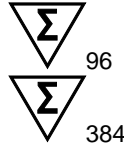


Αύγουστος 2015

Οδηγίες χρήσης δοκιμασίας *digene*® HC2 High-Risk HPV DNA



IVD

Μια *in vitro* δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκού οξέος με ενίσχυση σήματος και χρήση μικροπλακιδίου χημειοφωταύγειας για την ποιοτική ανίχνευση 13 τύπων υψηλού κινδύνου DNA του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) σε τραχηλικά και κολπικά δείγματα

Για χρήση με τα παρακάτω:

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



REF

5197-1330 (ΚΙΤ 1 πλακιδίου)
618111 (ΚΙΤ 4 πλακιδίων)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
ΗΠΑ

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ΓΕΡΜΑΝΙΑ

1058538EL Rev. 02

Βασικές αλλαγές από την προηγούμενη αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης

- Προστέθηκε η διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του κιτ QIAAsymphony® DSP HPV Media μαζί με τα αντίστοιχα δεδομένα απόδοσης.
- Ενημερώθηκε για συμμόρφωση με το σύστημα οικουμενικής εναρμόνισης για την ταξινόμηση και επισήμανση των χημικών ουσιών (GHS).

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	8
Περίληψη και επεξήγηση	9
Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό	10
Αρχές της διαδικασίας	10
Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του QIASymphony SP	12
Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media	12
Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP ΑΧρΗ DNA	13
Εξετάσεις με χρήση του Rapid Capture System	13
Υλικά που παρέχονται	16
Κιτ 1 πλακιδίου	16
κιτ 4 πλακιδίων	16
Περιεχόμενα του κιτ	17
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	19
In vitro διαγνωστικός εξοπλισμός και υλικά	19
Εξοπλισμός και υλικά γενικής χρήσης εργαστηρίου	20
Πρόσθετος εξοπλισμός και υλικά για προετοιμασία δειγμάτων PreservCyt	22
Πρόσθετος εξοπλισμός και υλικά για προετοιμασία δειγμάτων SurePath	22
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	23
Προειδοποιήσεις	23
Δείγματα	23
Αζίδιο του νατρίου	24
Ρυθμιστικό διάλυμα N2	24
Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS	25
Δηλώσεις ασφάλειας και κινδύνου για τα συστατικά	25
Προφυλάξεις	27
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	28
Συστατικά του κιτ	28

Προετοιμασμένα αντιδραστήρια	28
Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων	29
Τραχηλικά και κολπικά δείγματα σε STM	29
Τραχηλικές βιοψίες	30
Τραχηλικά δείγματα σε διάλυμα PreservCyt	30
Τραχηλικά δείγματα σε υγρό διατήρησης SurePath	32
Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath	33
Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath	33
Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath	34
Διαδικασία.....	35
Προετοιμασία αντιδραστηρίων	35
Αντιδραστήριο αποδιάταξης	37
Αντιδραστήριο αποδιάταξης 2.....	38
Μίγμα ανιχνευτών.....	39
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	41
Δημιουργία της διάταξης πλακιδίων.....	42
Προετοιμασία δειγμάτων	44
Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media.....	44
Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη-διαβάθμιση SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media.....	45
Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA.....	46
Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt	46
Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath	46
Αποδιάταξη και υβριδισμός δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIASymphony SP	49
Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και εκλουσμάτων DNA για χειροκίνητες εξετάσεις.....	49

Προαιρετικό σημείο διακοπής των εκλουσμάτων DNA.....	51
Υβριδισμός εκλουσμάτων DNA.....	51
Αποδιάταξη και υβριδισμός δειγμάτων STM και χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath.....	52
Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM.....	52
Προαιρετικό σημείο διακοπής των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath	54
Υβριδισμός των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath.....	55
Υβριδισμός με χρήση μικροπλακιδίου και του Microplate Heater I	56
Υβριδισμός με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου	58
Δέσμευση υβριδίου	60
Ανίχνευση υβριδίου.....	62
Έκπλυση	64
Μέθοδος Automated Plate Washer	64
Μέθοδος χειροκίνητης έκπλυσης.....	65
Ενίσχυση σήματος.....	67
Μέτρηση του μικροπλακιδίου δέσμευσης και παραγωγή αποτελεσμάτων.....	68
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	69
Αποτελέσματα εξέτασης δειγμάτων STM	69
Αποτελέσματα εξέτασης δειγμάτων SurePath.....	69
Αποτελέσματα εξέτασης δειγμάτων PreservCyt	69
Τιμή RLU/CO κοντά στο 1,0	70
Άλλοι τύποι HPV	70
Επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας	70
Αρνητικός βαθμονομητής	71
Θετικός βαθμονομητής.....	71
Μέση τιμή θετικού βαθμονομητή / μέση τιμή αρνητικού βαθμονομητή	71
Υπολογισμός της τιμής Cutoff	72
Οροί ελέγχου ποιότητας	72

Περιορισμοί.....	74
Χαρακτηριστικά απόδοσης	75
Κλινική απόδοση κατά τον προσυμπτωματικό έλεγχο ασθενών με φυσιολογικά αποτελέσματα κολπικού επιχρίσματος ως βοήθημα στην αξιολόγηση του κινδύνου για διαχείριση των ασθενών.....	75
Κλινική απόδοση κατά τον προσυμπτωματικό έλεγχο ασθενών με αποτελέσματα ανάλυσης κολπικού επιχρίσματος ASC-US προκειμένου να προσδιοριστεί η ανάγκη παραπομπής σε κολποσκόπηση.....	81
Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα για τον προσδιορισμό του κινδύνου νόσου υψηλού βαθμού σε γυναίκες με κολπικό επίχρισμα LSIL ή HSIL.....	83
Απόδοση της συλλογής από τον ιατρό ή αυτολήψης κολπικών δειγμάτων.....	87
Αναλυτική ευαισθησία	88
Ισοδυναμία μεταξύ τύπων δειγμάτων.....	89
Ισοδυναμία μεταξύ δειγμάτων STM και PreservCyt.....	89
Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media	89
Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP AXpH DNA	90
Ισοδυναμία μεταξύ STM και χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath	91
Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.....	92
Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media	93
Συμφωνία μεταξύ μεθόδων δοκιμασίας.....	94
Αναπαραγωγιμότητα.....	98
Συνολική αναπαραγωγιμότητα των χειροκίνητων εξετάσεων.....	98
Αναπαραγωγιμότητα με κλινικά δείγματα STM	98
Αναπαραγωγιμότητα κλινικών δειγμάτων PreservCyt.....	102

Αναπαραγωγικότητα κλινικών δειγμάτων SurePath	113
Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα	118
Διασταυρούμενος υβριδισμός	120
Επίδραση του αίματος και άλλων ουσιών σε δείγματα STM	121
Επίδραση του αίματος και άλλων ουσιών σε δείγματα PreservCyt.....	122
Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος	122
Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media	122
Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP AXpH DNA	123
Effect of blood and other substances on SurePath specimens	Error! Bookmark not defined.
Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media	124
Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.....	125
Μεταφορά	125
Σταθερότητα αντιδραστηρίων επί του οργάνου	127
Βιβλιογραφία	130
Σύμβολα	135
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	136
Έλεγχος μόλυνσης του DR2	145
Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού	145
Έλεγχος μόλυνσης του Automated Plate Washer	146
Πληροφορίες επικοινωνίας.....	147

Προβλεπόμενη χρήση

Για διαγνωστική χρήση in vitro (IVD).

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA αξιοποιώντας την τεχνολογία Hybrid Capture® 2 (HC2) αποτελεί μια δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκού οξέος με ενίσχυση σήματος χρησιμοποιώντας μικροπλακίδιο χημειοφωταύγειας για την ποιοτική ανίχνευση 13 τύπων υψηλού κινδύνου HPV DNA σε τραχηλικά και κολπικά δείγματα.

Τα τραχηλικά και κολπικά δείγματα τα οποία μπορούν να αναλυθούν με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA περιλαμβάνουν τα εξής:

- Τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται από γιατρό με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA
- Δείγματα που λαμβάνονται με αυτολήψη με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA
- Βιοψίες που συλλέγονται με το *digene* Specimen Transport Medium (STM, μέσο μεταφοράς δείγματος)
- Δείγματα που συλλέγονται με δειγματολήπτη τύπου σαρώθρου ή με συνδυασμό βούρτσας/σπάτουλας και στη συνέχεια τοποθετούνται σε διάλυμα PreservCyt ή υγρό διατήρησης SurePath

Η χρήση αυτής της δοκιμασίας ενδείκνυται:

- Για την ανίχνευση των τύπων HPV υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68, οι οποίοι αποτελούν πρωταρχικό αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου.
- Ως αρχικός προσυμπτωματικός γενικός έλεγχος του πληθυσμού, για χρήση με ή χωρίς κολπικό επίχρισμα, προκειμένου να εντοπιστούν οι γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του τραχήλου ή να ανιχνευτεί η παρουσία τραχηλικών νόσων υψηλού βαθμού. Η διάγνωση του HPV είναι περισσότερο ενδεικτική των τραχηλικών νόσων καθώς αυξάνεται η ηλικία.
- Ως συμπληρωματικός έλεγχος σε ασθενείς που παρουσίασαν μη φυσιολογικά αποτελέσματα ανάλυσης κολπικού επιχρίσματος ή τραχηλικές παθήσεις, προκειμένου να καθοριστεί η ανάγκη κολποσκόπησης ή άλλων συμπληρωματικών διαδικασιών.
- Ως συμπληρωματικός έλεγχος σε ασθενείς με χαμηλού βαθμού πλακώδη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (LSIL) ή υψηλού βαθμού πλακώδη ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση (HSIL) που προκύπτει από την ανάλυση του κολπικού επιχρίσματος πριν από κολποσκόπηση. Για τις ασθενείς αυτές, το αποτέλεσμα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA θα βοηθήσει τον γιατρό στη διαχείριση των ασθενών, βοηθώντας στην εκτίμηση του κινδύνου που διατρέχει η γυναίκα για τον προσδιορισμό της απουσίας παθήσεων υψηλού κινδύνου.

Περίληψη και επεξήγηση

Η παρουσία ορισμένων τύπων HPV στη γεννητική οδό της γυναίκας συσχετίζεται με έναν αριθμό παθήσεων, όπως κονδυλώμα, βλατίδωση Bowen, ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου, του κόλπου και του αιδοίου και καρκίνωμα (1–3). Είναι γενικώς αποδεκτό ότι αυτοί οι ιοί είναι κυρίως σεξουαλικά μεταδιδόμενοι και ότι οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου αποτελούν τον κύριο αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου (4–8).

Μέχρι στιγμής, ο ιός HPV δεν μπορεί να καλλιεργηθεί *in vitro* και οι ανοσολογικές δοκιμασίες δεν επαρκούν για να προσδιοριστεί η παρουσία τραχηλικής μόλυνσης με HPV. Έμμεσες ενδείξεις πρωκτογεννητικής λοίμωξης με HPV λαμβάνονται μέσω φυσικής εξέτασης και με την παρουσία χαρακτηριστικών κυτταρικών αλλοιώσεων που σχετίζονται με ιογενή αναπαραγωγή σε κολπικά επιχρίσματα ή δείγματα βιοψίας. Διαφορετικά, οι βιοψίες μπορούν να αναλυθούν με υβριδισμό βουκλειϊκού οξέος προκειμένου να ανιχνευτεί άμεσα η παρουσία HPV DNA.

Ιστορικά, οι τύποι HPV 16 και 18 έχουν θεωρηθεί ως τύποι συσχετιζόμενοι με καρκίνο υψηλού κινδύνου (8–10). Οι τύποι HPV 31, 33 και 35 διαπιστώθηκε ότι παρουσίαζαν μια ενδιάμεση συσχέτιση με τον καρκίνο (2,11–14). Αυτή η ενδιάμεση συσχέτιση οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι τύποι ανιχνεύονται συχνότερα στις υψηλού βαθμού πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις παρά στους καρκίνους. Κατά συνέπεια, η επαγωγή καρκίνων εξαιτίας της παρουσίας αυτών των τύπων είναι λιγότερο πιθανή σε σχέση με την παρουσία DNA των τύπων HPV υψηλού κινδύνου (15). Αυτοί οι 5 τύποι HPV ευθύνονται για το 73% των μολύνσεων με HPV (16, 17). Κάποιοι πρόσθετοι τύποι HPV, συμπεριλαμβανομένων των τύπων 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68, έχουν αναγνωρισθεί ως οι πρωταρχικά ανιχνεύσιμοι τύποι HPV στο υπολειπόμενο ποσοστό βλαβών (17–27). Αυτοί οι τύποι HPV μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε ομάδες ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου, ανάλογα με τη σχετική κατανομή τους σε διάφορες κατηγορίες ιστοπαθολογικής διάγνωσης (16, 17, 24–28).

