.
 - Pipettorin voi haluttaessa tukevoittaa laskemalla pipettien kärkien keskiosa mikrolevyn kuoppien yläreunaa vasten. Varo koskettamasta mikrolevyn kuoppien seinämiin näytteiden ristikontaminaation välttämiseksi. Ks. edellä oleva kuva 1.
- Ota tunnistusreagenssi 1:stä tarvittavan suuruinen osanäyte kertakäyttöiseen reagenssialtaaseen (ks. ohjeet kohdasta *Reagenssien valmistus ja säilytys*). Pipetoi varovasti 8-kanavaisella pipetillä ja käänteistä pipetointimenetelmää noudattaen 75 µl:n tunnistusreagenssi 1:tä kaikkiin sieppausmikrolevyn kuoppiin.

Käänteinen pipetointitoimenpide:

- a) Kiinnitä kärjet 8-kanavaisen pipettiin ja varmista, että kaikki kärjet tulevat tiukasti kiinni.
 - b) Vedä pipettorin mäntä ensimmäisen rajoittimen ohi toiseen rajoittimeen.
 - c) Upota kärjet tunnistusreagenssi 1:n liuokseen.
 - d) Vapauta mäntä hitaasti ja anna kärkien täytyä liuoksella.
 - e) Annostele liuosta mikrolevyn kuoppiin (75 µl) painamalla mäntä ensimmäiseen rajoittimeen saakka. Älä vapauta mäntää, ennen kuin pipetinkärjet ovat uponneet takaisin tunnistusreagenssi 1 -liuokseen.
 - f) Täytä kärjet uudelleen ja toista, kunnes kaikki kuopat on täytetty. Täytä mikrolevyn kuopat vasemmalta oikealle. Varmista tarkkailemalla vaaleanpunaisen värin voimakkuutta, että kaikki kuopat ovat täynnä. Värin voimakkuuden tulee olla sama kaikissa kuopissa.
2. Peitä levyt levyn kannella tai puhtaalla Parafilm-kalvolla tai vastaavalla ja inkuboi 20–25 °C:ssa 30–45 minuutin ajan.

PESEMINEN

Pese sieppausmikrolevy käyttäen jompaakumpaa seuraavista menetelmistä.

Levykonepesurimenetelmä

Huomautus: Pidä levykonepesuri aina **päälle** kytkettynä. Tarkista, että huuhteluallas on täysi ja jätesäiliö ovat tyhjiä. Levykonepesuri puhdistaa järjestelmän säännöllisesti huuhtelemalla sen. Katso lisätietoja levykonepesurin käyttöoppaasta.

AINA ENNEN KÄYTTÖÄ:

- Varmista, että pesusäiliöön on lisätty pesupuskuriliuosta vähintään 1 litran merkkiin saakka. Jos näin ei ole, valmista pesupuskuriliuos. Katso lisätietoja Reagenssien valmistus ja säilytys -kohdasta.
- Varmista, että huuhteluallas on täytetty deionisoidulla tai tislatulla vedellä.
- Varmista, että jätesäiliö on tyhjä ja sen kansi kunnolla kiinni.
- Levykonepesuri esitäyttää itsensä automaattisesti ennen jokaista pesua ja tekee huuhtelun aina pesun jälkeen.

1. Ota levyn kansi pois ja aseta levy levykonepesurin alustalle.
2. Varmista, että virta on kytketty ja että näytössä lukee ”Digene Wash Ready” (digene-pesu valmis) tai ”P1”.

Huomautus: Jos sieppauskuopista käytetään vain osittainen liuska, tyhjät mikrolevyn kuopat pitää palstan täydentämiseksi laittaa sieppausmikrolevyyn ennen pesemistä.

3. Valitse pestävien liuskojen määrä painamalla ”Rows” (Rivit) -näppäintä ja säädä määrä ”+”- ja ”-”-näppäimillä. Painamalla ”Rows” (Rivit) -näppäintä palaat ”Digene Wash Ready” (Digene-pesu valmis)- tai ”P1”-näyttöön.
4. Aloita valitsemalla ”Start/Stop” (Käynnistä/pysäytä).
5. Pesulaite suorittaa kuusi täyttö- ja imujaksoa, joihin kuluu noin 10 minuuttia. Koska ohjelmassa tapahtuu lyhyt tauko, varo poistamasta mikrolevyä liian aikaisin. Kun levykonepesuri on päättänyt pesun, näyttöön tulee teksti ”Digene Wash Ready” tai ”P1”.
6. Poista mikrolevy pesulaitteesta ohjelman päätyttyä. Mikrolevyn tulee näyttää valkoiselta, eikä mikrolevyn kuopissa saa olla vaaleanpunaisia nestejäämiä.

Manuaalinen pesumenetelmä

1. Poista tunnistusreagenssi 1 kuopista asettamalla puhtaita Kimtowels-pyyhkeitä tai vastaavia nukkaamattomia paperipyyhkeitä mikrolevyn päälle ja käännä mikrolevy varovasti ylösalaisin. Varmista ennen kääntämistä, että paperi on kosketuksissa levyn kanssa koko sen pinta-alalla. Anna mikrolevyn valua 1–2 minuutin ajan. Blottaa kuoppa puhtailla Kimtowels-pyyhkeillä tai

vastaavilla nukkaamattomilla paperipyyhkeillä. Hävitä käytetyt paperipyyhkeet huolellisesti alkalisen fosfaatasikontaminaation välttämiseksi myöhemmissä vaiheissa.

2. Kun käytät pesulaitetta, pese mikrolevy käsin kuusi kertaa. Kuopat pestään niin, että ne tulvivat yli, jotta tunnistusreagenssi 1 saadaan poistetuksi kuoppien huipuista. Peseminen aloitetaan kuopasta A1 ja jatketaan serpentiinimäisesti oikealle ja alaspäin. Kun kaikki kuopat ovat täynnä, neste dekantoidaan viemärialtaaseen voimakkaalla alaspäin suuntautuvalla liikkeellä. Toinen pesu aloitetaan kuopasta H12 ja siirrytään serpentiinimäisesti vasemmalle ja ylöspäin. Tämä kahden pesun sarja toistetaan vielä kaksi kertaa, jolloin saadaan yhteensä kuusi pesua kuoppaa kohti.
3. Blottaa mikrolevy pesun jälkeen kääntämällä se ylösalaisin puhtaille Kimtowels-pyyhkeille tai vastaaville nukkaamattomille paperipyyhkeille ja napauttamalla napakasti 3–4 kertaa. Vaihda paperiliina ja blottaa uudelleen. Anna mikrolevyn olla ylösalaisin ja valua viiden minuutin ajan. Blottaa mikrolevy vielä kerran.
4. Mikrolevyn tulee näyttää valkoiselta, eikä mikrolevyn kuopissa saa olla vaaleanpunaisia nestejäämiä.

SIGNAALIN VAHVISTUS

HUOMAUTUKSIA:

- Käytä uusia käsineitä tunnistusreagenssi 2:n käsittelyssä.
 - Ota kertakäyttöiseen reagenssisäiliöön **vain** se reagenssimäärä, joka tarvitaan analyysin suorittamiseen, jottei tunnistusreagenssi 2 kontaminoidu. Ks. kohta Reagenssien valmistus. **Älä palauta tunnistusreagenssi 2:ta alkuperäiseen pulloon. Hävitä käyttämättä jäänyt aine käytön jälkeen.**
 - Tunnistusreagenssi 2:n lisäys on tehtävä yhtäjaksoisesti. Kaikkien kuoppien inkubointiajankohtien tulee olla mahdollisimman lähekkäin.
 - Varo koskettamasta sieppausmikrolevyn kuoppien reunoihin tai läikäyttämistä reagenssia takaisin kärkiin, sillä se voisi johtaa näytteiden ristikontaminaation (katso , *kaavio*).
1. Pipetoi varovasti 75 µl:a tunnistusreagenssi 2:ta kuhunkin sieppausmikrolevyn kuoppaan 8-kanavaisella annostelijalla edellä kuvatun mukaisesti. *Kaikkien mikrolevyn kuoppien värin tulee muuttua keltaiseksi.* Varmista tarkkailemalla värin voimakkuutta, että kaikki kuopat ovat täynnä. Värin voimakkuuden tulee olla sama kaikissa kuopissa.
 2. Peitä mikrolevyt levyn kannella tai puhtaalla Parafilm-kalvolla tai vastaavalla ja inkuboi 20–25 °C:ssa 15 minuutin ajan. Suojaa suoralta auringonvalolta.
 3. Lue mikrolevy DML-laitteella 15 minuutin inkuboinnin jälkeen (viimeistään 30 minuutin inkuboinnin jälkeen) 20–25 °C:n lämpötilassa.
 4. Analyysikohtainen ohjelmistoprotokolla mahdollistaa asiaankuuluvan analyysin tietojen syöttämisen suoraan ohjelmistoon.
 5. Jos koko mikrolevyä ei ole käytetty, poista käytetyt mikrolevyn kuopat mikrolevyn pidikkeestä, huuhtelee pidike perusteellisesti tislattulla tai deionisoidulla vedellä, kuivaa ja laita talteen seuraavaa koetta varten.

ANALYYSIN KALIBROINNIN VARMENNUSKRITEERIT

Analyysin kalibroinnin varmuuksella varmistetaan, että reagenssit ja hankitut kalibraattorit ja laatukontrollit toimivat moitteettomasti ja mahdollistavat analyysin raja-arvon tarkan määrityksen. *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa analyysin kalibrointi on tehtävä jokaisessa analyysissä, mistä syystä jokainen analyysi on varmennettava seuraavien ehtojen mukaisesti. Tätä varmuusmenettelyä ei ole tarkoitettu korvaamaan sisäisiä laaduntarkkailutestejä. *digene*-analyysiohjelmiston analyysiprotokollat varmentavat automaattisesti alla olevat kriteerit.

1. Negatiivinen kalibraattori

Negatiivinen kalibraattori tulee testata kussakin analyysissä kolmena rinnakkaiskokeena. Negatiivisen kalibraattorin keskiarvon on oltava ≥ 10 ja ≤ 250 RLU:ta, jotta analyysiä voidaan jatkaa. Negatiivisen kalibraattorin tuloksissa variaatiokertoimen (%CV) pitäisi olla ≤ 25 %. Jos %CV on > 25 , keskiarvosta kauimpana olevan RLU-arvon antava arvo hylätään alueen ulkopuolisena tuloksena, ja keskiarvo lasketaan uudelleen kahdella jäljellä olevalla arvolla. Jos keskiarvon ja kummankin kahdesta arvosta välinen ero on ≤ 25 %, jatka vaiheeseen 2. Muussa tapauksessa analyysin kalibroinnin varmuus on virheellinen, ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

2. Kalibraattorit

Kalibraattori(t) on kussakin analyysissä testattava kolmena rinnakkaiskokeena. CPC:n kohdalla molemmat kalibraattorit testataan kolmena rinnakkaiskokeena. Kalibraattorin tuloksissa variaatiokertoimen (%CV) pitäisi olla ≤ 15 %. CPC:n tapauksessa LRC:n, HRC:n ja LRC-HRC-yhdistelmän %CV-arvon pitää olla ≤ 15 %. Jos %CV on > 15 , kalibraattorin arvo, jolla on keskiarvosta kauimpana oleva RLU-arvo, hylätään alueen ulkopuolisena tuloksena, ja keskiarvo lasketaan uudelleen jäljellä olevilla kalibraattoriarvoilla. Vain yksi LRC- ja yksi HRC-replikaatti voidaan hylätä. Jos kalibraattorien %CV on ≤ 15 %, jatka vaiheeseen 3. Muussa tapauksessa analyysin kalibroinnin varmuus on virheellinen, ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

digene-analyysiohjelma suorittaa edellä kalibraattoreille kuvatun analyysin kalibroinnin varmuuksen automaattisesti, ja se tulostetaan tietojen analyysiraporttiin. **HPV:n *digene*-analyysiprotokollat varmentavat automaattisesti, että matalan ja korkean riskin HPV-kalibraattorien %CV-arvo on ≤ 15 %.** *digene*-analyysiohjelmiston versiot v1.0.2 ja v1.0.3 EIVÄT kuitenkaan mitätöi analyysiä, ellei %CV ole > 25 % kalibraattorien osalta. Tästä syystä käyttäjän on varmennettava manuaalisesti, että *digene*-analyysiohjelmiston laskema %CV-arvo on ≤ 15 %, ja toimittava alla olevassa taulukossa tilanteen 1 osalta kuvatun menettelyn mukaisesti. Jos kalibraattorireplikaattien %CV osuu välille 15–25, tarkista tilanteita 2 tai 3 koskevat ohjeet alla olevasta taulukosta ja jatka ”Käyttäjän toimenpide” -ohjeen mukaisesti.

Tilanne	Raportin %CV LRC- ja/tai HRC-replikaateille	<i>digene</i> -analyysiohjelmiston tekemä toimenpide	Käyttäjän toimenpide
1	≤ 15 %	Analyysin ilmoitettu olevan kelvollinen ("Valid")	Tulokset voidaan raportoida; ei lisätoimenpiteitä.
2	15–25 %	Ei poistettuja alueen ulkopuolisia tuloksia ja analyysin ilmoitettu olevan kelvollinen ("Valid")	Poista kauimpana keskiarvosta oleva kalibraattorin RLU-arvo. Laske kalibraattorin %CV uudelleen kahdella jäljellä olevalla arvolla. Jos jäljellä olevien RLU-arvojen %CV on > 15 %, analyysi on virheellinen. Tuloksia ei saa raportoida. Jos jäljellä olevien RLU-arvojen %CV-arvo on ≤ 15 %, laske analyysin raja-arvo uudelleen ja laske sitten uudelleen RLU:raja-arvosuhde jokaiselle näytteelle tätä raja-arvoa käyttäen. Uudelleen lasketut arvot voidaan raportoida.
3	15–25 %	Yksi alueen ulkopuolinen tulos poistettu kalibraattoria kohti ja analyysin ilmoitettu olevan kelvollinen ("Valid")	Analyysi on virheellinen. Tuloksia ei saa raportoida. Analyysi on toistettava.
4	> 25 %	Yksi alueen ulkopuolinen tulos poistettu ja analyysin ilmoitettu olevan virheellinen ("Invalid")	Analyysi on virheellinen. Tuloksia ei saa raportoida. Analyysi on toistettava.

%CV:n manuaalisesti laskemista varten tilanteen 2 edellyttämällä tavalla käyttäjän tulee jakaa jäljellä olevien replikaattien RLU-arvojen keskihajonta (STDEV) (n-1) jäljellä olevien replikaattien RLU-arvojen (LRC tai HRC tai molemmat) keskiarvolla ja kertoa tulos sadalla.