Η παρουσία HPV DNA επιβεβαιώνεται σε ποσοστό περίπου 10% των γυναικών με φυσιολογικό τραχηλικό επιθήλιο, αλλά ο πραγματικός επιπολασμός σε συγκεκριμένες ομάδες γυναικών επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία και άλλες δημογραφικές μεταβλητές (2, 10, 16, 29). Προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι 15–28% των γυναικών που ήταν θετικές για HPV DNA ανέπτυξαν πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (SIL) σε διάστημα 2 ετών, σε σύγκριση με αντίστοιχο ποσοστό μόλις 1–3% των γυναικών που ήταν αρνητικές για HPV DNA (30, 31). Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εξέλιξης για τους τύπους HPV 16 και 18 ήταν μεγαλύτερος (περίπου κατά 40%) σε σχέση με άλλους τύπους HPV (30).

Πληροφορίες για τον παθογόνο μικροοργανισμό

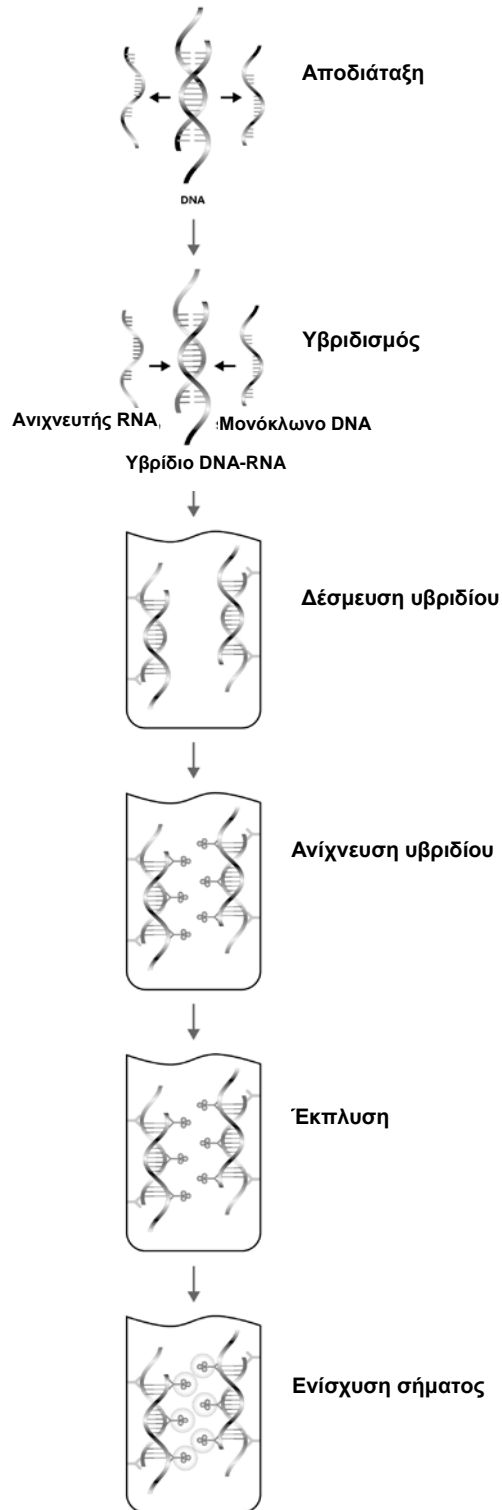
Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων αποτελούνται από ένα εικοσαεδρικό ιικό σωματίδιο (ιοσωμάτιο, βίριο) το οποίο περιέχει ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA με 8.000 ζεύγη βάσεων, που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Μετά τη μόλυνση των επιθηλιακών κυττάρων, το ιικό DNA εγκαθίσταται σε ολόκληρο το πάχος του επιθηλίου, αλλά τα ανέπαφα βίρια εντοπίζονται μόνο στα ανώτερα στρώματα του ιστού. Κατά συνέπεια, το ιικό DNA εντοπίζεται είτε στα βίρια είτε υπό μορφή επισωματικών ή ενσωματωμένων αλληλουχιών HPV, ανάλογα με τον τύπο και το βαθμό της βλάβης.

Αρχές της διαδικασίας

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, με χρήση της τεχνολογίας HC2, είναι μια δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκού οξέος με ενίσχυση σήματος η οποία χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια μικροπλακιδίου. Δείγματα τα οποία περιέχουν το DNA-στόχο υβριδοποιούνται με έναν ειδικό ανιχνευτή HPV RNA. Τα παραγόμενα υβρίδια RNA-DNA δεσμεύονται στην επιφάνεια ενός πηγαδιού μικροπλακιδίου που είναι καλά επικαλυμμένη με αντισώματα ειδικά για υβρίδια RNA-DNA. Τα ακινητοποιημένα υβρίδια αντιδρούν στη συνέχεια με συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αντισώματα, ειδικά για τα υβρίδια RNA-DNA και ανιχνεύονται με ένα υπόστρωμα χημειοφωταύγειας. Αρκετά μόρια αλκαλικής φωσφατάσης αντιστοιχίζονται σε κάθε αντίσωμα. Πολλαπλά συζευγμένα αντισώματα ενώνονται με κάθε δεσμευμένο υβρίδιο προκαλώντας σημαντική ενίσχυση σήματος. Καθώς το υπόστρωμα διασπάται από τη δεσμευμένη αλκαλική φωσφατάση, εκλύεται φως, το οποίο μετράται σε μονάδες μέτρησης σχετικής φωτεινότητας (RLU) από ένα όργανο *digene* Microplate Luminometer (DML). Η ένταση του φωτός που εκλύεται υποδηλώνει την παρουσία ή απουσία του DNA-στόχου στο δείγμα.

Μια μέτρηση RLU ίση ή μεγαλύτερη της τιμής Cutoff (CO) της δοκιμασίας υποδεικνύει την παρουσία αλληλουχιών HPV DNA υψηλού κινδύνου στο δείγμα. Μια μέτρηση RLU μικρότερη της τιμής CO της δοκιμασίας υποδεικνύει την απουσία των ειδικών αλληλουχιών HPV DNA υψηλού κινδύνου που εξετάζονται ή δηλώνει ότι τα επίπεδα HPV DNA βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας.

Ροή εργασίας δέσμησης υβριδίων



Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του QIASymphony SP

Η αυτοματοποιημένη προετοιμασία των δειγμάτων PreservCyt μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση του QIASymphony SP με το κιτ QIASymphony DSP HPV Media ή το κιτ QIASymphony DSP AXpH DNA.

Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media

Το κιτ QIASymphony DSP HPV Media παρέχει εγχυλίσματα δείγματος στο μικροπλακίδιο υβριδισμού, τα οποία είναι έτοιμα για αυτοματοποιημένες εξετάσεις με χρήση του Rapid Capture® System (RCS) με τη δοκιμασία digene HC2 High-Risk HPV DNA. Το QIASymphony SP εκτελεί όλα τα βήματα της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων για έως και 88 δείγματα, σε παρτίδες των 24 δειγμάτων, σε μία μόνο εκτέλεση.

Το QIASymphony SP επεξεργάζεται 88 δείγματα PreservCyt σε 2 ώρες και 15 λεπτά, χωρίς να απαιτείται παρέμβαση του χρήστη μετά τη φόρτωση του οργάνου με τα δείγματα.

Το QIASymphony SP επεξεργάζεται 88 δείγματα SurePath σε 1 ώρα και 45 λεπτά, χωρίς να απαιτείται παρέμβαση του χρήστη μετά τη φόρτωση του οργάνου με τα δείγματα. Η προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του QIASymphony SP ακολουθείται αμέσως από επώαση 90 λεπτών των εγχυλισμάτων δείγματος στο μικροπλακίδιο υβριδισμού σε ένα θερμαντήρα μικροπλακιδίων. Κατά τη διάρκεια της επώασης εκχυλισμάτων δειγμάτων, οι βαθμονομητές και οροί ελέγχου ποιότητας αποδιατάσσονται ξεχωριστά σε λουτρό νερού και στη συνέχεια διανέμονται με πιπέτα χειροκίνητα στην πρώτη στήλη του μικροπλακιδίου υβριδισμού μόλις ολοκληρωθεί η επώαση των εκχυλισμάτων δειγμάτων. Η προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με το κιτ QIASymphony SP και QIASymphony DSP HPV Media μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε πριν την έναρξη της κυτταρολογικής επεξεργασίας είτε μετά την ολοκλήρωση της κυτταρολογικής επεξεργασίας.

Σημαντικό: Τα εγχυλίσματα δείγματος που παράγονται ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt και SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media μπορούν να εξεταστούν μόνο με χρήση του RCS. Η χειροκίνητη διεξαγωγή της δοκιμασίας με εγχυλίσματα δείγματος δεν έχει επικυρωθεί.

Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένης προετοιμασίας δειγμάτων με χρήση του QIASymphony, ανατρέξτε στα ισχύοντα εγχειρίδια χρήσης του QIASymphony και στις οδηγίες χρήσης (εγχειρίδιο) του κιτ QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) επιπροσθέτως στις παρούσες οδηγίες χρήσης, για τις απαραίτητες διαδικαστικές και περιγραφικές πληροφορίες.

Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Το kit QIASymphony DSP AXpH DNA παρέχει εκλούσματα DNA στο μικροπλακίδιο υβριδισμού, τα οποία είναι έτοιμα για χειροκίνητες ή αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Το QIASymphony SP εκτελεί όλα τα βήματα της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων για έως και 88 δείγματα, σε παρτίδες των 24 δειγμάτων, σε μία μόνο εκτέλεση. Το QIASymphony SP επεξεργάζεται 88 δείγματα σε 4 ώρες και 30 λεπτά, χωρίς να απαιτείται παρέμβαση του χρήστη μετά τη φόρτωση του οργάνου με τα δείγματα.

Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένης προετοιμασίας δειγμάτων με χρήση του QIASymphony, ανατρέξτε στα ισχύοντα εγχειρίδια χρήσης του QIASymphony και στο εγχειρίδιο kit QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), επιπροσθέτως στις παρούσες οδηγίες χρήσης, για τις απαραίτητες διαδικαστικές και περιγραφικές πληροφορίες.

Εξετάσεις με χρήση του Rapid Capture System

Εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA μπορούν να πραγματοποιηθούν με χρήση του RCS. Το kit 4 πλακιδίων (αρ. καταλ. 618111) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο με το RCS και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χειροκίνητες εξετάσεις.

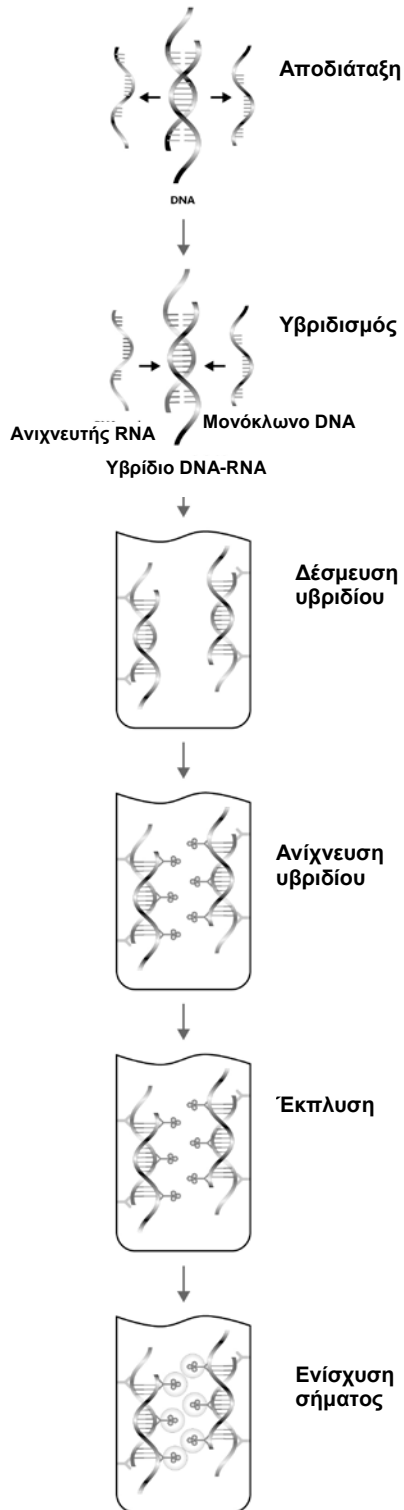
Το RCS είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα διανομής με πιπέτα και αραίωσης γενικής χρήσης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου. Αυτό το σύστημα επεξεργάζεται έως και 352 δείγματα σε 8 ώρες, συμπεριλαμβανομένης μιας περιόδου 3,5 ωρών κατά τη διάρκεια της οποίας δεν απαιτείται παρέμβαση του χρήστη, και μπορούν να παραχθούν έως και 704 αποτελέσματα δειγμάτων σε 13 ώρες.

Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιείται ανεξάρτητα από το RCS πριν την τοποθέτηση στην πλατφόρμα RCS. Επιπλέον, η ανίχνευση του χημειοφωταυγούς σήματος και η αναφορά των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνται με χρήση ενός offline οργάνου DML, το οποίο είναι κοινό τόσο στις χειροκίνητες όσο και στις αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις.

Καθένα από τα βήματα της δοκιμασίας digene HC2 High-Risk HPV DNA εκτελείται με την ακριβή σειρά όπως και οι χειροκίνητες εξετάσεις. Το RCS επιτρέπει την κλιμακωτή επεξεργασία έως και 4 μικροπλακιδίων, με το κάθε μικροπλακίδιο να περιέχει δείγματα και τους απαιτούμενους βαθμονομητές και ορούς ελέγχου ποιότητας δοκιμασίας.

Κατά την εκτέλεση εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) και στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System — εκτέλεση δοκιμασιών digene HC2 DNA με χρήση δειγμάτων επεξεργασμένων στο QIAasymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAasymphony SP Processed Samples*), επιπροσθέτως στις παρούσες οδηγίες χρήσης, για τις απαραίτητες διαδικαστικές και περιγραφικές πληροφορίες.

Ροή εργασίας δέσμησης υβριδίων



Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος

Αυτοματοποιημένη στο Rapid Capture

Υλικά που παρέχονται

Κιτ 1 πλακιδίου

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA 1 πλακιδίου περιέχει 96 εξετάσεις (αρ. καταλ. 5197-1330)

Κατά την εκτέλεση χειροκίνητων εξετάσεων με χρήση του κιτ 1 πλακιδίου, ο μικρότερος αριθμός εξετάσεων που συνιστάται για κάθε χρήση είναι 24 εξετάσεις. Εάν είναι επιθυμητές λιγότερες από 24 εξετάσεις ανά χρήση, ο συνολικός αριθμός εξετάσεων ανά κιτ μπορεί να μειωθεί λόγω των περιορισμένων όγκων αντιδραστηρίων. Ο αριθμός των αποτελεσμάτων ασθενών θα ποικίλλει, ανάλογα με τον αριθμό των χρήσεων ανά κιτ, όπως καθορίζεται παρακάτω:

Αριθμός χρήσεων	Αριθμός αποτελεσμάτων ασθενών
1	88
2	80
3	72
4	64

Κατά την εκτέλεση εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS με το κιτ 1 πλακιδίου, η πλήρης χρήση του κιτ απαιτεί την εξέταση ενός πλήρους μικροπλακιδίου (88 δείγματα) ανά εκτέλεση RCS. Η μερική εξέταση ενός μικροπλακιδίου είναι αποδεκτή· ωστόσο, χρησιμοποιείται ολόκληρο το κιτ λόγω του κενού όγκου που απαιτείται για τη λειτουργία του οργάνου.

ΚΙΤ 4 ΠΛΑΚΙΔΙΩΝ

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA 4 πλακιδίων περιέχει 384 εξετάσεις (αρ. καταλ. 618111).

Το κιτ 4 πλακιδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για αυτοματοποιημένες με το RCS δοκιμασίες. Για να επιτευχθούν 384 εξετάσεις, το κιτ 4 πλακιδίων πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε 1 ή 2 εκτελέσεις RCS. Εάν είναι επιθυμητές περισσότερες από 2 εκτελέσεις, ο συνολικός αριθμός εξετάσεων ανά κιτ μπορεί να μειωθεί λόγω των περιορισμένων όγκων αντιδραστηρίων.

Περιεχόμενα του kit

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Αρ. καταλόγου	5197-1330	618111
Αριθμός εξετάσεων	96	384
Indicator Dye (χρωματικός δείκτης) Περιέχει 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (αντιδραστήριο αποδιάταξης) Διάλυμα αραιωμένου υδροξειδίου του νατρίου (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* (αραιωτικό ανιχνευτή) Ρυθμιστικό διάλυμα με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου) Ανιχνευτής RNA HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68 σε ρυθμιστικό διάλυμα (κόκκινο πώμα)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Ορός ελέγχου ποιότητας HPV χαμηλού κινδύνου) 5 pg/ml (500.000 αντίγραφα/ml) κλωνοποιημένο HPV 6 DNA και DNA-φορέας σε STM (μέσο μεταφοράς δείγματος) με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (ορός ελέγχου ποιότητας HPV υψηλού κινδύνου) 5 pg/ml (500.000 αντίγραφα/ml) κλωνοποιημένο HPV 16 DNA και DNA-φορέας σε STM (μέσο μεταφοράς δείγματος) με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (αρνητικός βαθμονομητής) DNA-φορέας σε STM (μέσο μεταφοράς δείγματος) με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου) 1 pg/ml κλωνοποιημένο HPV 16 DNA και DNA-φορέας σε STM (μέσο μεταφοράς δείγματος) με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου	1 ml	2 ml
Capture Microplate (μικροπλακίδιο δέσμευσης) Επικαλυμμένο με πολυκλωνικά αντι-RNA-DNA υβριδικά αντισώματα αίγας	1	4
Detection Reagent 1 (αντιδραστήριο ανίχνευσης 1) Συζευγμένα αντισώματα αλκαλικής φωσφατάσης στα υβρίδια RNA-DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου	12 ml	40 ml

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Αρ. καταλόγου	5197-1330	618111
Αριθμός εξετάσεων	96	384
Detection Reagent 2 (αντιδραστήριο ανίχνευσης 2) CDP-Star [®] με Emerald II (χημειοφωταυγές υπόστρωμα)	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate* (συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης) Περιέχει 1,5% (w/v) αζίδιο του νατρίου	100 ml	2 x 100 ml

** Βλ. «Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις», σελίδα 23, για πληροφορίες υγείας και ασφάλειας.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Σημαντικό: Βεβαιωθείτε πως τα όργανα που χρησιμοποιούνται σε αυτήν τη διαδικασία έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

In vitro διαγνωστικός εξοπλισμός και υλικά

Μόνο εξοπλισμός και υλικά που έχουν επικυρωθεί με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA είναι διαθέσιμα από την QIAGEN.

- Το *digene* Hybrid Capture 2 System («σύστημα *digene* HC2»), που αποτελείται από ένα εγκεκριμένο από την QIAGEN λουμινόμετρο («όργανο DML»), εγκεκριμένο από την QIAGEN προσωπικό υπολογιστή και περιφερειακά υπολογιστή (οθόνη, πληκτρολόγιο, ποντίκι, εκτυπωτή και καλώδιο εκτυπωτή), λογισμικό συστήματος *digene* HC2 («λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene*»), πρωτόκολλα δοκιμασίας συστήματος *digene* HC2 για HPV, λογισμικό πλακιδίων LumiCheck, και εγχειρίδιο χρήστη συστήματος *digene* HC2 (*digene HC2 System Software User Manual*).
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (προαιρετικό)*
- Στατώ μετατροπής και κάλυμμα (προαιρετικό)*
- Στατώ δειγμάτων και κάλυμμα *digene* (προαιρετικό)*
- Πιπέτα EXPAND-4 και βάση (προαιρετικό)†
- Διανεμητής σφραγίσεων σωληναρίων και κόφτης (προαιρετικό, χρησιμοποιείται με το MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (απαιτείται για χρήση με το κιτ 4 πλακιδίων, προαιρετικό για το κιτ 1 πλακιδίου)
- Συσκευή έκπλυσης
- Μικροπλακίδια υβριδισμού
- Καλύμματα μικροπλακιδίων
- Ταινίες πηγαδιών μικροπλακιδίων RCS*

* Απαιτείται για τη διεξαγωγή εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS.

† Είδος προσαρμοσμένο ανάλογα με τις απαιτήσεις του πελάτη για τη μεταφορά των δειγμάτων STM στο μικροπλακίδιο υβριδισμού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες προσαρμοσμένες, επεκτάσιμες πολυκάναλες πιπέτες, υπό την προϋπόθεση ότι μπορεί να επιτευχθεί απόσταση 3,2 cm όταν επεκταθούν.

- Αυτάκια αντιδραστηρίων RCS*
- Καλύμματα αυλακιών αντιδραστηρίων RCS*
- Αναλώσιμα ρύγχη RCS*
- Καλύμματα drop-on RCS*
- Ρυθμιστικό διάλυμα N2[†]
- Ρυθμιστικό διάλυμα D2[†]
- Μπλε λεκάνη μονάδας πλύσης RCS[‡]
- Έξτρα μακριά ρύγχη πιπετών
- Σωληνάρια συλλογής δειγμάτων
- Στατώ σωληναρίων συλλογής δειγμάτων
- Βιδωτά πώματα σωληναρίων συλλογής δειγμάτων
- Αναλώσιμα δοχεία αντιδραστηρίων
- Μembrάνη σφραγιστή σωληναρίων DuraSeal™
- Μικροσωληνάρια υβριδισμού[§]
- Στατώ μικροσωληναρίων[§]
- Σφραγιστές πλακιδίων[§]

Εξοπλισμός και υλικά γενικής χρήσης εργαστηρίου

- Υδατόλουτρο 65 ± 2°C επαρκούς μεγέθους για ένα στατώ δειγμάτων (πλάτος 21 cm x βάθος 32 cm x ύψος 18 cm)
- Μικροφυγόκεντρος
- Αναδευτήρας Vortexer με προσάρτημα κυπέλλου
- Μονοκάνηλη πιπέτα, μεταβλητές ρυθμίσεις για όγκους 20–200 μl και 200–1.000 μl
- Επαναληπτική πιπέτα θετικής εκτόπισης, όπως η πιπέτα Eppendorf® Repeater®
- 8-κάνηλη πιπέτα: μεταβλητές ρυθμίσεις για όγκους 25–200 μl
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου, 0,5% v/v
- Parafilm® ή ισοδύναμο

* Απαιτείται για τη διεξαγωγή εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS.


† Απαιτείται για τη διεξαγωγή εξετάσεων με δείγματα που έχουν προετοιμαστεί με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA.


‡ Απαιτείται για τη διεξαγωγή αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων δειγμάτων επεξεργασμένων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media.


§ Απαιτείται για τη διεξαγωγή υβριδισμού με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου.

- Αναλώσιμα ρύγχη πιπέτων με φραγμό αερολύματος για μονοκάναλη πιπέτα (20–200 μl και 200–1.000 μl)
- Αναλώσιμα ρύγχη για επαναληπτική πιπέτα θετικής εκτόπισης (12,5, 5, 2,5 και 1,25 ml)
- Αναλώσιμα ρύγχη για 8-κάναλη πιπέτα (25–200 μl)
- Μαντηλάκια Kimtowels® ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι
- Αναλώσιμο κάλυμμα επιφάνειας εργασίας
- Γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα
- Σωληνάρια πολυπροπυλενίου των 5 ml και/ή 15 ml με πώμα snap-cap, στρογγυλού πυθμένα
- Στατώ σωληναρίων για τη συγκράτηση σωληναρίων 10 ml ή 15 ml
- Κωνικά σωληνάρια πολυπροπυλενίου 50 ml


Πρόσθετος εξοπλισμός και υλικά για προετοιμασία δειγμάτων PreservCyt

 Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης (εγχειρίδιο) του κιτ QIAAsymphony DSP HPV Media (*QIAAsymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) για την αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIAAsymphony DSP HPV Media.

 Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο κιτ QIAAsymphony DSP AXpH DNA (*QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) για την αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIAAsymphony DSP AXpH DNA.

 Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του κιτ *digene* HC2 Sample Conversion για τη χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων.

Πρόσθετος εξοπλισμός και υλικά για προετοιμασία δειγμάτων SurePath

 Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης (εγχειρίδιο) του κιτ QIAAsymphony DSP HPV Media (*QIAAsymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) για την αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIAAsymphony DSP HPV Media..

Η χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων SurePath απαιτεί τον ακόλουθο πρόσθετο εξοπλισμό και υλικά:

- Φυγόκεντρος ταλαντευόμενου κάδου με δυνατότητα επίτευξης $800 \pm 15 \times g$ και συγκράτησης κωνικών σωληναρίων φυγόκεντρου των 15 ml από πολυπροπυλένιο
- Σωληνάρια *digene* HC2 Sample Conversion* ή σωληνάρια πολυπροπυλενίου των 15 ml VWR® ή Corning®
Σημαντικό: Τα σωληνάρια *digene* HC2 Sample Conversion που διατίθενται από την QIAGEN πρέπει να χρησιμοποιούνται με το MST Vortexer 2 ή το RCS.
- Πιπέτες μεταφοράς των 7 ml τυπικού άκρου ή ισοδύναμο
- *digene* Specimen Transport Medium (μέσο μεταφοράς δείγματος)

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro.

Διαβάστε όλες τις οδηγίες προσεκτικά προτού χρησιμοποιήσετε τη δοκιμασία.

Προειδοποιήσεις

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφαλείας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN.

Δείγματα

ΠΡΟΣΟΧΗ Κίνδυνος μολυσματικών παραγόντων



Τα δείγματα μπορεί να περιέχουν μολυσματικούς παράγοντες και πρέπει να τα μεταχειρίζεστε ανάλογα. Να θεωρείτε όλα τα δείγματα ως δυνητικά μολυσματικά.