Käyttäjä voi laskea %CV-arvon Microsoft® Excel® -ohjelmistolla (toimitetaan *digene*-analyysiohjelmiston edellisen version mukana) laskemalla kalibraattorin replikaattien keskihajonnan käyttämällä *STDEV*-kaavaa ja määrittämällä kalibraattorin keskimääräisen RLU-arvon käyttämällä *AVERAGE*-kaavaa. Kun nämä kaksi arvoa on saatu, *STDEV* jaetaan *AVERAGE*:lla ja kertomalla tulos sadalla saadaan %CV.

$$(\text{STDEV}/\text{AVERAGE}) * 100 = \%CV$$

Kaikki %CV:n laskemiseen, analyysin raja-arvon uudelleenlaskemiseen tai näytteiden RLU/raja-arvon uudelleenlaskemiseen liittyvät kysymykset tulee osoittaa QIAGEN paikalliselle edustajalle.

Kalibraattorin toistettavuuden määrittämiseksi ja sen arvioimista varten, miten usein manuaaliset uudelleenlaskennat ovat tarpeen, kokosimme yhteen tulokset kolmesta kliinisestä arvioinnista, joissa oli 152 *digene* HC2 HPV DNA -kokeen analyysiajoa. Tulokset osoittivat, että näiden 152 ajon keskimääräinen %CV oli 8,1. Kun otettiin huomioon kaikki kolme kalibraattorireplikaattia kokeen ajoa kohti, havaittiin, että kalibraattorin toistettavuus oli 152 ajossa > 15 %CV vain 17 tapauksessa (11,2 %) ja että 10 näistä 17 kokeen ajosta antoi %CV-tulokseksi 15–25 (tilanne 2). Niistä 17 kokeen ajosta, joiden %CV oli > 15, poistettiin yksi alueen ulkopuolinen tulos, ja %CV laskettiin uudelleen. Kun noudatettiin tilanteen 2 käyttäjän toimenpide -ohjetta, vain yhden kokeen ajon %CV oli > 15, mikä osoitti kokeen ajon virheelliseksi. Jäljellä olleiden 151 ajon %CV-keskiarvoksi laskettiin 6,0.

3. Kalibraattorin keskiarvon (LRC tai HRC) ja negatiivisen kalibraattorin keskiarvon (NC) tuloksia käytetään laskettaessa kunkin koettimien LRC/NC- tai HRC/NC-suhde. *digene*-analyysiohjelmiston aiemmat versiot (V1.0.2 ja V1.0.3) eivät laske oikein hyväksyttäviä vaihteluvälejä. Näiden suhteiden on täytettävä seuraavat kriteerit analyysin kalibroinnin varmentamiseksi, ennen kuin näytteiden tulokset voidaan tulkita.

CPC-MENETELMÄ	KAHDEN KOETTIMEN MENETELMÄ
Analyysin kalibroinnin varmennus hyväksyttävät vaihteluvälit	Analyysin kalibroinnin varmennus hyväksyttävät vaihteluvälit
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (LR-puoli)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (HR-puoli)
$2,0 \leq (LRC \text{ ja } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Laske sopiva $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$ - tai $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ -suhde jokaisella koetinsarjalle. Jos suhteet ovat $\geq 2,0$ ja ≤ 15 , jatka seuraavaan vaiheeseen. Jos jokin suhteista on $< 2,0$ tai > 15 , **analyysi ei ole kelvollinen kyseisen koettimen osalta ja on toistettava**. Kaikki potilasnäytteet kyseisen ajon suhteen on ajettava uudestaan.

Huomautus: negatiivisen kalibraattorin ja positiivisten kalibraattorien hyväksyttävät vaihteluvälit on määritetty ainoastaan DML-laitteelle.

RAJA-ARVON LASKENTA

Kun analyysi on varmennettu yllä esitettyjen kriteerien mukaisesti, raja-arvot positiivisten näytteiden määrittämiseksi ovat seuraavat:

- 1) Yhdistelmäkoetinseosta käytävä menetelmä: $(LRC\text{-replikaatit} + HRC\text{-replikaatit})$
replikaattien lukumäärä
- 2) Kahden koettimen menetelmä: matalan riskin HPV-koettimen raja-arvo = $LRC\bar{x}$
korkean riskin HPV-koettimen raja-arvo = $HRC\bar{x}$

Raja-arvojen esimerkkilaskenta					
Menetelmä:		Matalan riskin tai korkean riskin HPV-koetin Kahden koettimen menetelmä	Matalan riskin HPV-koetin, CPC-menetelmä	Korkean riskin HPV-koetin CPC-menetelmä	Yhdistelmä-HPV-koetin CPC-menetelmä
	NC RLU - arvot	LRC- tai HRC RLU -arvot	LRC RLU - arvot	HRC RLU - arvot	LRC- ja HRC RLU -arvot
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
RLU-keskiarvo	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$LRC\bar{x}/NC\bar{x}$	-	3,31	3,54	3,00	3,32

Positiivisen kalibraattorin RLU-keskiarvo määrittää analyysin raja-arvon. Tästä syystä positiivinen raja-arvo ($LRC\bar{x}$) on 318.

* Kaikkien kuuden replikaatin %CV-keskiarvo oli 16,8. Replikaatti, jonka arvo oli 235, hylättiin alueen ulkopuolisena tuloksena. Jäljelle jääneiden replikaattien %CV oli 13,0 ja keskiarvo 318,8. HRC:n aloitus-%CV oli 11,5.

Kaikkien näytteiden RLU-arvot suhteutetaan asiaankuuluvaan raja-arvoon (CO). Esimerkiksi kaikki matalan riskin HPV-koettimella testatut kokeet pitäisi ilmaista näytteen RLU/matalan riskin raja-arvona. Sama voidaan tehdä näytteille, jotka on testattu korkean riskin HPV-koettimella tai CPC-koettimella.

Huomautuksia: Kaikkien näytteiden RLU/CO-arvot ja positiiviset/negatiiviset tulokset ilmoitetaan DML-laitteen *tietojen analyysiraportissa*.

Rapid Capture System -järjestelmän laitesovelluksessa RCS HPV -ohjelmistoprotokolla on ohjelmoitu käyttämään Calibration Adjustment Factor (CAF) -korjauserrointa 0,8 kelvollisten positiivisten kalibraattorireplikaattien keskimääräiseen RLU-arvoon. CAF-korjauserroin on välttämätön, jotta analyysin suorituskyykyarvot vastaisivat manuaalisen koemenetelmän suorituskyykyarvoja. Tämä muutos koskee vain niitä analyyskejä, jotka tehdään Rapid Capture System -järjestelmän laitesovelluksella. Siksi tarkkojen koetulosten saamisen kannalta on ratkaisevan tärkeää, että kuhunkin tiettyyn koemenetelmään valitaan oikea ohjelmistoprotokolla. Kaikkien näytteiden RLU-arvot suhteutetaan kyseiseen raja-arvoon (CO). Kaikki analyysit on esimerkiksi ilmoitettava näytteen RLU/CO-suhteena.

LAADUNTARKKAILU

Laaduntarkkailunäytteet toimitetaan *digene* HC2 HPV DNA -kokeen mukana. Katso vastaavat käyttöoppaasta ohjeet laatuksien (laaduntarkkailunäytteiden) eränumeroiden ja viimeisten käyttöpäivämäärien syöttöohjeet. Näiden laatuksien tulee olla mukana jokaisessa kokeen ajossa, ja jotta ajoa voitaisiin pitää kelvollisena, kunkin laatuksien RLU/CO-arvon pitää olla alla esitetyillä hyväksyttävillä vaihteluväleillä. **Jos laatuksien tulokset eivät ole näillä vaihteluväleillä, analyysi on virheellinen ja pitää toistaa.** Virheellisissä ajoissa saatuja potilastuloksia ei myöskään pidä raportoida.

Laatu-kontrolli	HPV-tyyppi	Odotettu tulos (RLU/raja-arvo) Matalan riskin HPV-koetin			
		Minimi	Maksimi	Keskiarvo	%CV
QC1-LR	Matala riski (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Korkea riski (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Laatu-Kontrolli	HPV-tyyppi	Odotettu tulos (RLU/raja-arvo) Korkean riskin HPV-koetin			
		Minimi	Maksimi	Keskiarvo	%CV
QC1-LR	Matala riski (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Korkea riski (HPV 16)	2	8	5,0	25

Laatu-Kontrolli	HPV-tyyppi	Odotettu tulos (RLU/raja-arvo) CPC-HPV-koetin			
		Minimi	Maksimi	Keskiarvo	%CV
QC1-LR	Matala riski (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Korkea riski (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Tarvikesarjaan kuuluvat laaduntarkkailuaineet ovat kloonattuja HPV-DNA-kohteita eivätkä luonnonvaraisen HPV:n johdannaisia. Kyseessä on samantyyppinen materiaali kuin käytetään *digene* HC2 HPV DNA -kokeen mukana toimitetuille kalibraattoreille.
2. Tämä laaduntarkkailumateriaali ei toimi sopivana kontrollina PreservCyt-liuoksen tai SurePath-säilöntänesteen käsittelyä varten.
3. Tähän koetarvikesarjaan kuuluvia laatuksia on käytettävä sisäiseen laaduntarkkailuun. Muita laatuksia voidaan testata paikallisten ja/tai kansallisten määräysten tai akkreditoitujen organisaatioiden määräysten ohjeiden tai vaatimusten mukaisella tavalla.

NÄYTTEIDEN TULOSTEN TULKINTA

Huomautus: 1 pg/ml:n raja-arvo *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa vastaa 100 000 HPV-kopiota/ml tai 5 000 HPV-kopiota/analyysi.

1. STM-näytteitä, joiden RLU/raja-arvo-suhde on $\geq 1,0$ **vain matalan riskin HPV-koettimessa**, pidetään "positiivisina" yhdelle tai useammalle HPV-tyypille 6, 11, 42, 43 tai 44.
2. STM-näytteitä, joiden RLU/raja-arvo-suhde on $\geq 1,0$ **vain korkean riskin HPV-koettimessa**, pidetään "positiivisina" yhdelle tai useammalle HPV-tyypille 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68.
3. Jos PreservCyt-näytteitä testattaessa jonkin näytteen RLU/CO-suhde on $\geq 1,0$ ja $< 2,5$, QIAGEN suosittaa, että näyte testataan uudelleen. Jos uusintatestauksessa alustava tulos on positiivinen ($\geq 1,0$ RLU/CO), näyte voidaan raportoida positiiviseksi eikä muuta uusintatestausta tarvitse suorittaa. Jos kuitenkin ensimmäisessä uusintakokeessa tulos on negatiivinen ($< 1,0$), lopullisen tuloksen saamiseksi on tehtävä toinen uusintakoe (kolmas tulos). Toisesta uusintakokeesta saatua tulosta pidetään lopullisena tuloksena, ja se ilmoitetaan tuloksena.
4. Jos näytteen RLU/raja-arvo-suhde on vain hieman alle 1,0 ja epäillään korkean riskin HPV-infektiota, tulee harkita vaihtoehtoisia koemenetelmiä ja/tai näytteen uusimista.
5. STM-näytteitä, joiden RLU/raja-arvo-suhde on $\geq 1,0$ sekä matalan riskin HPV-koettimessa että korkean riskin HPV-koettimessa, pidetään "positiivisina" yhdelle tai useammalle HPV-tyypille kummastakin koetinryhmästä.
6. STM-näytteitä, joiden RLU/raja-arvo-suhde on $\geq 1,0$ yhdistelmäkoetinseoksessa, pidetään positiivisina yhdelle tai useammalle HPV-tyypille 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68.
7. STM-näytteitä, joiden RLU/raja-arvo-suhde on $< 1,0$ yhdistelmäkoetinseoksessa tai sekä matalan riskin HPV-koettimessa että korkean riskin HPV-koettimessa, pidetään "negatiivisina" tai "ei HPV DNA -löydöstä" 18 testatulle HPV-tyypille. HVP DNA -sekvenssit joko puuttuvat tai HPV DNA:n määrä jää analyysin havaitsemisrajan alapuolelle.

MATALAN RISKIN JA KORKEAN RISKIN HPV-KÄYTTÖAIHETTA TUKEVAT TIEDOT

Papa-koetuloksen ASC-US saaneiden potilaiden kliininen seulonta kolposkopia-lähetteen tarpeen määrittämistä varten

Yhdysvalloissa suoritettiin vuonna 1996 Kaiser Foundation Research Institutun ja Kaiser Permanente Medical Groupin johdolla tutkimus HPV:n DNA-kokeiden hyödyllisyydestä naisilla, joilla oli positiivisen löydöksen raja-arvon läheisyyteen määritetty Papa-löydös ("Utility of HPV DNA -kokeening for Triage of Women with Borderline Pap Smears"). Kaiser-klinikoilla tutkimuksissa käyville naisilta otettiin kohdunkaulanäytteet rutiininaista Papa-koetta sekä *digene* HC2 HPV DNA -koetta varten. Alkuperäiset Papa-näytteet arvioitiin Bethesdan luokituksen mukaan. Euroopan yhteisössä käytössä oleva kohdunkaulan syövän seulonnan termistö kuvataan julkaisussa "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening"⁴⁰. Naiset (15-vuotiaat tai sitä vanhemmat), joiden Papa-näytetuloksissa oli ASC-US-löydös (merkitykseltään määrittelemättömiä epätyypillisiä soluja), palasivat kolposkopia- ja koepalatutkimukseen. Kolposkooppisesti ohjatut histologiset näytteet tutkittiin patologisesti, ja tehtiin alustava diagnoosi. Kunkin histologisen näytteen tarkasti myös puolueeton patologi, ja alkutarkastuksen ja puolueettoman tarkastuksen välillä ilmenneet eriävyydet ratkaisi kolmas patologi.

HPV:n DNA-testaus suoritettiin alkuperäiselle näytteelle, ja testauksessa käytettiin vain korkean riskin HPV-koetinta. HPV:N DNA-testaus suoritettiin *digene* HC2 HPV DNA -kokeen prototyypillä, jossa oli koettimet yhteentoista kolmestatoista korkean riskin HPV-koettimeen sisällytetystä HPV-tyypistä. Puuttuvat tyypit olivat HPV-tyypit 59 ja 68. Tämän eron ei oleteta vaikuttavan merkittävästi kyseisten kahden analyysin suorituskykyprofileihin.

Käytettävissä oli HPV-tulokset ja histologiset diagnoosit 885 testatulta naiselta, joiden Papa-kokeessa oli ASC-US-löydös. Useimmat potilaat tutkittiin ottamalla näytteet sekä STM:ään että PreservCyt-liuokseen. Koska *digene* HC2 HPV DNA -kokeen suorituskykyominaisuudet olivat samankaltaiset sekä STM:ssä että PreservCyt-liuoksessa, analyysin suorituskyky esitetään vain PreservCyt-liuoksen osalta.

Taulukossa 3 osoittaa, että potilailla, joilla Papa-kokeen tulos oli ASC-US, *digene* HC2 HPV DNA -kokeen negatiivinen ennustearvo HSIL:lle tai korkea-asteisemmalle sairaudelle kolposkopiassa oli 99 %.

Taulukko 3
***digene* HC2 HPV DNA -kokeen vertailu konsensushistologiaan**
ASC-US-Papa-ryhmä
Kaiser-tutkimus, PreservCyt-liuokseen otetut näytteet

		HSIL tai korkeampi kolposkopiahetkellä		
		+	-	Yhteensä
Korkean riskin HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Yhteensä	71	814	885

Herkkyys [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 95 %:n luottamusv. = 84,3–97,7
 Spesifisyys [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 95 %:n luottamusv. = 57,7–64,4
 Sairauden esiintyvyys = 8,0 % (71/885)
 Analyysin positiivinen ennustearvo = 17,2 % (66/383)
 Analyysin negatiivinen ennustearvo = 99,0 % (497/502)

Taulukko 4 osoittaa eri esiintyvyyssosuuksiin perustuvat teoreettiset positiiviset ja negatiiviset ennustearvot sille, että alkuperäinen ASC-US-löydös korkean riskin HPV-koettimella saatavissa tuloksissa osoittautuu HSIL:ksi tai korkeammaksi.

Taulukko 4
Teoreettinen positiivinen ja negatiivinen ennustearvo
Korkean riskin HPV-koetin
ASC-US-löydökset Papa-kokeessa

Teoreettinen HSIL:n yleisyys	Alkuperäinen ASC-US-Papa-tulos	
	Analyysin positiivinen ennustearvo	Analyysin negatiivinen ennustearvo
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

Taulukossa 5 esitetään tutkimuksen eri ikäryhmien väliset vaihtelut:

Taulukko 5
Kaiser-tutkimuksen materiaali
digene HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskyky verrattuna konsensushistologian tuloksiin (HSIL)
Ominaispiirteet eri ikäryhmissä

	Ikä < 30	Ikä 30–39	Ikä > 39
n	287	233	365
Sairauden esiintyvyyys (%)	12,2	11,2	2,7
Herkkyys (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95 %:n luottamusväli	90,0–100	69,9–97,6	44,4–97,5
Spesifisyys (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95 %:n luottamusväli	25,7–37,5	59,3–72,6	74,6–83,3
Negatiivinen ennustearvo (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Positiivinen ennustearvo (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Kliininen herkkyys ja spesifisyys määritettäessä sairastumisriskiä korkea-asteiseen tautiin niillä naisilla, joiden Papa-näytteessä on todettu LSIL tai HSIL

Kliininen monikeskustutkimus, jossa käytettiin *digene* HC2 HPV DNA -koetta, suoritettiin käyttämällä näytteitä, jotka oli kerätty useista USA:n länsi- ja eteläosissa sijaitsevista sairaaloista, joissa oli paljon kohdunkaulan sairauksia ja HPV-tapauksia, sekä hoitokeskusten kolposkopiaklinikoilta (3 paikkaa). HPV-testaus suoritettiin kolmessa tutkimuspaikassa, joilla ei ole yhteyttä niihin kolposkopiaklinikoihin, joista näytteet oli hankittu. Tutkimuspopulaatio koostui naisista, joilla oli äskettäin otetun Papa-näytteen perusteella diagnosoitu joko LSIL tai HSIL ja jotka oli lähetetty kolposkopiaseurantaan. Tutkimukseen kuuluneista 702 potilaasta 327 kohdalla Papa-tulos oli ASC-US-tilaa korkeampi, ja heille annettiin asiasta tarvittavat tiedot; heistä 96:lla lopullinen tila oli HSIL tai korkeampi. Irtoisolunäytteet kohdunkaulan kanavasta otettiin joko *digene* HC2 DNA -keruulaitteella ja asetettiin sen jälkeen STM:ään tai otettiin harjauslaitteella ja huuhdeltiin PreservCyt-liuoksessa. Näytteet otettiin kolposkopian yhteydessä. Näytteet tutkittiin *digene* HC2 HPV DNA -kokeella, ja tuloksia verrattiin kunkin potilaan kohdalla määritettyyn sairauden tilaan. Sairauden tila määritettiin histologisen arvioinnin tulosten perusteella. Jos kuitenkin histologia oli negatiivinen tai histologiset tulokset puuttuivat, sairauden tila määritettiin sytologisesti kolposkopiatutkimuksen yhteydessä (katso alla *taulukko 6*). *digene* HC2 HPV DNA -koe suoritettiin

kolmessa isossa suurkaupunkialueen hoitokeskuksessa, joilla ei ole yhteyttä kolposkopiassa kerättyjen näytteiden ottopaikkoihin. Sytologinen tutkimus tehtiin patologisessa referenssilaboratoriossa, ja histologinen testaus suoritettiin kolposkopian tehneissä laitoksissa. Koetuloksia verrattiin taudin tilaan arvioitaessa kokeen herkkyyttä, spesifisyyttä sekä negatiivista ja positiivista ennustearvoa korkea-asteinen kohdunkaulan neoplasian osoittamiseksi. Koska *digene* HC2 HPV DNA -kokeen suorituskykyominaisuudet olivat samankaltaiset sekä STM:ssä että PreservCyt-liuoksessa, analyysin suorituskyky esitetään vain PreservCyt-liuoksen osalta.

Mitään eroa ei havaittu korkean riskin HPV-testauksen tuloksissa STM-näytteistä ja PreservCyt-liuosnäytteistä. Alla olevasta taulukosta nähdään korkean riskin HPV-koettimen tulokset tämän populaation osalta:

Taulukko 6
Potilaan sairauden tilan algoritmi

Sytologinen löydös	Histologinen löydös	Sairauden tila
NEG	NEG tai Ei tehty*	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Syöpä	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	Ei tehty*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Syöpä	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ei tehty*	HSIL
Syöpä	HSIL	HSIL
NEG	Syöpä	HSIL+
LSIL	Syöpä	HSIL+
HSIL	Syöpä	HSIL+
Syöpä	Ei tehty*	HSIL+
Syöpä	Syöpä	HSIL+

* Koepalan ottoa ja/tai endoserviksen kaavintaa ei suoritettu, koska kolposkopiassa ei havaittu poikkeavuuksia tai histologinen tulos ei ollut käytettävissä.

Taulukoissa 7 ja 8 esitetään *digene* HC2 HPV DNA -kokeen suorituskyky määritettynä käyttämällä 327 PreservCyt-näytettä, joista 96 otettiin naisilta, joilla oli diagnosoitu korkea-asteinen kohdunkaulan sairaus. Vertailussa käytettiin kaikkia tutkimukseen osallistuneita potilaita, joiden Papa-näytteessä oli todettu muutoksia. Esitetyt vertailut koskevat korkean riskin HPV-koettimella testattuja PreservCyt-näytteitä.

Taulukko 7
Korkean riskin HPV-koettimen tulokset

Papa-lausunto	Lopullinen sairauden tila						Yhteensä
	HSIL		LSIL		Negatiivinen		
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Korkean riskin HPV:n tulokset							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Yhteensä	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Taulukon 8 mukaan *digene* HC2 HPV DNA -kokeen, jossa käytettiin korkean riskin HPV-koetinta, kokonaisherkkyydeksi saatiin noin 93 % korkea-asteisesta neoplasiasta kärsivien naisten tunnistamisessa tutkimuspopulaatiosta, joka oli lähetetty kolposkopiaan Papa-kokeen diagnoosiin LSIL, HSIL tai muuhun vastaavaan perustuen. Koe osoitti myös lähes 93 %:n negatiivisen ennustearvon tässä tutkimuspopulaatiossa.

Taulukko 8
Suorituskykyominaisuudet
digene HC2 High-Risk HPV DNA -koe lähetteen saaneilla potilailla
 Papa-kokeen tulos LSIL tai korkeampi ja lopullinen sairauden tila HSIL

Tulos korkean riskin HPV-koettimella	Papa-lausunto LSIL tai HSIL → HSIL-sairaus			Yhteensä
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Yhteensä		96	231	327

Herkkyyks [TP/(TP+FN)] = 92,7 % (89/96)

95 %:n luottamusv. = 85,6–97,0

Spesifisyys [TN/(TN+FP)] = 39,4 % (91/231)

95 %:n luottamusv. = 33,1–46,0

Sairauden esiintyvyys LSIL-lausunnosta lopulliseen HSIL:iin = 21,4 %

Sairauden esiintyvyys HSIL-lausunnosta lopulliseen HSIL:iin = 46,6 %

Positiivinen kokonaisennustearvo = 38,9 % (89/229)

Negatiivinen kokonaisennustearvo = 92,8 % (91/98)

Vaikka *digene* HC2 HPV DNA -kokeen spesifisyys vaikutti olevan melko matala, neoplasian poissulkemisen ja negatiivisen HPV-tuloksen välillä ei odoteta olevan tarkkaa korrelaatiota. HPV DNA:ta voi ilmetä naisilla, joilla sairaus ei ole edennyt korkea-asteiseksi sairaudeksi. Kun näytteille, joiden HPV-tulos oli positiivinen ja joiden vastaava sairauden tila oli pienempi kuin lievä neoplasia, suoritettiin HPV:n polymeraasiketjureaktiokoe (tutkimuksessa käytetään ainoastaan analyysiä), lähes 75 % näytteistä oli positiivisia.

Taulukossa 9 esitetään teoreettiset korkean riskin HPV-koettimen positiiviset ja negatiiviset ennustearvot sille, että alkuperäinen LSIL- tai HSIL-löydös osoittautuu kolposkopiassa HSIL:ksi tai sitä vaikeammaksi sairaudeksi.

Taulukko 9
Teoreettinen positiivinen ja negatiivinen ennustearvo
Korkean riskin HPV-koetin
Alkuperäiset LSIL- tai HSIL-löydökset Papa-kokeessa

HSIL:n teoreettinen esiintyvyys	Alkuperäinen LSIL- tai HSIL-löydös Papa-näytteessä	
	Analyysi positiivinen	Analyysi negatiivinen
	Ennustearvo	Ennustearvo
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

KORKEAN RISKIN HPV-SEULONTAKOKEEN KÄYTTÖAIHETTA TUKEVAT TIEDOT

Kliininen suorituskyky potilashoidon apuvälineenä sairastumisriskin arvioinnissa niiden potilaiden seulonnoissa, joiden Papa-näytteen tulos on normaali

Alla esitettävät tulokset on saatu kahdeksasta riippumattomasta tutkimuksesta, jotka suoritettiin Yhdysvalloissa ja muualla sijaitsevien merkittävien lääketieteellisten, akateemisten ja julkisten tutkimuslaitosten johdolla. Tutkimuksissa käytettiin näissä maissa käyttöön hyväksytyjä Papa-menetelmiä. Kaikissa paitsi kahdessa tapauksessa Papa-tulosten tulkintaan käytettiin Bethesda luokitusta. Lisäksi korkea-asteinen kohdunkaulan sairaus diagnosoitiin kolposkopiassa otetun koepalan avulla jokaisessa tutkimuksessa. Näissä tutkimuksissa arvioitiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen kliinistä hyötyä verrattuna Papa-kokeeseen vanhemmilla naisilla (yleensä yli 30–35-vuotiailla). Kaikissa muissa paitsi yhdessä tutkimuksessa suoritettiin prospektiivinen HPV-koe *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella.

Tutkimukset olivat poikkileikkauksellisia yleisen populaation seulontatutkimuksia, joissa käytettiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -koetta, ellei muuta mainita seuraavassa. Näistä kahdeksasta seulontatutkimuksesta kaksi suoritettiin Yhdysvalloissa, kaksi Euroopassa, kaksi Latinalaisessa Amerikassa, yksi Afrikassa ja yksi Aasiassa.

Kuudessa poikkileikkaustutkimuksessa havaitusta *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskyvystä on tehty yhteenveto (katso alla taulukot 10 ja 11) 30-vuotiaille ja vanhemmille naisille, joilla on diagnosoitu histologisesti vahvistettu korkea-asteinen kohdunkaulan neoplasia, joka on määritetty kohdunkaulan korkea-asteiseksi neoplasiaksi (luokitus CIN3 tai pahempi).

Taulukko 10
***digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskykyarviot**
Herkkyys ja spesifisyys

Tutkimuspopulaatio	n		Herkkyys (%)			Spesifisyys (%)		
			Vain Papa-koe	Vain HPV	HPV + PAP	Vain Papa-koe	Vain HPV	HPV + PAP
Länsi-Eurooppa 1	7 592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7 453/7 565)	96,2 (275/7 565)	95,1 (7 193/7 565)
		95 %:n luottam usväli	32,0–71,3	81,0–99,9	87,2–100	98,2–98,8	95,7–96,6	94,6–95,6
Latinalainen Amerikka 1	6 115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5 962/6 038)	93,9 (5 669/6 038)	93,4 (5 637/6 038)
		95 %:n luottam usväli	46,68–69,6	87,2–98,6	90,9–99,7	98,4–99,0	93,3–94,5	92,7–94,0
Latin. Amerikka 2 [†]	6 176		77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5 745/6 108)	94,0 (5 742/6 108)	89,9 (5 490/6 108)
		95 %:n luottam usväli	66,2–87,1	79,9–95,8	85,6–98,4	93,4–94,6	93,4–94,6	89,1–90,6
Afrikka	2 925		84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2 436/2 818)	80,0 (2 253/2 818)	76,4 (2 152/2 818)
		95 %:n luottam usväli	75,8–90,5	82,4–94,8	85,8–96,7	85,1–87,7	78,4–81,4	74,8–77,9
Aasia	1 936		97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1 445/1 894)	83,0 (1 572/1 894)	68,0 (1 287/1 894)
		95 %:n luottam usväli	87,4–99,9	91,6–100,0	91,6–100,0	74,3–78,2	81,2–85,0	65,8–70,1
U.S.A. 1	1 040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1 013/1 038)	96,2 (999/1 038)	95,5 (991/1 038)
		95 %:n luottam usväli	1,26–98,7	15,8–100,0	15,8–100,0	96,5–98,4	94,9–97,3	94,0–96,7

[†] HC2-tiedot käytettävissä olevista tapauksista, muuten käytetty HCS-tietoja; yhdistetyt tiedot.