Καμία γνωστή μέθοδος δοκιμασίας δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διασφάλιση ότι τα δείγματα δεν θα μεταδώσουν μόλυνση. Συνιστάται να μεταχειρίζεστε τα ανθρώπινα δείγματα σύμφωνα με τις ισχύουσες εθνικές και τοπικές πρακτικές βιοασφάλειας. Χρησιμοποιείτε αυτές τις πρακτικές βιοασφάλειας με υλικά που περιέχουν ή υπάρχει υποψία ότι περιέχουν μολυσματικούς παράγοντες.

Αυτές οι προφυλάξεις περιλαμβάνουν, αλλά όχι περιοριστικά, τις ακόλουθες:

- Μην προβαίνετε σε αναρρόφηση δια στόματος.
- Μην καπνίζετε, μην τρώτε και μην πίνετε σε χώρους όπου γίνεται χειρισμός και επεξεργασία αντιδραστηρίων ή δειγμάτων.
- Κατά το χειρισμό αντιδραστηρίων ή δειγμάτων, φοράτε αναλώσιμα γάντια -χωρίς επικάλυψη πούδρας. Πλύνετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας.

- Καθαρίστε και απολυμάνετε όλους τους λεκέδες από δείγματα χρησιμοποιώντας ένα φυματιοκτόνο απολυμαντικό, όπως 0,5% v/v υποχλωριώδες νάτριο ή άλλο κατάλληλο απολυμαντικό (32, 33).
- Απολυμάνετε και απορρίψτε όλα τα δείγματα, αντιδραστήρια και άλλα δυνητικώς μολυσμένα υλικά σύμφωνα με τους εθνικούς και τοπικούς κανονισμούς.

Μετά την αποδιάταξη και επώαση, τα δείγματα δεν θεωρούνται πλέον μολυσματικά (34). ωστόσο, το εργαστηριακό προσωπικό θα πρέπει να συνεχίζει να τηρεί τις εθνικές και τοπικές προφυλάξεις.

Αζίδιο του νατρίου

Ορισμένα αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει αζίδια μολύβδου και χαλκού στις σωληνώσεις του εργαστηρίου. Αυτά τα αζίδια μπορεί να προκαλέσουν έκρηξη σε περίπτωση κρούσης, όπως χτύπημα με σφυρί. Για να αποφύγετε το σχηματισμό αζιδίων μολύβδου ή χαλκού, ξεπλύνετε τις σωληνώσεις με άφθονο νερό μετά την απόρριψη διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Για να απολυμάνετε τις παλιές σωληνώσεις στις οποίες υπάρχει υποψία συσσώρευσης αζιδίων, η U.S. Occupational Safety and Health Administration (Υπηρεσία ασφάλειας και υγείας στον τόπο εργασίας των Η.Π.Α.) προτείνει τα εξής:

1. Αναρροφήστε τα υγρά από το σιφώνιο χρησιμοποιώντας ένα λαστιχένιο ή πλαστικό σωλήνα.
2. Γεμίστε με διάλυμα 10% v/v υδροξειδίου του νατρίου.
3. Αφήστε το διάλυμα να δράσει για 16 ώρες.
4. Ξεπλύνετε καλά με νερό.

Ρυθμιστικό διάλυμα N2

CAUTION Κίνδυνος ιδιαίτερα αντιδραστικών ενώσεων



Μην προσθέτετε λευκαντική ουσία ή όξινα διαλύματα απευθείας σε οποιοδήποτε διάλυμα ή απόβλητο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα N2.

Το ρυθμιστικό διάλυμα N2 περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη, η οποία μπορεί να σχηματίσει ιδιαίτερα εκρηκτικά μίγματα εάν έλθει σε επαφή με λευκαντικές ουσίες.

Εάν χυθεί υγρό που περιέχει αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα, καθαρίστε με κατάλληλο απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό. Εάν το υγρό που χύθηκε περιέχει δυνητικά μολυσματικούς παράγοντες, καθαρίστε καταρχήν την προσβεβλημένη περιοχή με απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό και κατόπιν με υποχλωριώδες νάτριο συγκέντρωσης 1% (v/v).

Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS

Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) για πρόσθετες προειδοποιήσεις και προφυλάξεις ειδικά όσον αφορά τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου.

Δηλώσεις ασφάλειας και κινδύνου για τα συστατικά

Για τα συστατικά του κιτ δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA εφαρμόζονται οι ακόλουθες φράσεις κινδύνου και ασφάλειας:

Washer Buffer Concentrate (Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης)



Περιέχει: Sodium azide. Προσοχή! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον. Διαθέσετε τα περιεχόμενα/περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων.

Denaturation Reagent (Αντιδραστήριο αποδιάταξης)



Περιέχει: sodium hydroxide. Κίνδυνος! Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Διαθέσετε τα περιεχόμενα/περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Αφαιρέστε αμέσως όλα τα μολυσμένα ενδύματα. Ξεπλύνετε το δέρμα με νερό/ στο ντους. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

Probe Diluent (Αραιωτικό ανιχνευτή)



Περιέχει: acetic acid; Polyacrylic acid. Κίνδυνος! Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Διαθέσετε τα περιεχόμενα/ περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ (ή με τα μαλλιά): Αφαιρέστε αμέσως όλα τα μολυσμένα ενδύματα. Ξεπλύνετε το δέρμα με νερό/ στο ντους. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/ προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/ πρόσωπο.

High-Risk HPV Calibrator (Βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου)

Προειδοποίηση! Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.

High-Risk HPV Quality Control (Ορός ελέγχου ποιότητας HPV υψηλού κινδύνου)

Προσοχή! Ερεθίζει ελαφρώς το δέρμα. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε/ Επισκεφθείτε γιατρό.

Low-Risk HPV Quality Control (Ορός ελέγχου ποιότητας HPV χαμηλού κινδύνου)

Προσοχή! Ερεθίζει ελαφρώς το δέρμα. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε/ Επισκεφθείτε γιατρό.


Negative Calibrator (Αρνητικός βαθμονομητής)

Προσοχή! Ερεθίζει ελαφρώς το δέρμα. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του

δέρματος: Συμβουλευθείτε/ Επισκεφθείτε γιατρό.

Προφυλάξεις

Ο χρήστης πρέπει πάντα να τηρεί τις ακόλουθες προφυλάξεις κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

- Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται δίπλα από το σύμβολο  στην ετικέτα της εξωτερικής συσκευασίας ή την ημερομηνία λήξης των παρασκευασμένων αντιδραστηρίων.
- Η εκτέλεση της δοκιμασίας εκτός των παρεχόμενων τιμών εύρους χρόνου και θερμοκρασίας μπορεί να παράγει μη έγκυρα αποτελέσματα. Οι δοκιμασίες που δεν εμπίπτουν στις καθιερωμένες τιμές εύρους χρόνου και θερμοκρασίας είναι μη έγκυρες και πρέπει να επαναληφθούν.
- Η διαδικασία της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, η βαθμονόμηση της διαδικασίας, ο έλεγχος ποιότητας και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δειγμάτων πρέπει να ακολουθούνται στενά για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων δοκιμασίας.
- Είναι σημαντικό να μεταγγίζεται ο ακριβής όγκος του αντιδραστηρίου όπως υποδεικνύεται καθώς και να πραγματοποιείται επαρκής μίξη μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου. Σε αντίθετη περίπτωση, μπορεί να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Με την εμφάνιση των σημειωμένων χρωματικών αλλαγών επιβεβαιώνεται η τήρηση αυτών των συνθηκών.
- Με την εξαίρεση του συμπτωκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, τα συστατικά του κιτ έχουν δοκιμαστεί ως μονάδα. Μην εναλλάσσετε συστατικά από άλλες πηγές ή από διαφορετικές παρτίδες. Είναι, ωστόσο, αποδεκτός ο συνδυασμός συστατικών από κιτ με τον ίδιο αριθμό παρτίδας για να ληφθούν οι απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίων για την εξέταση πολλαπλών μικροπλακιδίων σε μία και μόνη εκτέλεση RCS.
- Τα νουκλεϊκά οξέα είναι πολύ ευαίσθητα στην περιβαλλοντική αποδόμηση των νουκλεασών. Οι νουκλεάσες είναι παρούσες στο ανθρώπινο δέρμα και σε επιφάνειες ή υλικά που μεταχειρίζονται οι άνθρωποι. Καθαρίζετε και καλύπτετε τις επιφάνειες εργασίας με αναλώσιμο κάλυμμα επιφάνειας εργασίας και φοράτε γάντια χωρίς πούδρα κατά την εκτέλεση όλων των βημάτων της δοκιμασίας.
- Διασφαλίστε την πρόληψη της μόλυνσης του μικροπλακιδίου δέσμησης και του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 (DR2) με εξωγενή αλκαλική φωσφατάση κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοκιμασίας. Ουσίες που μπορεί να περιέχουν αλκαλική φωσφατάση περιλαμβάνουν το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 (DR1), βακτήρια, σίελο, μαλλιά και δερματικά έλαια. Η κάλυψη του μικροπλακιδίου δέσμησης μετά το βήμα έκπλυσης και κατά

τη διάρκεια της επώασης του DR2 είναι ιδιαίτερως σημαντική διότι εξωγενής αλκαλική φωσφατάση μπορεί να αντιδράσει με το DR2, παράγοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

- Προστατέψτε το DR2 από την παρατεταμένη έκθεση σε άμεσο φως. Χρησιμοποιήστε το DR2 αμέσως μετά τη διανομή σε κλασματικούς όγκους και αποφύγετε την έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως.
- Διενεργήστε προκαταρκτική πλήρωση της επαναληπτικής πιπέτας πριν από τη χορήγηση του αντιδραστήριου και ελέγχετε περιοδικά για μεγάλες φυσαλίδες αέρα. Υπερβολικές ποσότητες μεγάλων φυσαλίδων αέρα στο ρύγχος της επαναληπτικής πιπέτας μπορεί να προκαλέσει ανακριβή χορήγηση και μπορεί να αποφευχθεί με πλήρωση της πιπέτας, διανομή όλου του υγρού και επαναπλήρωση. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη της πιπέτας για ειδικές οδηγίες χρήσης.
- Εκτελέστε μετάγγιση με πολυ-κάναλη πιπέτα χρησιμοποιώντας την τεχνική ανάδρομης αναρρόφησης (βλ. «Ανίχνευση υβριδίου», σελίδα 62) για τη διανομή των DR1 και DR2. Ελέγξτε κάθε ρύγχος πιπέτας στην πολυκάναλη πιπέτα για σωστή εφαρμογή και πλήρωση.
- Βεβαιωθείτε ότι κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης έχει πλυθεί σχολαστικά (βλ. «Έκπλυση», σελ. 64). Το ανεπαρκές πλύσιμο θα οδηγήσει σε αυξημένο υπόβαθρο και μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Υπολείμματα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο σήμα ή κακή αναπαραγωγιμότητα.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Συστατικά του KIT

Κατά την παραλαβή του, αποθηκεύστε το kit σε θερμοκρασία 2–8°C. Το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, το αντιδραστήριο αποδιάταξης και ο χρωματικός δείκτης μπορούν να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία 2–30°C, ανάλογα με την προτίμησή σας. Όλα τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, εκτός από το αντιδραστήριο αποδιάταξης (DNR), το μίγμα ανιχνευτών και το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.

Προετοιμασμένα αντιδραστήρια

Αφού προετοιμαστεί, το DNR παραμένει σταθερό για 3 μήνες στους 2–8°C.

Μετά την προετοιμασία του, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει σταθερό για 3 μήνες σε θερμοκρασία 2–30°C.

Εάν εξετάζονται δείγματα PreservCyt επεξεργασμένα με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media ή με το κιτ QIASymphony DSP AXpH DNA, οι ανοιγμένοι, μη αποδιαταγμένοι βαθμονομητές και οροί ελέγχου ποιότητας παραμένουν σταθεροί για 3 μήνες στους 2–8°C.

Εάν εξετάζονται δείγματα επεξεργασμένα με χρήση του κιτ QIASymphony DSP AXpH DNA, το προετοιμασμένο αντιδραστήριο αποδιάταξης 2 (DNR2) παραμένει σταθερό για 8 μήνες στους 15–30°C.

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Συλλέξτε και μεταφέρετε τα τραχηλικά και κολπικά δείγματα για εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA χρησιμοποιώντας μία από τις ακόλουθες συσκευές δειγματοληψίας:

- Συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA (που αποτελείται από τραχηλική βούρτσα και STM)
- Βιοψίες που συλλέγονται στο *digene* STM
- Συσκευή συλλογής τύπου σαρώθρου ή συσκευή συλλογής συνδυασμού βούρτσας/σπάτουλας που τοποθετείται σε διάλυμα PreservCyt ή υγρό διατήρησης SurePath

Δείγματα που συλλέγονται με άλλες συσκευές δειγματοληψίας ή μεταφέρονται με άλλα μέσα μεταφοράς δεν έχουν επικυρωθεί για χρήση με αυτήν τη δοκιμασία. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης αυτής της δοκιμασίας καθορίστηκαν μόνο με τα υποδεικνυόμενα κιτ συλλογής.