Taulukko 11
***digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen suorituskykyarviot**
Positiivinen ja negatiivinen ennustearvo

Tutkimuspopulaatio	n		Esiintyvyys (%)	Positiivinen ennustearvo (%)			Negatiivinen ennustearvo (%)		
				CIN 3	Vain Papa-koe	Vain HPV	HPV + PAP	Vain Papa-koe	Vain HPV
Länsi-Eurooppa 1	7 592		0,36 (27/7 592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	<u>6,77</u> (27/399)	99,83 (7 453/7 466)	99,99 (7 275/7 276)	<u>100,0</u> (7 193/7 193)
		95 %:n luottamusväli	0,23–0,52	6,21–17,9	5,45–11,8	<u>4,51–9,69</u>	99,70–99,91	99,92–100,0	<u>99,95–100,0</u>
Latinalainen Amerikka 1	6 115		1,26 (77/6 115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	<u>15,8</u> (75/476)	99,47 (5 962/5 994)	99,93 (5 669/5 673)	<u>99,96</u> (5 637/5 639)
		95 %:n luottamusväli	0,99–1,57	28,6–46,4	13,2–20,3	<u>12,6–19,4</u>	99,25–99,63	99,82–99,98	<u>99,87–100,0</u>
Latin. Amerikka 2 [†]	6 176		1,10 (68/6 176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	<u>9,4</u> (64/682)	99,74 (5 745/5 760)	99,88 (5 742/5 749)	<u>99,93</u> (5 490/5 494)
		95 %:n luottamusväli	0,86–1,39	9,69–16,3	11,1–18,0	<u>7,30–11,8</u>	99,57–99,85	99,75–99,95	<u>99,81–99,98</u>
Afrikka	2 925		3,66 (107/2 925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	<u>12,9</u> (99/765)	99,31 (2 436/2 453)	99,51 (2 253/2 264)	<u>99,63</u> (2 152/2 160)
		95 %:n luottamusväli	3,01–4,40	15,6–22,9	11,9–17,4	<u>10,6–15,5</u>	98,89–99,60	99,13–99,76	<u>99,27–99,84</u>
Aasia	1 936		2,17 (42/1 936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	<u>6,47</u> (42/649)	99,93 (1 445/1 446)	100,0 (1 572/1 572)	<u>100,0</u> (1 287/1 287)
		95 %:n luottamusväli	1,57–2,92	6,07–11,2	8,44–15,3	<u>4,70–8,65</u>	99,62–100,0	99,77–100,0	<u>99,71–100,0</u>
U.S.A. 1	1 040		0,19 (2/1 040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	<u>4,08</u> (2/49)	99,90 (1 013/1 014)	100,0 (999/999)	<u>100,0</u> (991/991)
		95 %:n luottamusväli	0,02–0,69	0,10–19,6	0,60–16,5	<u>0,50–14,0</u>	99,45–100,0	99,63–100,0	<u>99,63–100,0</u>

[†] HC2-tiedot käytettävissä olevista tapauksista, muuten käytetty HCS-tietoja; yhdistetyt tiedot.

Kaikissa tutkimuksissa *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen herkkyden on todettu yhtenäisesti ja usein hyvin merkittävästi olevan parempi kuin pelkän Papa-kokeen. Samoin HPV:n negatiivinen ennustearvo (NPV) ylitti pelkän Papa-kokeen vastaavan ennustearvon kaikissa tapauksissa ja oli lähes 100 %. Tämän NPV:n mukaan on erittäin epätodennäköistä, että sytologisesti normaaleilla naisilla, joilla ei ole HPV-infektiota, olisi korkean pahanlaatuisuusasteen kohdunkaulan sairaus tai syöpä.

Vaikka *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeen tarkkuus on pienempi kuin pelkän Papa-kokeen, todennäköisyysuhteen analyysi on osoittanut, että havaitun tarkkuuden väheneminen ei ole tarpeeksi merkittävä, jotta se vaikuttaisi kokeen käytön kliiniseen hyötyyn niiden naisten tunnistamiseksi, joilla ei ole kohdunkaulan sairauden kehittymisriskiä tai joilla tämä riski on pieni. Tästä huolimatta on tärkeää, että päätös potilaan lähettämisestä kolposkopiaan perustuu kaikkiin kliinisiin ja riskejä koskeviin tietoihin sekä lääkärin käytettävissä oleviin potilaan esietoihin. Tärkeitä muuttujia ovat mm. aiempi HPV-infektio ja/tai poikkeava Papa-koetulos, ikä ensimmäisessä yhdynnässä, sukupuolikumppanien lukumäärä sekä ajankohtaiset sukupuolitaudit.^{27,28}

Vaikka korkea-asteisen sairauden esiintyminen ei poikkea huomattavasti tutkimuksissa, joita käytettiin suorituskyvyn määrittämiseen, HPV-infektion esiintyminen tutkimuspopulaatioissa voi vaikuttaa suorituskykyyn ja vaihtelee yleensä potilaspopulaation keskuudessa. Lisäksi HPV-infektion esiintyvyyden on osoitettu vähenevän huomattavasti iän myötä.^{28, 30–37, 41} Positiiviset ennustearvot laskevat testattaessa tutkimuspopulaatioita, joissa esiintyminen on vähäistä tai henkilöillä on pieni infektoriski.

Suoritetuissa pitkittäisanalyseissä käytettiin tuloksia kahdesta tutkimuksesta, joista yksi suoritettiin Yhdysvalloissa National Cancer Institute (NCI) -instituutissa (Yhdysvaltojen syöpäinstituutti) Portlandissa, Oregonissa, ja toinen Ranskassa Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims -laboratoriossa (Reimsin yliopistollisen keskussairaalan Pol Bouin -laboratorio). Pitkittäisanalyysien tarkoituksena oli osoittaa, että Papa-negatiivisilla/HPV-negatiivisilla potilailla kohdunkaulan sairauden riski on pienempi kuin perinteisesti

määritetyillä matalan riskiluokan naisilla, joiden HPV-tilaa ei tiedetä, ja Papa-negatiivisilla/HPV-positiivisilla potilailla.

Näiden pitkittäisanalyysien tulokset on esitetty taulukoissa 12 ja 13 alla.

Taulukko 12
Tulosityhteenvedo: NCI- ja ranskalaistutkimus
Korkea-asteisen sairauden suhteellinen riski

Tutkimusryhmä	Ikä	Matalan riskin luokitus	n	CIN 3+ tapaukset	Määrä (sataa potilasvuotta kohti)	Suhteellinen riski (95 %:n luottamusv.)
NCI	30 ja yli	Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	12 054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet*	9 429	19	0,048	1,000
	Kaikki	Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	17 594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet*	13 392	44	0,082	1,000
Ranska	30 ja yli	Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	1 690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet*	2 026	4	0,099	1,000
	Kaikki	Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	2 180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Peräkkäiset normaalit Papa-kokeet*	2 650	7	0,136	1,000

*Kolme normaalia Papa-koeetta vuodessa noin kahden vuoden jaksolla

Taulukko 13
Tulosityhteenvedo: NCI- ja ranskalaistutkimus
HPV-lähtötilanteen tilalla ositetut sairastuvuusluvut

Tutkimusryhmä	Ikä	Lähtötilanteen tila	n	CIN 3+ tapaukset	Määrä (sataa potilasvuotta kohti)	Suhteellinen riski (95 %:n luottamusv.)
NCI	30 ja yli	Papa normaali, HPV-positiivinen	1 078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	12 054	28	0,043	1,00
	Kaikki	Papa normaali, HPV-positiivinen	2 561	63	0,096	10,64 (7,33–15,5)
		Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	17 594	48	0,056	1,00
Ranska	30 ja yli	Papa normaali, HPV-positiivinen	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	1696	3	0,084	1,00
	Kaikki	Papa normaali, HPV-positiivinen	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Papa-koe normaali, HPV-negatiivinen	2180	3	0,066	1,00

HPV-kokeen kliinisestä hyödyllisyydestä on osoituksena myös se, että HPV-positiivisilla naisilla on suurempi kohdunkaulan sairauden riski kuin HPV-negatiivisilla naisilla.

ANALYYTTINEN HERKKYYS

Ei-kliininen, kloonattua HPV-plasmidi-DNA:ta sisältävä paneeli testattiin sen määrittämiseksi, voidaanko kaikki 18 HPV-tyyppiä osoittaa *digene* HC2 HPV DNA -kokeella sekä voidaanko kokeen analyyttinen herkkyys määrittää kullekin HPV-tyypille. Kaikkien 18 HPV-tyypin (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68) kukin HPV-kohdepitoisuus (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml ja 0,2 pg/ml) ajettiin kolmena rinnakkaiskokeena asianmukaisella matalan riskin HPV-koettimella tai korkean riskin HPV-koettimella. Signaalin keskiarvo (suhteellisina valoyksikköinä, RLU) laskettiin kunkin HPV-tyypin kaikille pitoisuuksille, ja sitä verrattiin korkean riskin positiiviseen kalibraattoriin analyysin vastaavalla puolella.

Taulukossa 14 esitetään kunkin HPV-tyypin havaitsemisraja STM:ssa. Havaitsemisrajat vaihtelivat 0,62 pg/ml:n ja 1,39 pg/ml:n välillä testattavan HPV-tyypin mukaan. Arvioitu määrä, jolla kaikki HPV-tyypit voitiin havaita, oli 1,09 pg HPV DNA -kohdetta per 1 ml STM-näytettä. Kaikkien 18 HPV DNA -tyypin havaitsemisrajan keskiarvo oli 1,09 pg/ml, kun keskihajonta oli 0,05.

Taulukko 14
***digene* HC2 HPV DNA -kokeen havaitsemisrajojen yhteenveto**
kunkin STM:ssa olevan HPV DNA -tyypin herkkyyden osalta

HPV DNA -tyyppi	Havaittava HPV:n DNA-pitoisuus (pg/ml)	Keskihajonta	95 %:n luottamusvälin alue
6	1,33	0,03	1,22–1,46
11	1,13	0,05	1,00–1,29
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
42	1,20	0,05	1,02–1,44
43	0,85	0,03	0,86–1,07
44	1,17	0,04	1,02–1,36
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
Keskiarvo (kaikki tyypit)	1,09	0,05	0,97–1,27

YHDISTELMÄKOETINSEOSTA (CPC) KÄYTTÄVÄN MENETELMÄN SUORITUSKYKY

Edellä kuvattu ei-kliininen HPV-plasmidi-DNA:ta sisältävä paneeli testattiin sen määrittämiseksi, voidaanko kaikkien kahdeksantoista *digene* HC2 HPV DNA -kokeen HPV-tyypin analyyttinen herkkyys määrittää noudattamalla tässä selosteessa kuvattua yhdistelmäkoetinseosta (CPC) käytettävää menetelmää. CPC-protokollan analyyttinen herkkyys vaihteli 0,58–1,39 pg/ml ja taso, jolla kaikki HPV-tyypit voitiin havaita, oli arviolta 0,95 pg/ml HPV DNA -kohdetta per 1ml näytettä. Havaitsemisrajan keskiarvo kaikilla 18 HPV-tyypeillä oli 0,95 pg/ml, kun keskihajonta oli 0,07. Tämä herkkyys vastaa *digene* HC2 HPV DNA -kokeen kahden koettimen menetelmässä havaittua analyyttistä herkkyyttä.

STM-NÄYTTEIDEN JA PRESERVICYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VÄLINEN EKVIVALENSSI

STM-näytteiden ja PreservCyt-liuosnäytteiden välinen ekvivalenssi tutkittiin HPV 18 -DNA:n yhtäläisen talteensaannin suhteen noin 10^6 positiivisesta HeLa-solusta, jotka sisälsivät integroitua HPV 18 -genomeja lisättyinä STM:ään ja negatiiviseen solupopulaatioon PreservCyt-liuokseen. Kukin näytetyyppi käsiteltiin tässä käyttöohjeessa kuvattujen vastaavien käsittely- ja denaturointiohjeiden mukaisesti ja testattiin *digene* HC2 HPV DNA -kokeella käyttämällä korkean riskin HPV-koetinta. Tulokset osoittivat, että HPV 18 -DNA:n talteensaanti ihmisen karsinomasoluista oli vastaavaa tasoa näissä kahdessa aineessa ja että PreservCyt-liuoksen valmistusmenetelmä ei vaikuta *digene* HC2 HPV DNA -kokeen analyttiseen herkkyyteen.

SUREPATH-NÄYTTEEN TULOSTEN KORRELAATIO STM-NÄYTTEIDEN KANSSA KLIINISESSÄ POPULAATIOSSA

Kaksivaiheinen kliininen arviointi suoritettiin kuudessa näytteenkeräyskeskuksessa ja kolmessa testauspaikassa Yhdysvalloissa. STD-klinikoiden, gynekologisten vastaanottojen, kolposkopiaklinikoiden, sairaaloiden tai perheneuvontakeskusten potilaat ilmoittautuivat ennalta määritettyjen tutkimusten hyväksymis- tai poisjättämiskriteerien perusteella. Esitutkimusvaiheeseen, jonka tarkoituksena oli määrittää asianmukainen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -analyysin raja-arvo SurePath-näytteille, osallistui noin 400 potilasta. Kliininen varmennusvaihe, johon osallistui noin 1 500 potilasta ja jonka tarkoituksena oli valitun analyysin raja-arvon varmennus, aloitettiin sen jälkeen, kun toteutettavuuden välianalyysi osoitti, että analyysin raja-arvo 1,0 RLU/CO SurePath-näytteitä käytettäessä tuotti hyväksyttävän yhtäpitävyyden STM-näytteiden tulosten kanssa.

Kummassakin arviointivaiheessa SurePath- ja STM-kohdunkaulanäyteparit otettiin tutkimukseen vapaaehtoisesti osallistuvilta naishenkilöiltä. SurePath-näytteet lähetettiin sitten sytologialaboratorioon liuskojen valmistelua varten. Sytologisen valmistelun jälkeen jäljelle jäänyt SurePath-näyte ja vastaava STM-näyte testattiin *digene* HC2 High-Risk HPV DNA -kokeella käyttäen analyysin raja-arvona 1,0 RLU/CO.

Taulukossa 15 esitetään SurePath-tulosten vastaavuus STM-näytteiden kanssa. Nämä arviot tehtiin lopullisista tuloksista, jotka hyväksyttiin data-analyysia varten koko tutkimukseen osallistuneesta väestöstä.

Taulukko 15
SurePath-tuloksen yhtäpitävyys STM:n kanssa
(kaikenikäiset potilaat ja kaikki sytologiset luokitukset)
(n = 1 490)

Positiivinen vastaavuus-% 95 %:n luottamusväli (n/N)		Negatiivinen vastaavuus-% 95 %:n luottamusväli (n/N)	
Kaikki positiivisia	Korkeiden positiivisten alaryhmä (RLU/CO \geq 2,5)	Kaikki negatiivisia	Matalien negatiivisten alaryhmä RLU/CO (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1 011/1 061)	96,0 94,6, 97,1 (1 002/1 044)

Nämä tulokset ennakoivat, että SurePath-näytteiden testauksen suhteellinen analyysiherkkyys ja -spesifisyys korreloivat voimakkaasti STM-näytetyypillä saatujen tulosten kanssa. Tästä osoituksena ovat 95 %:n luottamusvälin alaraja sekä positiivisen että negatiivisen yhtäpitävyyden osalta.

TOISTETTAVUUS

Toistettavuudesta suoritettiin monikeskustutkimus tarkoituksena määrittää *digene* HC2 HPV DNA -kokeen toistettavuus päivien välillä ja tutkimuspaikkojen välillä sekä yleinen toistettavuus. Kokeessa käytettiin HPV-DNA -kohteiden paneelia sekä HPV-positiivisia ja HPV-negatiivisia kliinisiä näytteitä.

Kolme ulkoista laboratoriota suoritti kokeen samalla *digene* HC2 HPV DNA Test -tarvikesarjan erällä kolmena eri päivänä käyttäen identtistä toistettavuuspaneelia. Toistettavuuspaneeli sisälsi seuraavat näytteet: 12 denaturoitua kliinistä STM-näytepoolia; kolme denaturoimatonta kliinistä PreservCyt-liuoksen näytepoolia; negatiivinen kalibraattori sekä matalan riskin ja korkean riskin positiiviset kalibraattorit 0,5 pg/ml:n, 1 pg/ml:n, 2,5 pg/ml:n, 5 pg/ml:n ja 10 pg/ml:n pitoisuuksina. Kaikki paneelin jäsenet testattiin kolmena rinnakkaiskokeena kunakin päivänä sekä korkean riskin HPV-koettimella että CPC-menetelmällä. Tulokset esitetään taulukossa 16.

Taulukko 16
Kokonaistilastojen yhteenveto
***digene* HC2 HPV DNA -kokeen monikeskustoistettavuuden osalta**

Tilastollinen suure	KORKEAN RISKIN HPV-KOETIN	Yhdistelmäkoetinseos (CPC)	Yhdistetyt tulokset korkean riskin HPV-koettimelle ja CPC:lle ^a
Ennakoitujen positiivisten ja havaitun positiivisen tuloksen antaneiden määrä	100 % (99,0–100,0)	99,8 % (98,92–100,0)	99,9 % (99,38–100,0)
Ennakoitujen positiivisten ja havaitun negatiivisen tuloksen antaneiden määrä	99,0 % (97,49–99,73)	98,9 % (96,79–99,77)	99,0 % (97,88–99,58)
Yhtäpitävyys	99,5 % (98,70–99,86)	99,5 % (98,70–99,86)	99,5 % (99,0–99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^aSuluissa olevat luvut tarkoittavat 95 %:n luottamusväliä. Kokonaisainestossa on yhdistetty kaikkien tutkimuspaikkojen kaikki kokeet.

Tämä osoittaa, että *digene* HC2 HPV DNA -kokeen toistettavuus kliinisillä, STM:ään kerätyillä näytteillä on erittäin hyvä.

RISTIREAKTIIVISUUSPANEELI

Joukko naisen anogeenitaalialueella yleisesti esiintyviä bakteereita, viruksia ja plasmideja sekä joukko iholla eläviä HPV-tyyppejä, joista oli käytettävissä kloonit, tutkittiin niiden ja *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa käytettyjen HPV-koettimien ristireagoivuuden määrittämiseksi. Mikro-organismien pitoisuudet analyysissä olivat 1×10^5 ja 1×10^7 organismia yhtä millilitraa kohti. Virusten ja plasmidien puhdistetun DNA:n analyysipitoisuus oli 4 ng/ml.

Alla on luettelo testatuista bakteereista. Kaikki bakteerit antoivat negatiivisen tuloksen *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 tai 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan strain)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

* Analyysissä analysoitiin sekä plasmidien kasvattamiseen käytetty *E. coli* -kanta (HB101) että *E. coli* klininen isolaatti.

Seuraavassa on luettelo testatusta virus- tai plasmidi-DNA:sta tai ihmisestä peräisin olevasta seerumista:

Adenovirus 2	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 1
Sytomegalovirus 2	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 2
Epstein-Barr-virus	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 3
Hepatiitti B -viruksen pinta-antigeenille positiivinen seerumi	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 4
Herpes Simplex I	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 5
Herpes Simplex II	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 8
Immuunikatovirus (HIV, RT DNA)	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 13
Apinavirus, tyyppi 40 (SV40)	Ihmisen papilloomavirus (HPV), tyyppi 30
	pBR322

Ainoat virukset tai plasmidit, joilla havaittiin ristireaktiivisuutta *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa, olivat HPV-tyyppi 13 ja plasmidi pBR322. HPV 13 -DNA reagoi vain matalan riskin HPV-koettimeen. HPV 13:a havaitaan yleisesti tiettyjen etnisten ryhmien huulileesioissa, mutta sitä ei ole havaittu anogeenitaalisessa kanavassa.²⁹ Tästä syystä HPV 13:n ja *digene* HC2 HPV DNA -kokeen matalan riskin HPV-koettimen välillä havaitun ristireaktiivisuuden ei odoteta aiheuttavan kliinisesti ristiriitaista tulosta anogeenitaalisten näytteiden osalta. pBR322:n ja *digene* HC2 HPV DNA -kokeen matalan riskin ja korkean riskien HPV-koettimien välillä ei oleteta esiintyvän ristireaktiivisuutta, koska on vaikeaa poistaa kaikki vektori pBR322 DNA HPV-inserttiä eristettäessä. pBR322:n homologisten sekvenssien olemassaolo on todettu ihmisen sukupuolielimistä otetuissa näytteissä, ja väärä positiivisia tuloksia voi ilmetä tilanteissa, joissa mukana on suuria määriä bakteeriperäistä plasmidiainesta.²⁹⁸ klinistä näytettä, joiden tulos *digene* HC2 HPV DNA -kokeen matalan ja korkean riskin HPV-koettimilla oli positiivinen, osoittivat, etteivät mitkään

positiiviset tulokset johtuneet pBR322:sta, kun se testattiin pBR322-koettimella. Tästä syystä sen mahdollisuus, että *digene* HC2 HPV DNA -kokeen väärä positiivinen tulos aiheutuisi kliinisissä näytteissä olevista homologisista pBR322-sekvensseistä, vaikuttaa pieneltä.

RISTIHYBRIDISOITUMINEN

Kaikki 18 HPV-tyyppiä testattiin sekä matalan riskin että korkean riskin HPV-koettimilla, joiden HPV DNA -pitoisuudet olivat 4 ng/ml. Kaikkien HPV-kohteiden odotettiin olevan positiiviset asianmukaiselle koetinryhmälle, kun taas näytteistä ei yhdenkään odotettu olevan positiivinen vastakkaiselle koetinryhmälle. Kokeessa ilmeni, että HPV-tyyppien 6 ja 42 (matalan riskin HPV-tyypit) ja korkean riskin koetinryhmän (korkean riskin HPV-koetin) välillä tapahtuu pieni määrä ristihybridisointia. Näytteet, joissa on runsaasti (4 ng/ml tai enemmän) HPV 6- tai HPV 42 DNA:ta, saattavat olla positiivisia kummallekin koetinryhmälle. Tämän kliininen merkitsevyys on se, että potilaat, joiden HPV 6- tai HPV 42 -DNA-pitoisuus on 4 ng/ml tai suurempi, voidaan ohjata kolposkopiaan.

Lisäksi korkean riskin HPV-koettimen on havaittu ristireagoivan HPV-tyyppien 40, 53 ja 66 kanssa. Nämä tyypit ovat harvinaisia, eikä näyttöä ole tarpeeksi sen osoittamiseksi, että näiden tyyppien tulehduksella ja korkea-asteisen sairauden kehittymisen välillä olisi täsmällinen korrelaatio³⁸. Potilaita, joilla ilmenee runsaasti kyseisten HPV-tyyppien DNA:ta, saatetaan lähettää kolposkopiaan väärin perustein. Myös kirjallisuudessa on raportoitu, että monimutkaiset, tässä kokeessa käytetyn kaltaiset koettimet saattavat antaa vääriä positiivisia tuloksia siitä syystä, että niillä tapahtuu ristihybridisointia HPV-tyyppien 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 tai MM9 kanssa.³⁹ Vaikka useat näistä HPV-tyypeistä ovat harvinaisia tai uudentyyppisiä eikä niitä usein havaita korkea-asteisessa sairaudessa, voidaan kolposkopiaan ohjata väärin perustein potilaita, joiden näytteissä on runsaasti näitä HPV-DNA-tyyppejä.

VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS STM-NÄYTTEISIIN

digene HC2 HPV DNA -kokeessa arvioitiin veren ja muiden mahdollisesti häiritsevien, määriteltujen tai määrittelemättömien aineiden vaikutusta. Kokoverta, emätinhuuhteluainetta, voidemaista -sienilääkettä ja ehkäisygeeliä (aineita, joita voidaan yleisesti havaita kohdunkaulanäytteissä) lisättiin STM-negatiivisiin ja -positiivisiin näytteisiin (kliininen näytepooli ja ei-kliiniset näytteet) sellaisina pitoisuuksina kuin niitä voi ilmetä kohdunkaulanäytteissä. Yhtään väärää positiivista tulosta ei havaittu näiden neljän aineen kohdalla millään pitoisuudella. Mutta väärä negatiivinen tulos saatettiin raportoida kliinisissä näytteissä, joissa HPV DNA:n määrät olivat lähellä analyysin positiivista raja-arvoa (1 pg/ml), jos näytteissä esiintyi runsaasti voidemaista sienilääkettä tai ehkäisygeeliä. On kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että kliininen näyte koostuisi lähes kokonaan jostain näistä aineista, sillä kohdunkaula puhdistetaan rutiinomaisesti ennen Papa-näytteen ottamista sekä HPV-testausta varten.

VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS PRESERVCYT-LIUOKSESSA OLEVIIN NÄYTTEISIIN

digene HC2 HPV DNA -kokeessa arvioitiin kliinisissä PreservCyt-liuosnäytteissä mahdollisesti olevan veren ja muiden mahdollisesti häiritsevien, määriteltujen tai määrittelemättömien aineiden vaikutusta. Kokoverta, emätinhuuhteluainetta, voidemaista -sienilääkettä ja ehkäisygeeliä (aineita, joita voidaan yleisesti havaita kohdunkaulanäytteissä) lisättiin PreservCyt-liuoksen negatiivisiin ja positiivisiin kliinisiin näytepooleihin sellaisina pitoisuuksina kuin niitä saattaa ilmetä kohdunkaulanäytteissä. Yhtään väärää positiivista tai väärää negatiivista tulosta ei havaittu näiden neljän aineen kohdalla millään pitoisuudella. Lisäksi joidenkin kliinisten näytteiden sisältämät niille ominaiset aineet eivät estä HPV-DNA:n tunnistusta *digene* HC2 HPV DNA -kokeessa.

***digene* HC2 HPV DNA -KOKOEN TOISTETTAVUUS KLIINISILLÄ, STM:ÄÄN KERÄTYILLÄ NÄYTTEILLÄ**

digene HC2 HPV DNA -kokeen toistettavuus kliinisillä, STM:ään kerätyillä näytteillä määritettiin tutkimuksessa, jossa käytettiin 20 kliinistä poolia (10 positiivista ja 10 negatiivista), jotka oli valmistettu yhdistämällä aiemmin denaturoidut ja testatut kohdunkaulan STM:ään kerätyt harjanäytteet. Näytteet testattiin 4 replikaateissa jokaisena 5 päivänä yhteensä 20 replikaatille näytettä kohti. Kokeessa käytettiin yhdistelmäkoetinseosta käyttävää menetelmää. Keskiarvot, keskihajonta ja 95 %:n luottamusväli keskiarvojen ympärillä laskettiin jokaiselle näytteelle vuorokauden sisällä ja viiden vuorokauden ajalta, ja ne esitetään taulukossa 17.

Taulukko 17
RLU/CO-keskiarvo + luottamusvälit ja positiivisten prosenttimäärä
(Alenevassa järjestyksessä RLU/CO-keskiarvon mukaan)

Numero	Näyte-tunnus	Keskiarvo RLU/CO	Luottamusväli	Positiivisia (%)
1	10	3,18	3,02–3,35	100 (20/20)
2	20	1,43	1,36–1,50	100 (20/20)
3	11	1,25	1,20–1,28	100 (20/20)
4	12	1,21	1,15–1,27	100 (20/20)
5	15	1,20	1,14–1,25	100 (20/20)
6	13	1,07	1,01–1,11	80 (16/20)
7	16	1,06	1,01–1,09	75 (15/20)
8	17	1,04	1,00–1,06	80 (16/20)
9	14	0,98	0,92–1,02	45 (9/20)
10	18	0,92	0,87–0,96	20 (4/20)
11	19	0,72	0,68–0,75	0 (0/20)
12	7	0,40	0,33–0,46	0 (0/20)
13	4	0,38	0,35–0,39	0 (0/20)
14	9	0,37	0,32–0,41	0 (0/20)
15	1	0,35	0,32–0,36	0 (0/20)
16	2	0,35	0,31–0,37	0 (0/20)
17	8	0,32	0,29–0,34	0 (0/20)
18	3	0,30	0,27–0,31	0 (0/20)
19	6	0,27	0,24–0,30	0 (0/20)
20	5	0,26	0,23–0,28	0 (0/20)

Niissä viidessä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % korkeampi kuin raja-arvo (numerot 1-5), sata replikaattia sadasta (100,0 %) oli positiivisia. Niissä viidessä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % korkeampi tai alempi kuin raja-arvo (numerot 6-10), 60 replikaattia sadasta (60 %) oli positiivisia ja 40 replikaattia sadasta (40 %) negatiivisia. Niissä 10 näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % pienempi kuin raja-arvo, 200 replikaattia 200:sta (100 %) oli negatiivisia.

Näin ollen näytteet, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, olivat koko ajan positiivisia, kun taas näytteet, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % pienempi kuin raja-arvo, olivat koko ajan negatiivisia. Tämä osoittaa, että yhdenmukaisia tuloksia voidaan odottaa näytteiltä, jotka eroavat vähintään 20 % raja-arvosta. Raja-arvon läheiset näytteet tuottivat lähestulkoon yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että STM-näytteillä saatiin toistettavia tuloksia käytettäessä *digene* HC2 HPV DNA -koetta.

***digene* HC2 HPV DNA -Kokeen toistettavuus kliinisillä, PreservCyt-liuokseen kerätyillä näytteillä**

digene HC2 HPV DNA -kokeen toistettavuus kliinisillä, PreservCyt-liuokseen kerätyillä näytteillä määritettiin tutkimuksessa, jossa käytettiin 24 nollanäytettä, joiden pitoisuudet kattoivat HPV-DNA:n pitoisuusalueen. Näytteet koostuivat PreservCyt-liuoksesta ja valkosoluista, joissa oli ja ei ollut HPV 16 - plasmidia sisältäviä bakteereja.

Näytteistä tehtiin neljä replikaattianalyysia kunakin viitenä päivänä, jolloin saatiin yhteensä 20 replikaattia per näyte. Jokaisena viitenä tutkimuspäivänä jokaisesta näytteestä otettiin 8 ml:n näyte, joka käsiteltiin ja testattiin *digene* HC2 Sample Conversion Kit -käyttöohjeen mukaisesti käyttämällä vain korkean riskin HPV-koetinta. Kullekin näytteelle laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja 95 %:n luottamusvälit (CI) kunakin päivänä kaikkien viiden päivän aikana kaikilla replikaateilla. Kunkin näytteen RLU/CO-keskiarvo, keskiarvon luottamusväli ja positiivisten replikaattien prosentuaalinen määrä esitetään RLU/CO-keskiarvon mukaan alenevassa järjestyksessä taulukossa 18.