Η συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε έγκυες γυναίκες. Τα τραχηλικά δείγματα πρέπει να συλλέγονται πριν από την εφαρμογή οξικού οξέος ή ιωδίου εάν πραγματοποιείται εξέταση κολποσκόπησης. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης της συσκευής συλλογής *digene* HC2 DNA για πρόσθετες διαδικασίες συλλογής και χειρισμού των δειγμάτων.

Τα τραχηλικά και κολπικά δείγματα που συλλέγονται σε STM δεν απαιτούν μετατροπή δείγματος πριν την εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Τα δείγματα PreservCyt και SurePath απαιτούν μετατροπή δείγματος πριν την εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Τραχηλικά και κολπικά δείγματα σε STM

Σημαντικό: Μη συλλέγετε ένα τραχηλικό ή κολπικό δείγμα STM εάν είναι παρούσες υψηλές συγκεντρώσεις αντιμυκητιακής κρέμας, αντισυλληπτικής γέλης ή καταιονισμού.

Τα δείγματα σε STM μπορούν να διατηρηθούν έως 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου και μπορούν να αποσταλούν στο εργαστήριο χωρίς ψύξη. Αποστέλλετε τα δείγματα σε μονωμένο δοχείο χρησιμοποιώντας υπηρεσία μεταφοράς με παράδοση εντός 2 ημερών το αργότερο.

Στο μικροβιολογικό εργαστήριο, φυλάσσετε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2–8°C εφόσον η δοκιμασία πρόκειται να πραγματοποιηθεί εντός 1 εβδομάδας. Σε περίπτωση που η δοκιμασία θα πραγματοποιηθεί πέραν της 1 εβδομάδας, καλύψτε τα πώματα των σωληναρίων δείγματος με Parafilm και φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία –20°C για έως 3 μήνες. Κατά την αφαίρεση των δειγμάτων από τον καταψύκτη για την εξέτασή τους, αντικαταστήστε αμέσως τα πώματά τους με βιδωτά πώματα για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων.

Στο STM έχει προστεθεί ένα συντηρητικό για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων και τη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA. Το συντηρητικό αυτό δεν προορίζεται για τη συντήρηση της βιωσιμότητας των οργανισμών ή κυττάρων.

Τραχηλικές βιοψίες

Οι φρέσκες συλλεγμένες τραχηλικές βιοψίες διατομής 2–5 mm μπορούν να εξετάζονται με τη δοκιμασία digene HC2 High-Risk HPV DNA. Μη χρησιμοποιείτε βιοψίες διαμέτρου μικρότερης των 2 mm. Τοποθετήστε αμέσως το δείγμα βιοψίας μέσα σε 1,0 ml STM, καλύψτε το καπάκι του σωληναρίου συλλογής με Parafilm για να αποτρέψετε την απόσπαση του καπακιού και φυλάξτε στην κατάψυξη στους –20°C. Αποστείλετε τα δείγματα βιοψίας στους 2–30°C για παράδοση εντός μίας ημέρας στο εργαστήριο δοκιμασίας.

Στο εργαστήριο δοκιμασίας, φυλάσσετε στους –20°C μέχρι την επεξεργασία. Όταν αφαιρέσετε τα δείγματα από τον καταψύκτη για εξέταση, αντικαταστήστε αμέσως τα καπάκια με βιδωτά πώματα σωληναρίου συλλογής δείγματος.

Τραχηλικά δείγματα σε διάλυμα PreservCyt

Σημαντικό: Μη συλλέξετε τραχηλικό δείγμα PreservCyt για προετοιμασία δείγματος με το kit QIASymphony DSP HPV Media εάν είναι παρούσες υψηλές συγκεντρώσεις αντιμυκητιακής κρέμας, κολπικής λιπαντικής γέλης, ή αίματος.

Σημαντικό: Μη συλλέξετε τραχηλικό δείγμα PreservCyt για προετοιμασία δείγματος με το kit QIASymphony DSP AXpH DNA σε περίπτωση παρουσίας αντισυλληπτικής γέλης.

Συλλέξτε τα δείγματα με το συνηθισμένο τρόπο και προετοιμάστε τις αντικειμενοφόρους δοκιμασίας ThinPrep® Pap σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται από τον κατασκευαστή.

Οι απαιτήσεις όγκου δείγματος βασίζονται στη μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων, ως εξής:

Μετά τη συλλογή, φυλάξτε τα δείγματα PreservCyt για έως 3 μήνες στους 2–30°C πριν την προετοιμασία των δειγμάτων για τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Τα δείγματα PreservCyt δεν μπορούν να καταψυχθούν.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων είναι διαθέσιμες οι ακόλουθες μέθοδοι:

- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος με χρήση του QIAasymphony SP και του kit QIAasymphony DSP HPV Media
Το αποτέλεσμα είναι ένα εκχύλισμα δειγμάτων (που περιέχει μαγνητικά σωματίδια, STM και DNR) που είναι έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα αποδιάταξης της δοκιμασίας.
- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος με χρήση του QIAasymphony SP και του kit QIAasymphony DSP AXpH DNA
Το αποτέλεσμα είναι ένα έκλουσμα DNA έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα αποδιάταξης της δοκιμασίας.
- Χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit *digene* HC2 Sample Conversion. Το αποτέλεσμα της χειροκίνητης προετοιμασίας των δειγμάτων είναι ένα αποδιαταγμένο δείγμα έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας.

Οι απαιτήσεις όγκου δείγματος βασίζονται στη μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων, ως εξής:

- Η αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIAasymphony DSP HPV Media απαιτεί 3 ml δείγματος
- Η αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIAasymphony DSP AXpH DNA απαιτεί 4 ml δείγματος
- Η χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit *digene* HC2 Sample Conversion απαιτεί τουλάχιστον 4 ml δείγματος

Δείγματα με λιγότερο από τον απαιτούμενο όγκο δειγμάτων αφού προετοιμαστεί το τεστ Παπανικολάου δεν περιέχουν αρκετό υλικό και θα μπορούσαν να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Τραχηλικά δείγματα σε υγρό διατήρησης SurePath

Σημαντικό: Μη συλλέγετε ένα τραχηλικό δείγμα SurePath για προετοιμασία δείγματος με το κιτ QIASymphony DSP HPV Media σε περίπτωση παρουσίας αντισυλληπτικής γέλης, αντιμυκητιακής κρέμας ή αντιφλεγμονώδους κρέμας.

Συλλέξτε δείγματα στο υγρό διατήρησης SurePath σύμφωνα με τις ισχύουσες οδηγίες χρήσης.

Η προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε πριν την έναρξη της κυτταρολογικής επεξεργασίας είτε μετά την ολοκλήρωση της κυτταρολογικής επεξεργασίας.

Εάν πραγματοποιείται πριν την έναρξη της κυτταρολογικής επεξεργασίας, χρησιμοποιήστε ένα δείγμα από το αρχικό δείγμα SurePath που δεν έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με χρήση οποιασδήποτε άλλης διαγνωστικής μεθόδου, συμπεριλαμβανομένου του συστήματος BD PrepMate® και του επεξεργαστή αντικειμενοφόρων BD PrepStain®. Στις παρούσες οδηγίες χρήσης, αυτά τα δείγματα αναφέρονται ως «δείγματα SurePath» για να αποτραπεί η σύγχυση.

Εάν πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της κυτταρολογικής επεξεργασίας, χρησιμοποιήστε ένα δείγμα από το υπολειπόμενο σφαιρίδιο κυττάρων μετά τη διαβάθμιση αφού ένα δείγμα SurePath έχει προετοιμαστεί σύμφωνα με τις κατάλληλες οδηγίες για το σύστημα BD PrepMate και τον επεξεργαστή αντικειμενοφόρων BD PrepStain. Στις παρούσες οδηγίες χρήσης, αυτά τα δείγματα αναφέρονται ως «δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath» για να αποτραπεί η σύγχυση.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων είναι διαθέσιμες οι ακόλουθες μέθοδοι:

- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του QIASymphony SP και του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.

Το αποτέλεσμα είναι ένα αποδιαταγμένο εκχύλισμα δειγμάτων (που περιέχει μαγνητικά σωματίδια, STM και DNR) που είναι έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας.

- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του QIASymphony SP και του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.

Το αποτέλεσμα είναι ένα αποδιαταγμένο εκχύλισμα δειγμάτων (που περιέχει μαγνητικά σωματίδια, STM και DNR) που είναι έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας.

- Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath.

Το αποτέλεσμα της χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος είναι ένα αποδιαταγμένο δείγμα έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας.

Οι απαιτήσεις όγκου δείγματος βασίζονται στη μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων, ως εξής:

- Η αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media απαιτεί 950 μl
- Η χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων απαιτεί 2,8 ml δείγματος σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

Δείγματα με λιγότερο από τον απαιτούμενο όγκο δείγματος θα μπορούσαν να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath

Μετά τη συλλογή, φυλάξτε τα δείγματα SurePath για έως 4 εβδομάδες στους 5–25°C πριν την προετοιμασία δείγματος με χρήση του QIASymphony SP και του kit QIASymphony DSP HPV Media. Το δείγμα SurePath που χρησιμοποιείται δεν πρέπει να έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με χρήση οποιασδήποτε άλλης διαγνωστικής μεθόδου, συμπεριλαμβανομένου του BD PrepMate και του επεξεργαστή αντικειμενοφόρων BD PrepStain. Η αυτοματοποιημένη επεξεργασία δείγματος απαιτεί 950 μl του δείγματος SurePath.

Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

Σημαντικό: Αμέσως μετά τη προετοιμασία των αντικειμενοφόρων SurePath Pap, μεταγγίστε με πιπέτα 2,0 ml υγρού διατήρησης SurePath στο σωληνάριο φυγοκέντρισης που περιέχει το σφαιρίδιο κυττάρων μετά τη διαβάθμιση. Αυτό διατηρεί την ακεραιότητα του σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση για τη διενέργεια της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Το σφαιρίδιο κυττάρων μετά τη διαβάθμιση με το υγρό διατήρησης SurePath μπορεί να φυλαχθεί για έως 4 εβδομάδες στους 5–25°C, πριν την προετοιμασία δειγμάτων για τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Η αυτοματοποιημένη επεξεργασία δείγματος απαιτεί 950 μl του δείγματος σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath.

Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

Σημαντικό: Αμέσως μετά τη προετοιμασία των αντικειμενοφόρων SurePath Pap, μεταγγίστε με πιπέτα 2,0 ml υγρού διατήρησης SurePath στο σωληνάριο φυγοκέντρησης που περιέχει το υπολειπόμενο σφαιρίδιο κυττάρων. Αυτό διατηρεί την ακεραιότητα του σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση για τη διενέργεια της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Το σφαιρίδιο κυττάρων μετά τη διαβάθμιση με το υγρό διατήρησης SurePath μπορεί να φυλαχθεί για έως 4 εβδομάδες στους 2-30°C, πριν την προετοιμασία δειγμάτων για τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Τα δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath προετοιμάζονται όπως καθορίζεται στις παρούσες οδηγίες χρήσης. Το αποτέλεσμα της χειροκίνητης προετοιμασίας των δειγμάτων είναι ένα αποδιαταγμένο δείγμα έτοιμο για να προχωρήσει στο βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας.

.

Διαδικασία

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Για χειροκίνητες εξετάσεις, περιμένετε τουλάχιστον 60 λεπτά προκειμένου το Microplate Heater I να εξισορροπήσει στους $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ από μια ψυχρή εκκίνηση. Η μη τήρηση αυτού του διαστήματος προθέρμανσης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την τήξη του μικροπλακιδίου υβριδισμού. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) για πρόσθετες οδηγίες.
- Εάν χρησιμοποιείται υδατόλουτρο κατά τη διάρκεια των βημάτων αποδιάταξης και υβριδισμού, βεβαιωθείτε ότι το υδατόλουτρο βρίσκεται στους 65°C και η στάθμη του νερού είναι αρκετή για την εμβύθιση ολόκληρου του όγκου δείγματος στο σωληνάριο.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Αφαιρέστε τα δείγματα και όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια από το ψυγείο πριν την έναρξη της δοκιμασίας. Αφήστε τα να φθάσουν τους $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ για 15–30 λεπτά. Προετοιμάστε τα δείγματα PreservCyt και SurePath πριν την εξισορρόπηση οποιωνδήποτε προηγούμενων αποδιαταγμένων δειγμάτων και αντιδραστηρίων σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε περίπτωση συνδυασμού των έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων για μια εκτέλεση RCS πολλαπλών πλακιδίων, αναμίξτε πλήρως τις μεμονωμένες φιάλες και στη συνέχεια συνδυάστε τον κατάλληλο όγκο αντιδραστηρίου σε ένα καθαρό, αναλώσιμο, κωνικό σωληνάριο πολυπροπυλενίου.
- Για χειροκίνητες εξετάσεις, τα αντιδραστήρια ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και μίγματος ανιχνευτών προετοιμάζονται κατά τη διάρκεια ειδικών βημάτων της εξέτασης. Για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS, όλα τα αντιδραστήρια προετοιμάζονται πριν από την έναρξη της εκτέλεσης RCS και τοποθετούνται στην πλατφόρμα RCS.
- Προετοιμάστε τα DNR και DNR2, όπως αρμόζει, πριν την προετοιμασία άλλων αντιδραστηρίων.
- Απορρίψτε όλα τα προετοιμασμένα αντιδραστήρια (εκτός εάν καθορίζεται διαφορετικά) και τα κλάσματα αντιδραστηρίων στο τέλος της δοκιμασίας.
- Χρησιμοποιήστε τους Πίνακες 1–5, παρακάτω, για να προσδιορίσετε τον όγκο που απαιτείται για κάθε αντιδραστήριο με βάση τον αριθμό των δοκιμασιών/μικροπλακιδίων και τη μέθοδο εξέτασης. Οι όγκοι για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS περιλαμβάνουν τον κενό όγκο αντιδραστηρίων που απαιτείται από το όργανο.