Taulukko 18
RLU/CO-keskiarvo + luottamusväli ja positiivisten prosenttimäärä
(Alenevassa järjestyksessä RLU/CO-keskiarvon mukaan)

Numero	Näyte- nro	Keskimäär. RLU/CO	Luottamusväli	Positiivisia (%)
1	21	3,51	3,19–3,83	100 (20/20)
2	12	1,58	1,48–1,69	100 (20/20)
3	13	1,42	1,32–1,52	100 (20/20)
4	17	1,38	1,23–1,53	100 (20/20)
5	18	1,36	1,23–1,48	90 (18/20)
6	15	1,32	1,16–1,49	95 (19/20)
7	23	1,17	1,06–1,27	85 (17/20)
8	16	1,14	1,07–1,20	75 (15/20)
9	20	1,10	0,96–1,21	75 (15/20)
10	19	1,06	0,95–1,17	85 (17/20)
11	22	1,05	0,99–1,10	45 (9/19)
12	11	1,04	0,96–1,11	70 (14/20)
13	14	0,94	0,86–1,01	65 (13/20)
14	24	0,77	0,73–0,81	25 (5/20)
15	3	0,28	0,25–0,30	0 (0/20)
16	1	0,27	0,24–0,30	0 (0/20)
17	7	0,27	0,25–0,30	0 (0/20)
18	2	0,27	0,25–0,28	0 (0/20)
19	5	0,26	0,24–0,28	0 (0/20)
20	4	0,24	0,22–0,25	0 (0/20)
21	9	0,23	0,21–0,25	0 (0/20)
22	8	0,22	0,18–0,27	0 (0/20)
23	10	0,22	0,20–0,25	0 (0/20)
24	6	0,19	0,17–0,21	0 (0/20)

Niissä kuudessa näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo (numerot 1–6), 114 replikaattia 120:stä (95,0 %) oli positiivisia. Niissä seitsemässä näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli enintään 20 % suurempi tai pienempi kuin raja-arvo (numerot 7–13), 88 replikaattia 139:stä (63,3 %) oli positiivisia ja 51 replikaattia 139:stä (36,7 %) negatiivisia. Niissä neljässä näytteessä, jotka olivat enintään 10 % raja-arvon ylä- tai alapuolella, 41 replikaattia 79:stä (51,9 %) oli positiivisia ja 38 replikaattia 79:stä (48,1 %) negatiivisia. Niissä 11 näytteessä, joiden RLU/CO-keskiarvo oli yli 20 % pienempi kuin raja-arvo, 220 replikaatista 220 (100 %) oli negatiivisia.

Näin ollen näytteet, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % suurempi kuin raja-arvo, olivat positiivisia yli 95 % ajasta, kun taas näytteet, joiden RLU/CO-keskiarvo oli vähintään 20 % pienempi kuin raja-arvo, olivat koko ajan negatiivisia. Tämä osoittaa, että yhdenmukaisia tuloksia voidaan odottaa näytteiltä, jotka eroavat vähintään 20 % raja-arvosta. Raja-arvon läheiset näytteet tuottivat lähestulkoon yhtä suuren määrän positiivisia ja negatiivisia tuloksia. Nämä tiedot osoittavat, että PreservCyt-liuosnäytteillä saatiin toistettavia tuloksia käytettäessä *digene* HC2 HPV DNA -koetta.

***digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA -KOKOEN TOISTETTAVUUS SUREPATH-SÄILÖNÄNESTEESEEN KERÄTYILLÄ NÄYTTEILLÄ**

Toistettavuusarvioinnit tehtiin, jotta voitaisiin määrittää kolmen eri laboratorion kyky saada samanlaisia diagnostisia tuloksia eri tavoin ja eri ajoilla samanlaisista näytteistä, joiden positiivinen/negatiivinen HPV-tila tunnettiin, kun käytettiin arvioinnin raja-arvoa 1,0 RLU/CO. Toistettavuuspaneelin näytteet sisälsivät viisi HPV-positiivista näytettä, kaksi näytettä, joiden HPV DNA -pitoisuus oli lähellä arvion raja-arvoa, ja viisi negatiivista HPV-näytettä.

Paneelin jäsenet valmisteltiin yhdistämällä ainutlaatuiset SurePath-potilasnäytteet tunnetusti negatiivisen ja positiivisen HPV-tilan kanssa, jotta saatiin halutut RLU/CO-kohdearvot. Kukin paneelin jäsen testattiin kahdesti, kaksi kertaa päivässä viiden päivän ajan kaikissa kolmessa arviointiin osallistuvassa laboratoriossa.

Taulukko 19
SurePath-näytteiden toistettavuustutkimus
Kvalitatiiviset tulokset paneelijäsenittäin

Paneelin jäsen	RLU/CO-keskiarvo	Odotettu tulos	HPV-positiivinen n (%)	HPV-negatiivinen n (%)
1	0,20	negatiivinen	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negatiivinen	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negatiivinen	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negatiivinen	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negatiivinen	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negatiivinen	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positiivinen	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positiivinen	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positiivinen	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positiivinen	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positiivinen	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positiivinen	60 (100)	0 (0)

SUREPATH-TULOKSEN TOISTETTAVUUS KÄYTETTÄESSÄ RAPID CAPTURE SYSTEM - JÄRJESTELMÄÄ ANALYYSIN KÄSITTELYSSÄ

SurePath-näytteiden tulosten toistettavuutta verrattiin manuaalisen käsittelyn tuloksiin käytettäessä Rapid Capture System -järjestelmää analyysin käsittelyyn. Saman näytteen eri osanäytteillä suoritettiin kaksi vertaustutkimusta.

Taulukko 20
Näytekohtainen SurePath-tulosten vastaavuus RCS:n kanssa
(RCS vs. manuaalinen arviointi)

Positiivinen vastaavuus-% 95 %:n luottamusväli (n/N)		Negatiivinen vastaavuus-% 95 %:n luottamusväli (n/N)	
Kaikki positiivisia	Korkeiden positiivisten alaryhmä (RLU/CO ≥ 2,5)	Kaikki negatiivisia	Matalien negatiivisten alaryhmä (RLU/CO < 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1 057/1 079 96,9, 98,7	98,7 1 050/1 064 97,8, 99,28

MENETELMÄN RAJOITUKSET

In vitro -diagnostiseen käyttöön

Katso *Rapid Capture System* -järjestelmän käyttöoppaasta menetelmän lisärajoitukset, jotka koskevat erityisesti järjestelmän käyttöä suurten näytemäärien tehokkaassa testauksessa.

- *digene* HC2 HPV DNA -koetta, joka on tarkoitettu ihmisen papilloomavirustyyppien 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68 testaamiseen, ei suositella käytettävän epäillyn seksuaalisen hyväksikäytön arvioinnissa.
- HPV-infektion esiintyminen populaatioissa voi vaikuttaa suorituskykyyn. Positiiviset ennustearvot alenevat kun testataan populaatioita, joissa esiintyvyys on vähäinen, tai yksilöitä, joilla ei ole infektoriskiä.
- Negatiivinen tulos ei sulje pois HPV-infektiota, sillä hyvin vähäinen infektio tai näytteenotossa tapahtunut virhe voi aiheuttaa väärän negatiivisen tuloksen.
- *digene* HC2 HPV DNA -koe erottelee HPV-tyypit kahteen ryhmään: HPV 6/11/42/43/44 ja 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Koe ei erottele näiden ryhmien sisällä olevia eri virustyyppisiä.
- *digene* HC2 HPV DNA -koetta voi käyttää vain sellaisille kohdunkaulan näytteille, jotka on kerätty *digene* HC2 DNA Collection -laitteella, tai STM:ään kerätyille koepaloille tai kohdunkaulan näytteille, jotka on kerätty käyttämällä harjatyyppin keruulaitetta tai yhdessä harjaa ja lastaa ja asetettu PreservCyt-liuokseen, tai kohdunkaulan näytteille, jotka on kerätty SurePath-säilytänesteeseen. Koepalanäytteet voidaan analysoida vain, jos ne asetetaan välittömästi STM:ään ja niitä säilytetään -20°C :ssa analyysiin saakka.
- *digene* HC2 DNA -näytteenottolaitetta ei saa käyttää näytteiden keräämiseen raskaana olevilta naisilta.
- HPV-infektio ei ole varma korkea-asteisen kohdunkaulan sairauden ilmaisin, eikä se kaikissa tapauksissa viittaa siihen, että korkea-asteinen sairaus tai syöpä kehittyi.
- HPV-tyyppien 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 56, MM4, MM7, MM8 ja MM9 sekä korkean riskin HPV-koettimen välillä tapahtuu vähäistä ristihybridisointia. Kolposkopiaan saatetaan virheellisin perustein lähettää potilaita, joilla ilmenee runsaasti näitä HPV-tyyppejä³⁸.
- *digene* HC2 HPV DNA -koe suunniteltiin havaitsemaan matalan ja korkean riskin HPV-tyypit, mukaan lukien 39, 58, 59 ja 68. QIAGENin suorittamat analyttiset tutkimukset, joissa käytettiin kloonattua HPV:n plasmidi-DNA:ta, osoittivat, että analyysi havaitsee kyseiset tyypit pitoisuuksilla 0,62–1,39 pg/ml. Tämä tulos vastaa täysin muiden *digene* HC2 HPV DNA -kokeella havaittavien HPV-tyyppien tunnistusominaisuuksia. QIAGEN on kyennyt varmentamaan näiden HPV-tyyppien tunnistuksen vain vähäisessä määrässä kliinisiä näytteitä. Koska näitä tyyppisiä on vähän kokonaisväestössä (kuten Bosch et. al.³⁶ ovat osoittaneet), *digene* HC2 HPV DNA -kokeen suorituskykyominaisuuksia HPV-tyyppien 39, 58, 59 ja 68 tunnistamisen suhteen ei ole vahvistettu tilastollisesti.
- Jos HPV-testaukseen tarkoitettua näytteen ottamispaikassa on runsaasti voidemaista sienilääkettä, ehkäisygeeliä tai emätinhuuhteluainetta, väärän negatiivisen tuloksen mahdollisuus on olemassa, mikäli näytteiden HPV DNA -pitoisuuksien RLU/CO-arvot lähenevät analyysin raja-arvoa.
- Ristireagointi *digene* HC2 HPV DNA -kokeen koettimen ja plasmidi pBR322:n välillä on mahdollista. pBR322:n homologisten sekvenssien olemassaolo on todettu ihmisen sukupuolielimistä otetuissa näytteissä, ja vääriä positiivisia tuloksia voi ilmetä tilanteissa, joissa mukana on suuria määriä bakteeriperäistä plasmidiainesta.

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. Julkaisussa: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. Julkaisussa: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829-2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374-384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. *Julkaisussa: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.*
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 20. *lokakuuta 1984: s. 899-901.*
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chliff, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.

37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79-88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252-255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.; and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, helmikuu 2000, s. 651-655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333-341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
43. Schulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.

VIANETSINTÄOPAS

Havainto	Mahdolliset syyt	Toimenpiteet
Denaturaation aikana on havaittu väärä värimuutos tai ei lainkaan värimuutosta.	<p>Denaturointireagenssi on valmistettu väärin, tai</p> <p>denaturointireagenssia ei ole lisätty</p> <p>Näytteessä on verta tai muita aineita, jotka estävät värimuutoksen havaitsemisen.</p> <p>Näytteen pH saattaa olla epätavallisen hapan.</p>	<p>Tarkista, että denaturointireagenssi sisältää ilmaisinväriä ja on väriltään tumman violetti.</p> <p>Varmista denaturointireagenssin lisäys näytteeseen mittaamalla näytteen tilavuus (pitäisi olla 1,5 ml). Jos määrän perusteella ilmenee, että denaturointireagenssia ei ole lisätty, lisäys suoritetaan, jonka jälkeen sekoitetaan, ja analyysi voidaan suorittaa, mikäli oikea värimuutos ilmenee.</p> <p>Kuvattua tarkkaa värimuutosta ei odoteta tapahtuvan tämäntyyppisissä näytteissä, eikä tämä välttämättä vaikuta heikentävästi <i>digene</i> HC2 HPV DNA -kokeen tuloksiin.</p> <p>Mikäli muuta syytä ei löydy, näyte voi olla epätavallisen hapan, jolloin odotettua värimuutosta ei tapahdu. Koska näytteen väärä pH heikentää koetuloksia, ota uusi näyte ennen kohdunkaulan etikkahappokäsittelyä.</p>
Laatukontrollit antavat väärä tuloksia.	<p>Koetta varten on valittu väärä ohjelmistoprotokolla (esim. CPC-protokolla kaksoismenetelmään)</p> <p>QC1-LR ja QC2-HR sijoitettu väärässä järjestyksessä</p> <p>LRC:n ja QC1-LR:n ja/tai HRC:n ja QC1-HR:n käänteinen sijainti</p>	<p>Jos kokeessa on käytetty väärää ohjelmistoprotokollaa, lue mikrolevy uudestaan 30 minuutin kuluessa tunnistusreagenssi 2:n lisäämisestä ja oikeaa protokollaa käyttäen.</p> <p>Testaa näytteet uudelleen.</p> <p>Testaa näytteet uudelleen.</p>
Hybridisoitaessa havaittu väärä värimuutos.	<p>Koetinseoksen riittämätön sekoittuminen denaturoituihin kalibraattoreihin, kontroleihin ja/tai näytteisiin; tai koetinseosta ei ole lisätty; tai on lisätty virheellinen määrä reagenssia.</p> <p>Näytteessä on verta tai muita aineita, jotka estävät värimuutoksen havaitsemisen.</p> <p>Näytteen STM-määrä < 1 000 µl.</p>	<p>Ravistele hybridisointimikrolevyä tai mikroputkitelintä vielä kahden minuutin ajan. Jos senkin jälkeen jäljellä violetin värisiä kuoppia, lisää 25 µ:a asianmukaista koetinseosta ja sekoita hyvin. Jos koettimen lisäämisen ja uudelleensekoittamisen jälkeen ei tapahdu oikeaa värimuutosta eikä näytteessä ollut verta eikä muita aineita, testaa näyte uudelleen.</p> <p>Kuvattua tarkkaa värimuutosta ei odoteta tapahtuvan tämäntyyppisissä näytteissä, eikä tämä välttämättä vaikuta heikentävästi <i>digene</i> HC2 HPV DNA -kokeen tuloksiin.</p> <p>Tarkista alkuperäisen näytteen määrä. Määrän tulee olla 1 350 µl ± 20 µl (kun on poistettu 75 µl matalan ja korkean riskin HPV-koettimia varten). Jos määrä on < 1 350 µl, alkuperäisen näytteen STM oli < 1 000 µl. Hanki uusi näyte.</p>

Havainto	Mahdolliset syyt	Toimenpiteet
<p>Analyysi ei läpäise varmennuskriteerejä. Signaalia ei havaita positiivisissa kalibraattoreissa, laatukontroleissa tai näytteissä.</p>	<p>Koetinta ei ole lisätty koetinlaimennokseen.</p> <p>Valmistamisen aikana on tapahtunut koettimen ribonukleasikontaminaatio.</p> <p>Koettimen ja koettimen laimentimen riittämätön sekoittaminen.</p> <p>Laimennetun koettimen ja denaturoidun näytteen riittämätön sekoittuminen.</p> <p>Väärä aika tai lämpötila hybridisointivaiheessa.</p> <p>Riittämätön sekoittuminen sieppausvaiheen aikana.</p> <p>Koettimet tai koetinseokset tai hybridisointiputket vaihtuneet.</p> <p>Tunnistusreagenssi 1:tä ei ole lisätty oikeaa määrää, tai inkubointiaika ei ole ohjeiden mukainen.</p> <p>Tunnistusreagenssi 2:ta ei ole lisätty oikeaa määrää, tai inkubointiaika ei ole ohjeiden mukainen.</p> <p>Luminometrin toimintahäiriö tai virheellinen ohjelmointi.</p>	<p>Valmista koetinseokset tässä käyttöohjeessa kuvatulla tavalla. Varusta putket huolellisesti tunnistusmerkinnällä.</p> <p>Käytä aerosolin estäviä pipetinkärkiä koetinta pipetoidessasi ja käytä suojakäsineitä. Käytä vain puhtaita uusia kertakäyttöisiä reagenssialtaita.</p> <p>Kun olet lisännyt koetinta koettimen laimentimeen, sekoita perusteellisesti vorteksoimalla suurella nopeudella vähintään viiden sekunnin ajan. Näkyvän nestepöyrteen pitää muodostua.</p> <p>Kun olet lisännyt koetinseosta ja näytettä kuhunkin hybridisointimikrolevyn kuoppaan tai mikroputkeen, ravistele Rotary Shaker I -laitteessa nopeudella 1 100 ± 100 kierrosta minuutissa 3 ± 2 minuutin ajan. Tarkista, että väri kaikissa putkissa/mikrokuopissa muuttuu violetista keltaiseksi.</p> <p>Hybridisoi 60 ± 5 minuutin ajan 65 ± 2 °C:ssa. Tarkista Microplate Heater I -laitteen tai vesihautteen lämpötila. Varmista, että Microplate Heater I tai vesihautte on säädetty lämmittämään näytteet oikeaan lämpötilaan ja että laitetta esilämmitetään 60 minuutin ajan ennen käyttöä. Varmista, että vesihautteessa on sopivasti vettä näytteiden saattamiseksi oikeaan lämpötilaan. Vesihautteet tulee kalibroida määrääjain.</p> <p>Ravistele Rotary Shaker I -laitteessa 60 ± 5 minuuttia 20–25 °C:n lämpötilassa tässä käyttöohjeessa kuvatulla tavalla. Varmenna Rotary Shaker I -laitteen nopeus kalibroimalla <i>Rotary Shaker I -käyttöoppaan</i> Ravistelijan nopeuden kalibrointi -kohdassa kuvatulla tavalla.</p> <p>Valmista koetinseokset huolellisesti ja varusta koetinseosputket asianmukaisilla tunnistusmerkinnöillä. Varmista, että lisäät oikean koettimen oikeisiin hybridisointiputkiin. Varusta koetinseosputket, hybridisointiputket ja/tai telineet tunnistusmerkinnöillä vaihtumismahdollisuuden minimoimiseksi.</p> <p>Pipetoi 75 µl tunnistusreagenssi 1:tä jokaiseen kuoppaan käyttämällä kahdeksankanaavaista pipettoria. Inkuboi 20–25 °C:ssa 30–45 minuutin ajan.</p> <p>Pipetoi 75 µl tunnistusreagenssi 2:ta kuhunkin kuoppaan käyttäen 8-kanavaista annostelijaa. Inkuboi 20–25 °C:ssa 15–30 minuutin ajan.</p> <p>Katso lisäohjeita vastaavasta käyttöoppaasta tai ota yhteys QIAGENin paikalliseen edustajaan.</p>

Havainto	Mahdolliset syyt	Toimenpiteet
<p>Kohonneet RLU-arvot kalibraattoreissa, laatukontrolleissa ja/tai näytteissä (RLU-arvo ≥ 200 useissa tai kaikissa kuopissa). Analyysi ei välttämättä läpäise varmennuskriteerejä.</p>	<p>Denaturointireagenssia ei ole lisätty; tai lisätty virheellinen määrä reagenssia; tai riittämätön denaturointireagenssin sekoittuminen näytteisiin tai kalibraattoreihin.</p> <p>Luminometrissä on valovuoto. Luukku ei ole tiivis. Luukkua ympäröivä tiiviste rikkoutunut.</p> <p>Tunnistusreagenssi 1:n tai eksogeenisen alkalisen fosfataasin aiheuttama tunnistusreagenssi 2:n tai sieppausmikrolevyn kuoppien kontaminaatio.</p> <p>Kontaminoitunut pesupuskuri.</p> <p>Kontaminoitunut levykonepesuri.</p> <p>Sieppausmikrolevyn kuoppien riittämätön pesu tunnistusreagenssi 1:n inkuboinnin jälkeen.</p> <p>Mikrolevyn kuopissa on tunnistusreagenssi 1:n kontaminaatio.</p> <p>Hybridisointiliuoksen blottaus Kimtowels- tai vastaavien nukkaamattomien paperipyyhkeiden samaan kohtaan.</p> <p>Blottaukseen on käytetty vääränlaisia pyyhkeitä.</p>	<p>Varmista ennen denaturointireagenssin lisäämistä, että sarjapipetoja annostele oikein. Kalibroidut pipetit ovat perusehto. Lisää puoli tilavuutta denaturointireagenssia kuhunkin putkeen ja sekoita hyvin. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi varmista, että neste huuhtoo putken koko sisäpinnan. Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden tulee denaturointireagenssin lisäämisen jälkeen muuttua violetin värisiksi.</p> <p>Tarkista luminometrin taustaluku lukemalla tyhjä mikrolevy. Yli 50 RLU:n lukema indikoi valovuotoa. Katso lisäohjeita vastaavasta käyttöoppaasta tai ota yhteys QIAGENin paikalliseen edustajaan.</p> <p>Katso tämän Vianetsintä-osion Kontaminaation tarkastaminen -kohta.</p> <p>Katso tämän Vianetsintä-osion Kontaminaation tarkastaminen -kohta.</p> <p>Katso tämän Vianetsintä-osion Kontaminaation tarkastaminen -kohta.</p> <p>Pese mikrolevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta niin, että puskuri valuu yli, tai käyttämällä levykonepesuria. Pesun jälkeen kuopissa ei saa näkyä jäämiä vaaleanpunaisesta nesteestä. Katso lisätietoja kontaminaation tai toimintahäiriöiden testauksesta <i>levykonepesurin käyttöoppaasta</i>.</p> <p>Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaita ja kuivia. Käsittele tunnistusreagenssi 1:tä varoen. Suojaa aerosoleilta.</p> <p>Älä blottaa Kimtowels-pyyhkeiden tai vastaavien nukkaamattomien paperipyyhkeiden aiemmin käytettyyn kohtaan.</p> <p>Käytä blottaukseen Kimtowels- tai vastaavia nukkaamattomia paperipyyhkeitä.</p>
<p>Alhaiset PC/NC-suhdeluvut tai runsaasti heikosti positiivisia näytteitä, joissa suhde on $< 2,0$ ($> 20\%$). Analyysi ei välttämättä läpäise varmennuskriteerejä.</p>	<p>Riittämätön näytteen valmistelu.</p> <p>Koettimen riittämätön sekoittuminen tai koetinta on testeissä lisätty liian vähän.</p> <p>Riittämätön määrä laimennettua koetinta lisätty hybridisointimikroputkiin.</p> <p>Tunnistusreagenssi 1:n aktiivisuuden huononeminen.</p> <p>Puutteellinen sieppaus.</p> <p>Inadekvaatti pesu.</p> <p>Kontaminoitunut pesupuskuri.</p>	<p>Lisää tarvittava määrä denaturointireagenssia ja sekoita perusteellisesti vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi varmista, että neste huuhtoo putken koko sisäpinnan. Varmista ennen denaturointi-inkubointia PreservCyt-näyteliuosten tapauksessa, että solupelletin perusteellinen sekoitus ja uudelleensuspensiointi on valmis. Tarkista protokollan tiedot <i>digene HC2 Sample Conversion Kit</i> -käyttöohjeesta. Näytteen värin on muututtava selvästi kirkaasta tummanvioletiksi. Inkuboi 65 °C:n (± 2 °C) lämpötilassa 45 minuuttia (± 5 minuuttia).</p> <p>Valmista koetinseokset ohjeiden mukaisesti. Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla. Varmista, että syntyy näkyvä nestepörrö. Koetinseoksia on lisättävä putkiin ylipainesyrjäytykseen perustuvilla pipettoreilla tai monikanavaisella pipettorilla, jotta annostelu tapahtuu varmasti tarkasti.</p> <p>Varmista ennen koetinseoksen lisäämistä hybridisointimikrolevylle tai mikroputkiin, että 8-kanavainen pipettori annostele tarkasti. Lisää 25 μl koetinseosta kuhunkin denaturoitua kalibraattoria, laatukontrolleja ja klinisiä näytteitä sisältävään mikrolevykuoppaan tai mikroputkeen. Varmista ennen koetinseoksen lisäämistä hybridisointimikrolevyn kuoppiin, että 8-kanavainen pipettori annostele tarkasti. Värin tulee koetinseoksen lisäämisen ja perusteellisen sekoittamisen jälkeen muuttua tummasta violetista keltaiseksi. PreservCyt-liuosnäytteiden tulee muuttua vaaleanpunaisiksi eikä keltaisiksi.</p> <p>Säilytä tunnistusreagenssi 1:tä 2–8 °C:ssa. Käytä ennen ulkopakkaukseen merkittyä viimeistä käyttöpäivää.</p> <p>Käytä sieppausvaiheessa Rotary Shaker I:tä, jonka nopeudeksi on säädetty 1 100 \pm 100 kierrosta minuutissa. Varmenna ravistimen nopeus kalibroimalla.</p> <p>Pese mikrolevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta niin, että puskuri valuu yli, tai käyttämällä levykonepesuria.</p> <p>Katso tämän Vianetsintä-osion Kontaminaation tarkastaminen -kohta.</p>

Havainto	Mahdolliset syyt	Toimenpiteet
<p>Sarja positiivisia näytteitä, joiden RLU-arvot ovat suunnilleen samat.</p>	<p>Sieppausmikrolevyn kuoppien kontaminoituminen analyysikäsitellessä.</p> <p>Tunnistusreagenssi 2:n kontaminaatio.</p> <p>Levykonepesurin toimintahäiriö.</p>	<p>Sieppausmikrolevy on aina peitettävä inkubointien ajaksi. Vältä putkien altistamista aerosolikontaminaatiolle analyysin aikana. Käytä toimenpiteiden aikana puuterittomia käsiaineita.</p> <p>Varo, ettei näytteistö kontaminoidu annostellessasi tunnistusreagenssi 2:ta sieppausmikrolevyn kuoppiin. Estä tunnistusreagenssi 2:n kontaminoituminen tunnistusreagenssi 1:n aerosoleilla tai laboratoriopölyllä jne.</p> <p>Katso lisätietoja kontaminaation tai toimintahäiriöiden testauksesta tästä Vianetsintä-osiosta tai <i>levykonepesurin käyttöoppaasta</i>.</p>
<p>Suuret %CV-erot replikaateissa.</p>	<p>Epätarkka annostelu.</p> <p>Riittämätön sekoittuminen.</p> <p>Liian vähän nestettä siirretty hybridisointimikroputkista sieppausmikrolevyn kuoppiin.</p> <p>Väärät pesuolosuhteet.</p> <p>Mikrolevyn kuopissa on tunnistusreagenssi 1:n kontaminaatio.</p>	<p>Tarkista, että pipetori annostelee toistettavia määriä. Kalibroi pipetit säännöllisesti.</p> <p>Sekoita perusteellisesti kaikissa vaiheissa. Vorteksoi ennen denaturointi-inkubointia sekä koetinseoksen lisäämisen jälkeen. Varmista näkyvän nestepöyrteen syntyminen.</p> <p>Huolehdi siirtäessäsi nestettä hybridisointimikrolevyjen kuopista tai -mikroputkista sieppausmikrolevyn kuoppiin, että siirretyt määrät ovat toistettavia.</p> <p>Pese mikrolevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta niin, että puskuri valuu yli, tai käyttämällä levykonepesuria ja asianmukaisia levykonepesurin käyttömenettelyjä.</p> <p>Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaita ja kuivia. Käsittele tunnistusreagenssi 1:tä varoen. Suojaa aerosoleilta.</p>
<p>Negatiivisiksi tiedetyistä näytteistä on saatu väärän positiiviset tulokset.</p>	<p>Tunnistusreagenssi 2 kontaminoitunut.</p> <p>Mikrolevyn kuopissa on tunnistusreagenssi 1:n kontaminaatio.</p> <p>Useita rivejä on blotattu Kimtowel-pyyhkeen tai vastaavan paperipyyhkeen samaan kohtaan.</p> <p>Riittämätön näytteen valmistelu.</p> <p>Väärät pesuolosuhteet.</p> <p>Pipetinkärjen kontaminoituminen denaturoimattomasta aineesta siirrettäessä denaturoitu näyte HPV-koettimen hybridisointissa käytettyyn mikroputkeen tai mikrolevykuoppaan.</p>	<p>Varo näytteiden ristiin kontaminoitumista kun siirrät tunnistusreagenssi 2:ta näytteiden välillä. Jos tarvikesarjasta käytetään vain osa, ota analyysiä varten tarvittava määrä puhtaaseen kertakäyttöiseen reagenssikäiliöön ennen annostelijan täyttämistä.</p> <p>Pese mikrolevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta niin, että puskuri valuu yli, tai käyttämällä levykonepesuria. Pesun jälkeen mikrolevyn kuopissa ei saa näkyä jäämiä vaaleanpunaisesta nesteestä.</p> <p>Älä blottaa aiemmin käytettyyn kohtaan kontaminaation välttämiseksi.</p> <p>Lisää tarvittava määrä denaturointireagenssia ja sekoita perusteellisesti vorteksoimalla. Jottei analyysissä saada vääriä positiivisia tuloksia, varmista, että neste huuhtoo putken koko sisäpinnan joko manuaalisella menetelmällä tai MST Vortexer 2 -menetelmällä (manuaalisen vorteksointimenetelmän tapauksessa putkea on käännettävä kerran). Varmista ennen denaturointi-inkubointia PreservCyt-näyteliuosten tapauksessa, että solupelletin perusteellinen sekoitus ja uudelleensuspensiointi on valmis. Tarkista protokollan tiedot <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit -käyttöohjeesta. Kaikissa näytteissä tulee olla havaittavissa värin selvä muuttuminen tumman violetiksi. Inkuboi 65 ± 2 °C:n lämpötilassa 45 ± 5 minuuttia. SurePath-näytteitä on inkuboitava 90 ± 5 minuuttia 65 ± 2 °C:n lämpötilassa.</p> <p>Pese mikrolevyn kuopat perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa joko täyttämällä kuopat joka kerta niin, että puskuri valuu yli, tai käyttämällä levykonepesuria ja asianmukaisia levykonepesurin menettelyohjeita.</p> <p>Näytteen käsittelytoimenpiteen denaturointivaihe on suoritettava näiden käyttöohjeiden mukaisesti. Näytteen väärä vorteksointi, putken kääntäminen ylösalaisin ja putken ravistaminen voivat aiheuttaa kohdunkaulanäytteille endogeenisten epäspesifien RNA:DNA-hybridien epätäydellisen denaturoinnin. Erityisesti PreservCyt-liuosnäytteitä tai SurePath-säilöntänestettä käytettäessä näitä hybridejä esiintyy todennäköisesti näytteen denaturointiputken sisäseinämällä. Jotta tämä denaturoimaton soluaines ei siirtyisi näytteeseen, pipetin kärki ei saa koskettaa näytteen denaturointiputken seinämiä siirrettäessä denaturoitua näytettä HPV-koettimen hybridisointissa käytettyyn mikroputkeen tai mikrolevykuoppaan.</p>