Πίνακας 1. Απαιτούμενοι όγκοι προετοιμασμένων και έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων για χειροκίνητες εξετάσεις δειγμάτων STM και χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

Αριθμός εξετάσεων/ταινιών	Μίγμα ανιχνευτών	Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 λίτρο	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 λίτρο	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 λίτρο	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 λίτρο	12 ml	12 ml

Πίνακας 2. Απαιτούμενοι όγκοι προετοιμασμένων και έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων για αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις δειγμάτων STM, χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath, και δειγμάτων SurePath και σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath προετοιμασμένων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media

Αριθμός μικροπλακιδίων	Μίγμα ανιχνευτών	Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 λίτρα	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 λίτρα	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 λίτρα	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 λίτρα	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 λίτρα	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 λίτρα	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 λίτρα	34 ml	34 ml

Πίνακας 3. Απαιτούμενοι όγκοι προετοιμασμένων και έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων για αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις δειγμάτων PreservCyt προετοιμασμένων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media

Αριθμός μικροπλακιδίων	DNR	Μίγμα ανιχνευτών	Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 λίτρα	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 λίτρα	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 λίτρα	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 λίτρα	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 λίτρα	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 λίτρα	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 λίτρα	34 ml	34 ml

Πίνακας 4. Απαιτούμενοι όγκοι προετοιμασμένων και έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων για χειροκίνητες εξετάσεις δειγμάτων PreservCyt προετοιμασμένων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Αριθμός εξετάσεων/ταινιών				Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης		
	DNR	DNR2	Μίγμα ανιχνευτών		DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 λίτρο	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 λίτρο	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 λίτρο	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 λίτρο	12 ml	12 ml

Πίνακας 5. Απαιτούμενοι όγκοι προετοιμασμένων και έτοιμων για χρήση αντιδραστηρίων για αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις δειγμάτων PreservCyt προετοιμασμένων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Αριθμός μικροπλακιδίων				Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης		
	DNR	DNR2	Μίγμα ανιχνευτών		DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 λίτρα	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 λίτρα	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 λίτρα	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 λίτρα	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 λίτρα	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 λίτρα	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 λίτρα	34 ml	34 ml

Αντιδραστήριο αποδιάταξης

Σημαντικό : Το kit 1 πλακιδίου παρέχεται με 50 ml αντιδραστηρίου αποδιάταξης και το kit 4 πλακιδίων παρέχεται με 2 x 100 ml αντιδραστηρίου αποδιάταξης. Βεβαιωθείτε ότι προετοιμάζετε το DNR σύμφωνα με τον όγκο που παρέχεται με το αντίστοιχο kit.

Notes:

- Αφού προετοιμαστεί, το DNR παραμένει σταθερό για 3 μήνες στους 2–8°C.
- Εάν το χρώμα ξεθωριάσει, προσθέστε 3 επιπλέον σταγόνες χρωματικού δείκτη και αναμίξτε πλήρως πριν τη χρήση.

Φιάλη 50 ml

1. Προσθέστε 5 σταγόνες χρωματικού δείκτη στη φιάλη 50 ml του αντιδραστηρίου αποδιάταξης.

2. Αναμίξτε πλήρως.
Το DNR πρέπει να έχει ομοιόμορφο, σκούρο μοβ χρώμα.
3. Επισημάνετε το DNR με τη νέα ημερομηνία λήξης.

Φιάλη 100 ml

1. Προσθέστε 10 σταγόνες χρωματικού δείκτη στη φιάλη 100 ml του αντιδραστηρίου αποδιάταξης.
2. Αναμίξτε πλήρως.
Το DNR πρέπει να έχει ομοιόμορφο, σκούρο μοβ χρώμα.
3. Επισημάνετε το DNR με τη νέα ημερομηνία λήξης..

Αντιδραστήριο αποδιάταξης 2

Σημείωση: Το DNR2 απαιτείται μόνο για εξέταση δειγμάτων PreservCyt που έχουν προετοιμαστεί με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

1. Επισημάνετε ένα καθαρό, αναλώσιμο, κωνικό σωληνάριο πολυπροπυλενίου ως «DNR2».
2. Προσθέστε τον απαιτούμενο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος N2 (βλ. Πίνακα 6, παρακάτω) στο επισημασμένο δοχείο.

Πίνακας 6. Προετοιμασία του DNR2

Απαιτούμενος όγκος DNR2	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος N2	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος D2	Χρωματικός δείκτης
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 σταγόνες
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1–2 σταγόνες
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 σταγόνες
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1–2 σταγόνες
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 σταγόνες
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1–2 σταγόνες
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 σταγόνες
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1–2 σταγόνες
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 σταγόνες
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1–2 σταγόνες

3. Προσθέστε τον απαιτούμενο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος D2 (βλ. Πίνακα 6, παραπάνω) στο επισημασμένο δοχείο

4. Προσθέστε την απαιτούμενη ποσότητα χρωματικού δείκτη (βλ. Πίνακα 6, παραπάνω) στο επισημασμένο δοχείο.

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε το χρωματικό δείκτη που παρέχεται με το κιτ δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

5. Στροβιλίστε για όχι λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα.

Σημείωση: Αφού προετοιμαστεί, το DNR2 παραμένει σταθερό για 8 ώρες στους 15–30°C

Μίγμα ανιχνευτών

- Για χειροκίνητες εξετάσεις, προετοιμάστε το μίγμα ανιχνευτών κατά τη διάρκεια της επώασης αποδιάταξης δειγμάτων (όπως αρμόζει, βλ. «Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM», σελ. 52, ή «Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και εκλουσμάτων DNA για χειροκίνητες εξετάσεις», σελ. 49).
- Δώστε ιδιαίτερως μεγάλη προσοχή για να αποφύγετε τη μόλυνση με RNάσες. Κατά το πιπετάρισμα του ανιχνευτή, χρησιμοποιήστε ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολύματος.
- Το αραιωτικό ανιχνευτή είναι ιξώδες. Βεβαιωθείτε ότι επιτυγχάνεται εμφανής στρόβιλος κατά την προετοιμασία του μίγματος ανιχνευτών, καθώς η ατελής ανάμιξη μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο σήμα.
- Σε περίπτωση συνδυασμού πολλαπλών φιαλιδίων ανιχνευτή για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS, συγκεντρώστε τον ανιχνευτή σε ένα φιαλίδιο και αναμίξτε με πιπετάρισμα.

1. Για να αποφύγετε την παγίδευση του ανιχνευτή στο καπάκι του φιαλιδίου, φυγοκεντρίστε κάθε φιαλίδιο ανιχνευτή σύντομα για να φέρετε το υγρό στον πάτο του φιαλιδίου.
2. Κτυπήστε απαλά το φιαλίδιο για να αναμίξετε.
3. Προσδιορίστε την απαιτούμενη ποσότητα μίγματος ανιχνευτών:

Σύσταση: Παρασκευάστε επιπλέον μίγμα ανιχνευτών λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο που μπορεί να χαθεί στα ρύγχη της πιπέτας ή στην πλευρά του φιαλιδίου. Οι όγκοι που καθορίζονται στους Πίνακες 1–5, παραπάνω, περιλαμβάνουν το συνιστώμενο επιπλέον όγκο.

Χειροκίνητες εξετάσεις: Προσδιορίστε τους όγκους που απαιτούνται για αραιώση 1:25 του ανιχνευτή στο αραιωτικό ανιχνευτή για την προετοιμασία του μίγματος ανιχνευτών (25 μl/εξέταση). Οι όγκοι παρέχονται στον **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, σελίδα **Error! Bookmark not defined.**, και στον **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, σελίδα **Error! Bookmark not defined.**, όπως αρμόζει.

Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS: Χρησιμοποιήστε τους όγκους που καθορίζονται στον **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, σελ. **Error!**

Bookmark not defined., Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden., σελ. **Error! Bookmark not defined.,** ή **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.,** σελ. **Error! Bookmark not defined.,** όπως αρμόζει.

4. Επισημάνετε ένα νέο, αναλώσιμο δοχείο ως «Μίγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου». Ανάλογα με τον αριθμό των εξετάσεων, συνιστάται ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 5 ml ή 15 ml με πώμα snap-cap, στρογγυλού πυθμένα.
5. Προσθέστε την απαιτούμενη ποσότητα αραιωτικού ανιχνευτή (βλ. Πίνακα 7, παρακάτω) στο επισημασμένο σωληνάριο.
6. Μεταγγίστε με πιπέτα την απαιτούμενη ποσότητα του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου στο αραιωτικό ανιχνευτή (βλ. Πίνακα 7, παρακάτω) τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέτας επάνω στο εσωτερικό τοίχωμα του σωληναρίου ακριβώς πάνω από το μηνίσκο και αποβάλλοντας τα περιεχόμενα.

Σημαντικό: Μην εμβυθίζετε το ρύγχος μέσα στο αραιωτικό ανιχνευτή.

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μίγματος ανιχνευτών

Απαιτούμενος όγκος μίγματος ανιχνευτών	Όγκος αραιωτικού ανιχνευτή	Όγκος ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Στροβιλίστε για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα για να αναμίξετε πλήρως.
Πρέπει να δημιουργηθεί εμφανής στρόβιλος.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

- Για χειροκίνητες εξετάσεις, προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης κατά τη διάρκεια του βήματος δέσμευσης υβριδίων (βλ. «Δέσμευση υβριδίου», σελ. 60).

- Για ελαχιστοποίηση της έκθεσης, προσθέστε νερό στο συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης κατά την προετοιμασία.
 - Για τη χειροκίνητη μέθοδο έκπλυσης μικροπλακιδίων, προετοιμάστε 3 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στη συσκευή έκπλυσης.
Σύσταση: Κάθε 3 μήνες, καθαρίζετε τη συσκευή έκπλυσης και τη σωλήνωση με 0,5% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και ξεπλένετε σχολαστικά με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό για να αποτρέψετε την πιθανή μόλυνση από αλκαλική φωσφατάση παρούσα σε βακτήρια και μούχλες.
 - Για το Automated Plate Washer, προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και φυλάξτε το σε καλυμμένο δοχείο, ή προετοιμάστε 1 λίτρο και τοποθετήστε το στο δοχείο έκπλυσης του Automated Plate Washer.
 - Για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS, προετοιμάστε την καθορισμένη ποσότητα (όπως αρμόζει, βλ. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, σελ. **Error! Bookmark not defined.**, **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, σελ. **Error! Bookmark not defined.**, ή **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, σελ. **Error! Bookmark not defined.**) στη φιάλη έκπλυσης RCS.
1. Αναμίξτε καλά το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και προσθέστε τον απαιτούμενο όγκο συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (βλ. Πίνακα 8, παρακάτω) στο καθορισμένο δοχείο.
 2. Προσθέστε τον απαιτούμενο όγκο απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού (βλ. Πίνακα 8, παρακάτω) στο καθορισμένο δοχείο.

Πίνακας 8. Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης

Απαιτούμενος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης	Όγκος συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης	Όγκος απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού
1 λίτρο	33.3 ml	966.7 ml
2 λίτρα	66.6 ml	1933.4 ml
3 λίτρα	100.0 ml	2900.0 ml
6 λίτρα	200.0 ml	5800.0 ml

3. Τοποθετήστε ένα καθαρό χαρτομάντιλο χωρίς χνούδι επάνω από οποιαδήποτε ανοίγματα του δοχείου και αναμίξτε καλά.
4. Σφραγίστε το δοχείο για να αποτρέψετε τη μόλυνση ή την εξάτμιση, ή τοποθετήστε το στο αντίστοιχο όργανο, όπως αρμόζει.
5. Επισημάνετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης με τη νέα ημερομηνία λήξης.

Σημείωση: Μετά την προετοιμασία του, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει σταθερό για 3 μήνες σε θερμοκρασία 2–30°C.

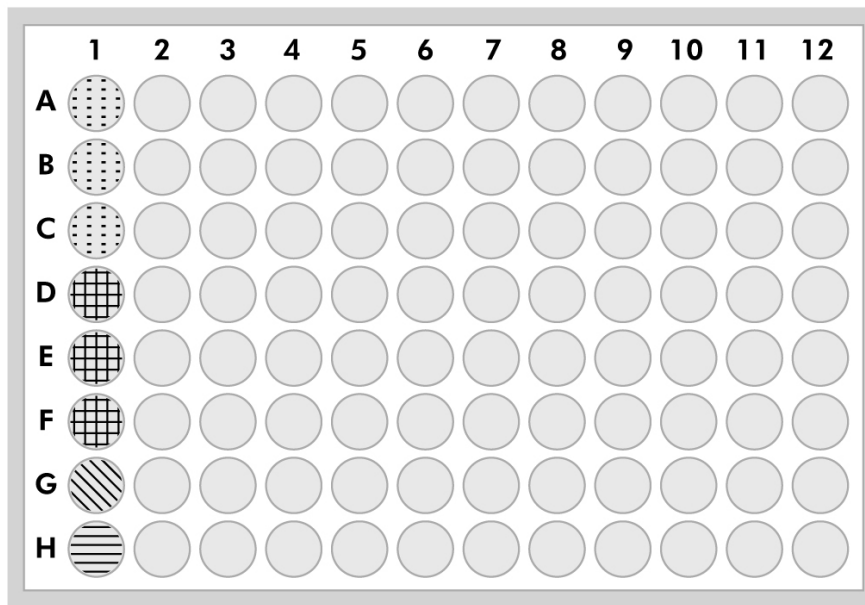
Δημιουργία της διάταξης πλακιδίων

1. Δημιουργήστε μια διάταξη πλακιδίων χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* με τα πρωτόκολλα δοκιμασίας *digene* για HPV.

Ανατρέξτε στο αντίστοιχο εγχειρίδιο χρήστη του λογισμικού για οδηγίες σχετικά με τη δημιουργία μιας διάταξης πλακιδίων με τις σωστές θέσεις για τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα

Σημειώσεις:

- Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα εκτελούνται σε διάταξη στηλών 8 πηγαδιών.
- Εξετάστε τους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου ποιότητας στις ακόλουθες θέσεις στο μικροπλακίδιο (βλ. Εικόνα 1, σελ. 43):
 - Αντίγραφα αρνητικού βαθμονομητή (NC) στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων A1, B1, C1
 - Αντίγραφα βαθμονομητή HPV υψηλού κινδύνου (HRC) στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων D1, E1, F1
 - Ορός ελέγχου ποιότητας HPV χαμηλού κινδύνου (QC1-LR) στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου G1
 - Ορός ελέγχου ποιότητας HPV υψηλού κινδύνου (QC2-HR) στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου H1



Εικόνα 1. Θέση των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου ποιότητας και των δειγμάτων στο μικροπλακίδιο.

Σημαντικό: Κατά την εκτέλεση εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS, χρησιμοποιήστε πρωτόκολλα ειδικά για RCS για τη δημιουργία της διάταξης μικροπλακιδίων και την παραγωγή των αποτελεσμάτων. Οι καθορισμένες παράμετροι των ειδικών για RCS πρωτοκόλλων δοκιμασίας είναι διαφορετικές από εκείνες για τα πρωτόκολλα δοκιμασίας χειροκίνητων εξετάσεων (βλ. «Υπολογισμός της τιμής Cutoff», σελ. 72).

2. Τοποθετήστε τους βαθμονομητές, του ορούς ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα προς εξέταση σε ένα στατώ σωληναρίων συλλογής δειγμάτων ή σε ένα στατώ δειγμάτων με τη σειρά με την οποία θα εξεταστούν.

Σημαντικό: Κατά την εκτέλεση εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS, είναι ιδιαίτερα σημαντικό η διάταξη των πλακιδίων να αντιστοιχεί με τα σωστά δείγματα που εξετάζονται προκειμένου να αποφευχθεί η αναφορά ανακριβών αποτελεσμάτων δειγμάτων. Για κάθε στατώ δειγμάτων και καπάκι που χρησιμοποιείται, επιβεβαιώστε ότι οι σειριακοί αριθμοί ταιριάζουν και επισημάνετε, όπως αρμόζει, κάθε στατώ δειγμάτων και καπάκι σύμφωνα με

τη σειρά που πρόκειται να εξεταστεί στο RCS. Χρησιμοποιήστε μαρκαδόρο και ετικέτα που δεν θα ξεπλυθούν στο υδατόλουτρο 65°C.


Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα PreservCyt και SurePath απαιτούν προετοιμασία δείγματος πριν την εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Ανάλογα με τον τύπο της εκτελούμενης προετοιμασίας των δειγμάτων, τα προετοιμασμένα δείγματα είναι έτοιμα για διαφορετικά βήματα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι προετοιμασίας δείγματος είναι οι εξής:

- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.
- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath και σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media
- Αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP AXpH DNA.
- Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt
- Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath


Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.

 Refer to *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)* for instructions to prepare PreservCyt samples using the QIASymphony DSP HPV Media Kit.


Σημαντικό: Τα εγχυλίσματα δείγματος που παράγονται ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media μπορούν να εξεταστούν μόνο με χρήση του RCS. Η χειροκίνητη διεξαγωγή της δοκιμασίας με εγχυλίσματα δείγματος δεν έχει επικυρωθεί.

Το αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media είναι εγχυλίσματα δείγματος σε ένα μικροπλακίδιο υβριδισμού με την πρώτη στήλη κενή. Τα εγχυλίσματα δείγματος περιέχουν μαγνητικά σωματίδια, STM και DNR και είναι έτοιμα για αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις στο βήμα αποδιάταξης. Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα εγχυλίσματα δείγματος αποδιάσσονται ταυτόχρονα στο μικροπλακίδιο υβριδισμού κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων με το RCS

εξετάσεων (βλ. «Αποδιάταξη και υβριδισμός δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIASymphony SP», σελ. 49).


 Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIASymphony SP, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System — εκτέλεση δοκιμασιών *digene* HC2 DNA με χρήση δειγμάτων επεξεργασμένων στο QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) για οδηγίες σχετικά με τις πλήρεις εξετάσεις.

Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη-διαβάθμιση SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media


 Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης (εγχειρίδιο) kit QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use*) για οδηγίες σχετικά με την προετοιμασία των δειγμάτων SurePath και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media.

Σημαντικό: Τα εγχυλίσματα δείγματος που παράγονται ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media μπορούν να εξεταστούν μόνο με χρήση του RCS. Η χειροκίνητη διεξαγωγή της δοκιμασίας με εγχυλίσματα δείγματος δεν έχει επικυρωθεί.

Το αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων SurePath και των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media είναι βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας και εγχυλίσματα δειγμάτων σε ένα μικροπλακίδιο υβριδισμού έτοιμο για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS στο βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας.


 Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIASymphony SP, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System — εκτέλεση δοκιμασιών *digene* HC2 DNA με χρήση δειγμάτων επεξεργασμένων στο QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) για οδηγίες σχετικά με τις πλήρεις εξετάσεις.

Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

 Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο kit QIAasymphony DSP AXpH DNA (*QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) για οδηγίες σχετικά με την προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt.

Το αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIAasymphony DSP AXpH DNA είναι εκλούσματα DNA σε ένα μικροπλακίδιο υβριδισμού με την πρώτη στήλη κενή. Τα εκλούσματα DNA είναι έτοιμα για το βήμα αποδιάταξης της δοκιμασίας. Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα εκλούσματα DNA αποδιάσσονται ταυτόχρονα στο μικροπλακίδιο υβριδισμού (βλ. «Αποδιάταξη και υβριδισμός δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIAasymphony SP», σελ. 49).

Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt

 Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του kit *digene* HC2 Sample Conversion για χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt.

Η χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit *digene* HC2 Sample Conversion οδηγεί σε δείγματα έτοιμα για το βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας. Προετοιμάστε τους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου ποιότητας ξεχωριστά (βλ. «Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM», σελ. 52).

Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

Η χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath οδηγεί σε δείγματα έτοιμα για το βήμα υβριδισμού της δοκιμασίας. Προετοιμάστε τους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου ποιότητας ξεχωριστά (βλ. «**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**», σελίδα **Error! Bookmark not defined.**).

Σημαντικό: Εάν το δείγμα σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath φαίνεται ότι περιέχει λιγότερο από 1 ml, το σφαιρίδιο κυττάρων μετά τη διαβάθμιση δεν είναι κατάλληλο για εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, καθώς δεν προστέθηκε υγρό διατήρησης SurePath μετά την κυτταρολογική εξέταση.

1. Εξισορροπήστε τα σφαιρίδια κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath σε θερμοκρασία δωματίου και επιβεβαιώστε ότι ο παρατηρούμενος όγκος υγρού ισούται περίπου με 2,8 ml.

2. Φυγοκεντρίστε τα σφαιρίδια κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath σε στροφέα ταλαντευόμενου κάδου στα $800 \pm 15 \times g$ για 10 ± 1 λεπτά.
3. Αφαιρέστε τα σωληνάκια από τη φυγόκεντρο.
4. Αμέσως μετά τη φυγοκέντριση, μεταγγίστε με πιπέτα προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και στυπώστε απαλά κάθε σωληνάριο περίπου 3 φορές επάνω σε μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι για να αφαιρέσετε το περίσσιο υγρό. Παρατηρήστε το σφαιρίδιο σε κάθε σωληνάριο.
Σημαντικό: Μην αφήσετε τα σφαιρίδια κυττάρων να ολισθήσουν προς τα κάτω στο σωληνάριο κατά τη στύπωση.
5. Τοποθετήστε τα σωληνάκια στο στατώ
6. Προσθέστε 200 μl STM σε κάθε σφαιρίδιο χρησιμοποιώντας επαναληπτική πιπέτα ή μονοκάναλη πιπέτα.
7. Επανεναυρώστε κάθε σφαιρίδιο με στροβιλισμό κάθε σωληναρίου ξεχωριστά για 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
Εάν η επανεναύρωση του σφαιριδίου είναι δύσκολη, στροβιλίστε για επιπλέον 5–30 δευτερόλεπτα ή μέχρι το σφαιρίδιο να επιπλεύσει μακριά από τον πάτο του σωληναρίου και να φαίνεται ότι διαλύεται.
Σημείωση: Τα σωληνάκια μπορούν να αναμιχθούν χωρίς πώματα.
8. Μεταγγίστε με πιπέτα 100 μl DNR μέσα σε κάθε δείγμα SurePath χρησιμοποιώντας επαναληπτική πιπέτα ή μονοκάναλη πιπέτα.
Σημαντικό: Βεβαιωθείτε ότι δεν αγγίζετε τις πλευρές του σωληναρίου, διότι θα μπορούσε να προκληθεί διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων.
9. Αναμίξτε πλήρως κάθε σωληνάριο στροβιλίζοντας ξεχωριστά, σε υψηλή ταχύτητα, για 5 δευτερόλεπτα.
Σημείωση: Τα σωληνάκια μπορούν να αναμιχθούν χωρίς πώματα.
10. Επισημάνετε σωληνάκια *digene* HC2 Sample Conversion ή κωνικά σωληνάκια των 15 ml με το αντίστοιχο αναγνωριστικό και τύπο δείγματος (για παράδειγμα, «SP» για ένα δείγμα SurePath) και τοποθετήστε τα σωληνάκια σε ένα στατώ σωληναρίων.
Σημείωση: Για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS, πρέπει να χρησιμοποιηθούν σωληνάκια *digene* HC2 Sample Conversion.
11. Μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο στο αντίστοιχο κωνικό σωληνάριο των 15 ml χρησιμοποιώντας μια αναλώσιμη πιπέτα μεταφοράς των 7 ml με τυπικό ρύγχος ή ισοδύναμη.
12. Πωματίστε τα κωνικά σωληνάκια και τοποθετήστε τα σε ένα στατώ σωληναρίων.

13. Επλώστε τα σωληνάρια σε υδατόλουτρο $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 90 ± 5 λεπτά.

Σημείωση: Αυτός ο χρόνος επώασης είναι μεγαλύτερος από τον απαιτούμενο για άλλους εγκεκριμένους τύπους δειγμάτων.

Εάν η εξέταση πρόκειται να ολοκληρωθεί την ίδια ημέρα, αποδιατάξτε τους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου ποιότητας (βλ. «Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM», σελ. 52).

14. Αφαιρέστε το στατώ σωληναρίων από το υδατόλουτρο μετά την επώαση.

Εάν χρησιμοποιείτε στατώ δειγμάτων, μην το αφήσετε να κρυώσει προτού αφαιρέσετε το καπάκι του στατώ. Συνεχίστε αμέσως με την εξέταση ή αφαιρέστε το καπάκι του στατώ και τη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal.

Σημείωση: Εάν το στατώ δειγμάτων κρυώσει, τα σωληνάρια μπορεί να κολλήσουν στο καπάκι του στατώ και ακολούθως να χυθούν.