Havainto	Mahdolliset syyt	Toimenpiteet
Kohonneet negatiivisen kalibraattorin RLU-arvot (RLU-arvot > 200). Analyysin loppuosassa analyysi toimi odotetulla tavalla.	Tunnistusreagenssi 2:ta inkuboihin yli 20–25 °C:n lämpötilassa. Tunnistusreagenssi 2:ta on inkuboitu yli 30 minuutin ajan. Tunnistusreagenssi 2 tai pesupuskuri kontaminoitunut alkalisella fosfataasilla tai tunnistusreagenssi 1:llä.	Suorita koe uudelleen ja varmista, että sieppaus- ja tunnistusvaiheissa inkubointi tehdään 20–25 °C:n lämpötilassa. Lue levy 15 minuutin kuluttua inkuboinnista (viimeistään 30 minuutin kuluttua inkuboinnista) 20–25 °C:n lämpötilassa. Katso tämän Vianetsintä-osion Kontaminaation tarkastaminen -kohta.
Analyysi ei läpäise varmennuskriteerejä. Kohonnut PC/NC-suhde.	HRC:n ja QC2-HR:n ja/tai LRC:n ja QC1-LR:n käänteinen sijainti	Testaa näytteet uudelleen. Lue kalibraattorin ja laatukontrollien pullojen tuote-etiketit huolellisesti, jotta näitä reagensseja ei aseteta käänteisesti.

KONTAMINAATIOTARKISTUS

Arvioitu reagenssi	Kontaminaatiotarkistusmenetelmä	Tulosten tulkinta
Huomautus: Pipetoi tunnistusreagenssi 2 huolellisesti kontaminaation estämiseksi. Käytä suojakäsineitä ja vältä koskemasta työskentelytasoihin pipetin kärjellä.		
Tunnistusreagenssi 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipetoi 75 µl otettua, jäljelle jäänyttä tai alkuperäistä tunnistusreagenssi 2:ta tyhjään sieppausmikrolevyn kuoppaan. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta. Lue mikrolevyn kuopat luminometrillä. <p>Huomautus: Tunnistusreagenssi 2:n testaaminen kolmena kappaleena tuottaa optimaalisen suorituskyvyn arvioinnin.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Tunnistusreagenssi 2:n kontrollin arvon tulisi olla < 50 RLU:ta. Jos tunnistusreagenssi 2:n arvot ovat < 50 RLU:ta, tunnistusreagenssi 2:ta voidaan käyttää arvion toistamiseen. Jos se on kontaminoitunut (> 50 RLU:ta), ota käyttöön uusi tarvikesarja ja toista analyysi.
Pesupuskurilaite ja/tai veden lähde	<ul style="list-style-type: none"> Pipetoi 75 µl tunnistusreagenssi 2:ta neljään erilliseen keräysmikrolevyn kuoppaan. Merkitse kuopat 1–4. Kuoppa 1 on tunnistusreagenssi 2:n kontrolli. Pipetoi 10 µl pesupuskuria pesuainepullosta kuoppaan 2. Anna pesupuskurin virrata pesuletkun läpi. Pipetoi 10 µl pesupuskuria letkusta kuoppaan 3. Ota pesupuskurin valmistukseen käytetyn veden osanäyte. Pipetoi 10 µl vettä kuoppaan 4. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta. Lue mikrolevyn kuopat luminometrillä. 	<ul style="list-style-type: none"> Tunnistusreagenssi 2:n kontrollin (kuoppa 1) arvon tulisi olla < 50 RLU. Vertaa RLU-arvoa kuopista 2, 3 ja 4 tunnistusreagenssi 2:n kontrollin RLU-arvoon (kuoppa 1). Yksittäisten RLU-arvojen kuopista 2, 3 ja 4 tulisi olla korkeintaan 50 RLU:ta tunnistusreagenssi 2:n kontrollin RLU-arvosta (kuoppa 1). Arvot, jotka ovat yli 50 RLU:ta tunnistusreagenssi 2:n kontrollista, tarkoittavat kontaminaatiota. Katso pesulaitteen puhdistus- ja kunnossapito-ohjeita Reagenssin valmistelu ja säilytys -kohdasta.
Levykonepesuri	<ul style="list-style-type: none"> Pipetoi 75 µl tunnistusreagenssi 2:ta viiteen erilliseen keräysmikrolevyn kuoppaan. Merkitse kuopat 1-5. Kuoppa 1 on tunnistusreagenssi 2:n kontrolli. Pipetoi 10 µl pesupuskuria kuoppaan 2 levypesurin pullosta, johon on merkitty <i>Wash</i> (Pesu). Pipetoi 10 µl huuhtelunestettä levypesurin <i>Rinse</i> (Huuhtelu) -merkinnällä varustetusta pullosta kuoppaan 3. Paina Prime (Esitäytä) -näppäintä levyn pesulaitteen näppäimistössä, jolloin pesupuskuri virtaa letkujen läpi. Pipetoi 10 µl pesupuskuria syvennyksestä kuoppaan 4. Paina levyn pesulaitteen näppäimistön Rinse-näppäintä, jolloin huuhteluaine virtaa letkujen läpi. Pipetoi 10 µl pesupuskuria syvennyksestä kuoppaan 5. Peitä ja inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta. Lue mikrolevyn kuopat luminometrillä. 	<ul style="list-style-type: none"> Tunnistusreagenssi 2:n kontrollin (kuoppa 1) arvon tulisi olla < 50 RLU. Vertaa RLU-arvoa kuopista 2, 3, 4 ja 5 tunnistusreagenssi 2:n kontrollin RLU-arvoon (kuoppa 1). Yksittäisten RLU-arvojen kuopista 2, 3, 4 ja 5 tulisi olla korkeintaan 50 RLU:ta tunnistusreagenssi 2:n kontrollin RLU-arvosta (kuoppa 1). Arvot, jotka ovat yli 50 RLU:ta tunnistusreagenssi 2:n kontrollista, tarkoittavat levyn pesulaitteen kontaminaatiota. Katso lisätietoja dekontaminaatioon liittyvistä toimenpiteistä <i>levykonepesurin käyttöohjeesta</i>.

QIAGEN YHTEYSTIEDOT

Käytä tuotteen mukana toimitettua yhteystietolomaketta ottaessasi yhteyttä oman alueesi QIAGEN-edustajaan.

Tavaramerkit: QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); CDP-Star® (Tropix, Inc.); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Excel®, Microsoft® (Microsoft Corporation); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.

Tämä tuote ja sen käyttömenetelmä on suojattu yhdellä tai useammalla seuraavista patenteista:

HPV:tä koskevien US-patenttien numerot

5 643 715 • 5 712 092 • 5 876 922 • 5 952 487 • 5 958 674 • 5 981 173 • 6 107 086

Hybridien sieppausta koskevan US-patentin numero

6 228 578B1

digene HC2 HPV DNA -koe

TÄRKEÄÄ: On tärkeä tutustua menetelmään yksityiskohtaisesti ennen tämän yhteenvedon soveltamista.

	Toimenpide	
	Manuaalinen vorteksointimenetelmä	Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 -menetelmä
DENATUROINTI (Katso PreservCyt-liuosnäytteen käyttöä varten digene HC2 Sample Conversion Kit -käyttöohje)	<p>Varusta hybridisointimikroputket tunnistusmerkinnällä. Valmistelee denaturointireagenssi.</p> <p>↓</p> <p>Pipetoi denaturointireagenssi (tilavuus vastaa puolta näytetilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontroleihin ja näytteisiin. Vorteksoi jokaista näytettä, kalibraattoria ja laatukontrollia yksittäin 5 sekunnin ajan (katso lisätietoja tästä käyttöohjeesta). Varmista, että kaikki putket ovat violetin väriset.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 65 ± 2 °C:ssa 45 ± 5 minuutin ajan.</p> <p>↓</p> <p>Valmista HPV-koetinseos.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Varusta hybridisointimikrolevy tunnistimella. Valmistelee denaturointireagenssi.</p> <p>↓</p> <p>Pipetoi denaturointireagenssi (tilavuus vastaa puolta näytetilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontroleihin ja näytteisiin. Varmista, että kaikki putket ovat violetin väriset.</p> <p>↓</p> <p>Peitä teline kalvolla ja kannella.</p> <p>↓</p> <p>Vorteksoi 10 sekunnin ajan.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 65 ± 2 °C:ssa 45 ± 5 minuutin ajan.</p> <p>↓</p> <p>Valmista HPV-koetinseos.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
HYBRIDISAATIO Yhdistelmäkoetinseosta käytävä menetelmä	<p>Vesihaudemenetelmä</p> <p>Sekoita denaturoitu näyte hyvin ja pipetoi 75 µl putkiin.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia.</p> <p>↓</p> <p>Pipetoi 25 µl yhdistelmäkoetinseosta hybridisointimikroputkiin.</p> <p>↓</p> <p>TAI</p> <p>Sekoita denaturoitu näyte hyvin ja pipetoi 75 µl "matalan riskin" putkiin. Sekoita denaturoitu näyte hyvin ja pipetoi 75 µl "korkean riskin" putkiin.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia.</p> <p>↓</p> <p>Pipetoi 25 µl matalan riskin HPV-koetinseosta "matalan riskin" putkiin. Pipetoi 25 µl korkean riskin HPV-koetinseosta "korkean riskin" putkiin.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Peitä mikroputket mikrolevyn tiivisteellä ja ravistele Rotary Shaker I -laitteessa 1 100 ± 100 kierroksen minuuttinopeudella 3 ± 2 minuutin ajan. Varmista, että kaikki putket näyttävät keltaisilta.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 60 ± 5 minuuttia 65 ± 2 °C:ssa. Valmista sieppausmikrolevy.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Microplate Heater I -menetelmä</p> <p>Sekoita denaturoitu näytekuoppa ja pipetoi 75 µl mikrolevyn kuoppiin.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia.</p> <p>↓</p> <p>Pipetoi 25 µl yhdistelmäkoetinseosta hybridisointimikrolevyn kuoppiin.</p> <p>↓</p> <p>TAI</p> <p>Sekoita denaturoitu näyte hyvin ja pipetoi 75 µl "matalan riskin" mikrolevyn kuoppiin ja 75 µl "korkean riskin" mikrolevyn kuoppiin.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia.</p> <p>↓</p> <p>Pipetoi 25 µl matalan riskin HPV-koetinseosta "LR"-mikrolevyn kuoppiin. Pipetoi 25 µl matalan riskin HPV-koetinseosta "HR"-mikrolevyn kuoppiin.</p> <p>↓</p> <p>Peitä mikrolevy mikrolevyn kannella ja ravistele Rotary Shaker I -laitteessa 1 100 ± 100 kierroksen minuuttinopeudella 3 ± 2 minuutin ajan. Varmista, että kaikki putket näyttävät keltaisilta.</p> <p>↓</p> <p>Inkuboi 65 ± 2 °C:ssa 60 ± 5 minuutin ajan. Valmista sieppausmikrolevy.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
HYBRIDIN SIEPPAUS	<p>Siirrä kunkin hybridisointimikrolevykuopan tai mikroputken sisältö vastaavaan sieppausmikrolevyn kuoppaan käyttäen 8-kanavaista annostelijaa. Peitä mikrolevyn kannella tai mikrolevyn tiivisteellä. Peitä levyn kannella tai levytiivisteellä.</p> <p>↓</p> <p>Ravistele 1 100 ± 100 kierroksen minuuttinopeudella 20–25 °C:ssa for 60 ± 5 minuutin ajan. Valmista pesupuskuri.</p> <p>↓</p> <p>Dekantoi ja blottaa sieppausmikrolevy (katso lisätietoja tästä käyttöohjeesta).</p> <p>↓</p>	
HYBRIDIN TUNNISTUS	<p>Pipetoi 75 µl tunnistusreagenssi 1:tä jokaiseen sieppausmikrolevyn kuoppaan. Peitä sieppausmikrolevy mikrolevyn kannella, Parafilmillä tai vastaavalla. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 30–45 minuuttia. Pese mikrolevy valitsemallasi menetelmällä.</p> <p>↓</p>	
PESEMINEEN	<p>Manuaalinen pesumenetelmä</p> <p>Dekantoi ja blottaa sieppausmikrolevy (katso lisätietoja tästä käyttöohjeesta).</p> <p>↓</p> <p>Pese kuusi kertaa.</p> <p>↓</p> <p>Blottaa nukkaamattomilla paperipyyhkeillä.</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Levykonepesurimenetelmä</p> <p>Aseta mikrolevy pesulaitteeseen ja paina "START/STOP" (Käynnistys/pysäytys) -näppäintä.</p> <p>↓</p> <p>Siirry seuraavaan vaiheeseen.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
SIGNAALIN VAHVISTUS	<p>Pipetoi 75 µl tunnistusreagenssi 2:ta jokaiseen sieppausmikrolevyn kuoppaan. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15–30 minuuttia.</p> <p>↓</p>	
LUKEMINEN	<p>Lue sieppausmikrolevy DML-laitteella.</p> <p>↓</p> <p>Varmenna analyysi ja tulkitse näytteen tulokset.</p>	