Τα προετοιμασμένα δείγματα SurePath μπορούν να:

- Εξεταστούν αμέσως (προχωρήστε στο «Υβριδισμός των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath», σελίδα 55)
- Αποθηκευτούν (βλέπε «Προαιρετικό σημείο διακοπής των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath», σελίδα 54)


Αποδιάταξη και υβριδισμός δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIASymphony SP

Το αποτέλεσμα των προετοιμασμένων δειγμάτων στο QIASymphony SP είναι ένα μικροπλακίδιο υβριδισμού που περιέχει, τουλάχιστον, τα προετοιμασμένα δείγματα.

Εάν δείγματα PreservCyt προετοιμάστηκαν με χρήση του QIASymphony SP, η πρώτη στήλη του μικροπλακιδίου υβριδισμού είναι κενή. Τα περιεχόμενα του μικροπλακιδίου είναι έτοιμα για το βήμα αποδιάταξης της δοκιμασίας. Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου ποιότητας προστίθενται στο μικροπλακίδιο υβριδισμού είτε χειροκίνητα είτε κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων, και στη συνέχεια εκτελείται το βήμα αποδιάταξης.

Εάν τα δείγματα SurePath ή τα δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath προετοιμάστηκαν με χρήση του QIASymphony SP, το πλακίδιο περιέχει τα προετοιμασμένα δείγματα με τους αποδιαταγμένους βαθμονομητές και ορούς ελέγχου ποιότητας διανεμημένους στην πρώτη στήλη του μικροπλακιδίου υβριδισμού. Τα περιεχόμενα του μικροπλακιδίου είναι έτοιμα για την αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση στο βήμα αποδιάταξης της δοκιμασίας.

Σημαντικό: Τα εκχυλίσματα δειγμάτων που παράγονται ως αποτέλεσμα της προετοιμασίας δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media μπορούν να εξεταστούν μόνο με χρήση του RCS. Η χειροκίνητη διεξαγωγή της δοκιμασίας με εκχυλίσματα δείγματος δεν έχει επικυρωθεί.

 Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων δειγμάτων προετοιμασμένων με χρήση του QIASymphony SP, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System — εκτέλεση δοκιμασιών *digene* HC2 DNA με χρήση δειγμάτων επεξεργασμένων στο QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) για οδηγίες σχετικά με τις πλήρεις εξετάσεις.

Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και εκλουσμάτων DNA για χειροκίνητες εξετάσεις

- Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για τη χειροκίνητη εξέταση δειγμάτων PreservCyt που έχουν προετοιμαστεί με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA. Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System — εκτέλεση δοκιμασιών *digene* HC2 DNA με χρήση δειγμάτων επεξεργασμένων στο QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing*

digene HC2 DNA Tests Using QIA Symphony SP Processed Samples) για οδηγίες σχετικά με τις πλήρεις εξετάσεις.

- Η αποδιάταξη των βαθμονομητών και των ορών ελέγχου ποιότητας εκτελείται με χρήση DNR, ενώ η αποδιάταξη των εκλουσμάτων DNA εκτελείται με χρήση DNR2.
1. Αναδεύστε σε αναδευτήρα τύπου vortex κάθε βαθμονομητή και ορό ελέγχου ποιότητας για 10 δευτερόλεπτα, στην υψηλότερη ρύθμιση.
 2. Αναστρέψτε κάθε σωληνάριο για να ανακτήσετε υλικό από το πώμα του σωληναρίου.
 3. Αφαιρέστε τα καπάκια από τα σωληνάρια βαθμονομητή και ορού ελέγχου ποιότητας και απορρίψτε τα.
 4. Χρησιμοποιώντας μονοκάναλη πιπέτα, προσθέστε 50 μl του αντίστοιχου βαθμονομητή ή ορού ελέγχου ποιότητας στον πάτο του κενού πηγαδιού μικροπλακιδίου υβριδισμού σύμφωνα με τη δημιουργημένη διάταξη πλακιδίου.

Εφόσον ο βαθμονομητής και οι οροί ελέγχου ποιότητας θα χρησιμοποιηθούν για επιπλέον δοκιμασίες, κλείστε τα σωληνάρια με νέα βιδωτά πώματα για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων, επισημάνετε τα σωληνάρια με τη νέα ημερομηνία λήξης και φυλάξτε τα στους 2–8°C.

Σημείωση: Οι ανοιγμένοι, μη αποδιαταγμένοι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου ποιότητας παραμένουν σταθεροί για 3 μήνες στους 2–8°C.

5. Στροβιλίστε πλήρως τα προετοιμασμένα DNR και DNR2, και διανείμετε σε κλασματικούς όγκους το καθένα σε κατάλληλα επισημασμένο αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων.

Σημαντικό: Βεβαιωθείτε ότι προσθέτετε το σωστό αντιδραστήριο στη σωστή στήλη του μικροπλακιδίου εκλούσματος.

6. Χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα, προσθέστε 25 μl του DNR στην πρώτη στήλη του μικροπλακιδίου υβριδισμού που περιέχει τους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου ποιότητας.
7. Χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα, προσθέστε 25 μl του DNR2 σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού που περιέχει ένα έκλουσμα DNA.
8. Καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού με ένα καπάκι μικροπλακιδίου και ανακινήστε για 30 δευτερόλεπτα στο Rotary Shaker I ρυθμισμένο σε 1.100 ± 100 rpm.
9. Τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στο Microplate Heater I εξισορροπημένο στους $65 \pm 2^\circ\text{C}$, διασφαλίζοντας ότι δεν προκαλείτε πιτσίλισμα. Επώαστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού για 45 ± 5 λεπτά.

Προετοιμάστε το μίγμα ανιχνευτών κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης (βλ. «Μίγμα ανιχνευτών», σελ. 39).

10. Αφαιρέστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού από το Microplate Heater I.

Οι αποδιαταγμένοι βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας και εκλούσματα DNA μπορούν να:

- Φυλαχθούν (βλ. «Προαιρετικό σημείο διακοπής των εκλουσμάτων DNA», σελ. 51)
- Εξεταστούν αμέσως (συνεχίστε στην ενότητα «Υβριδισμός εκλουσμάτων DNA», σελ. 51)

Προαιρετικό σημείο διακοπής των εκλουσμάτων DNA

Τα αποδιαταγμένα εκλούσματα DNA, συμπεριλαμβανομένων των βαθμονομητών και των ορών ελέγχου ποιότητας, καλυμμένα με καπάκι μικροπλακιδίου μπορούν να φυλαχθούν στους 2–8°C για 2 εβδομάδες.

Υβριδισμός εκλουσμάτων DNA

1. Εάν το μικροπλακίδιο υβριδισμού που περιέχει τους αποδιαταγμένους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας και εκλούσματα DNA έχει φυλαχθεί, αφαιρέστε το καπάκι μικροπλακιδίου και αφήστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού να εξισορροπήσει στους 20–25°C.
2. Στροβιλίστε πλήρως το μίγμα ανιχνευτών και διανείμετε σε κλασματικούς όγκους σε αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων.
3. Μεταγγίστε με πιπέτα προσεκτικά 25 μl του μίγματος ανιχνευτών μέσα σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα και νέα ρύγχη για κάθε προσθήκη μίγματος ανιχνευτών.

Αποφύγετε το πιτσίλισμα και το άγγιγμα των πλευρών των πηγαδιών του μικροπλακιδίου υβριδισμού.

4. Καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού με ένα καπάκι μικροπλακιδίου και ανακινήστε για 3 ± 2 λεπτά στο Rotary Shaker I ρυθμισμένο σε 1.100 ± 100 rpm.

Μετά την ανακίνηση, οι βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας και εκλούσματα DNA πρέπει να γίνουν κίτρινα.

Δείγματα που παραμένουν μοβ μπορεί να μην έχουν λάβει τη σωστή ποσότητα μίγματος ανιχνευτών. Προσθέστε επιπλέον 25 μl μίγματος ανιχνευτών στα δείγματα που παραμένουν μοβ και ανακινήστε ξανά. Εάν ένα δείγμα παραμένει μοβ αφού ακολουθήσετε αυτήν τη διαδικασία, επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος.

5. Τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στο Microplate Heater I εξισορροπημένο στους $65 \pm 2^\circ\text{C}$, διασφαλίζοντας ότι δεν προκαλείτε πιτσίλισμα. Επωάστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού για 60 ± 5 λεπτά.

6. Προχωρήστε στην ενότητα «Δέσμευση υβριδίου», σελίδα 60, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Αποδιάταξη και υβριδισμός δειγμάτων STM και χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

- Όταν εξετάζονται χειροκίνητα προετοιμασμένα δείγματα PreservCyt και δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath, το βήμα αποδιάταξης δεν απαιτείται για τα δείγματα. Ωστόσο, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου ποιότητας που απαιτούνται με τη δοκιμασία αποδιατάσσονται σύμφωνα με τις οδηγίες παρακάτω.
- Ορισμένα δείγματα STM μπορεί να περιέχουν αίμα ή άλλο βιολογικό υλικό που μπορεί να αποκρύψει τις χρωματικές μεταβολές κατά την προσθήκη του DNR. Δείγματα που επιδεικνύουν σκούρο χρώμα πριν από την προσθήκη του DNR μπορεί να μη δώσουν σωστή χρωματική αλλαγή σε αυτό το βήμα. Στις περιπτώσεις αυτές, η αποτυχία να επιδειχθεί η σωστή χρωματική αλλαγή δεν θα επηρεάσει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Η σωστή ανάμιξη μπορεί να επαληθευθεί παρατηρώντας τη χρωματική αλλαγή των βαθμονομητών και των ορών ελέγχου ποιότητας.

Αποδιάταξη βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM

- Μην αφαιρέσετε τη συσκευή συλλογής δειγμάτων από το σωληνάριο δείγματος καμία στιγμή.
- Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, είναι ιδιαίτερως σημαντικό όλο το υλικό των δειγμάτων να έρχεται σε επαφή με το DNR. Η ανάμιξη μετά την προσθήκη του DNR αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα.
- Τα δείγματα STM που έχουν αποδιαταχθεί με χρήση της μεθόδου MST Vortexer 2 πρέπει να χρησιμοποιούν τη μέθοδο «Υβριδισμός με χρήση μικροπλακιδίου και του Microplate Heater I» στη σελίδα **Error! Bookmark not defined.** Η μέθοδος «Υβριδισμός με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου» (σελίδα 57) δεν έχει επικυρωθεί με δείγματα STM αποδιαταγμένα με χρήση του MST Vortexer 2.

1. Αφαιρέστε και απορρίψτε τα πώματα από τα σωληνάρια.

Σημαντικό: Θεωρείτε τα πώματα που αφαιρούνται από τα σωληνάρια δειγμάτων STM ως δυνητικά μολυσματικά (βλ. «Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις», σελ. 23, για πρόσθετες πληροφορίες).

2. Μεταγγίστε με πιπέτα τον καθορισμένο όγκο DNR (βλ. Πίνακα 9, παρακάτω) μέσα στα σωληνάρια χρησιμοποιώντας επαναληπτική ή ρυθμιζόμενη πιπέτα.

Βεβαιωθείτε ότι δεν αγγίζετε τις πλευρές των σωληναρίων, διότι θα μπορούσε να προκληθεί διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων.

Σημαντικό: Τα κιτ 1 πλακιδίου και 4 πλακιδίων έχουν διαφορετικούς όγκους για το βαθμονομητή High-Risk HPV. Βεβαιωθείτε ότι προσθέτετε το σωστό όγκο DNR.

Σημείωση: Ο όγκος του DNR που προστίθεται ισοδυναμεί με το ήμισυ του όγκου υγρού στο σωληνάριο.

Πίνακας 9. Προσθήκη DNR

Βαθμονομητής, ορός ελέγχου ποιότητας ή δείγμα STM	Απαιτούμενος όγκος DNR
Αρνητικός βαθμονομητής, 2 ml	1000 µl
Βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου, 1 ml	500 µl
Βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου, 2 ml	1000 µl
Ορός ελέγχου ποιότητας HPV χαμηλού κινδύνου ή HPV υψηλού κινδύνου, 1 ml	500 µl
Δείγμα STM, 1 ml	500 µl

3. Αναμίξτε τα σωληνάρια χρησιμοποιώντας είτε τη μέθοδο MST Vortexer 2 είτε τη χειροκίνητη μέθοδο ανάδευσης μεμονωμένων σωληναρίων.

Μέθοδος MST Vortexer 2

- Καλύψτε τα σωληνάρια με σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal τραβώντας τη μεμβράνη πάνω από τα σωληνάρια στο στατώ σωληναρίων.
- Τοποθετήστε το καπάκι του στατώ πάνω από τα καλυμμένα με μεμβράνη σωληνάρια και ασφαλίστε το στη θέση του με τα 2 πλευρικά κλιπ. Κόψτε τη μεμβράνη με τον κόφτη.
- Μετακινήστε το μοχλό με την κόκκινη λαβή στην ΠΑΝΩ θέση έτσι ώστε να είναι οριζόντιος.
- Τοποθετήστε το στατώ δειγμάτων με ασφάλεια μέσα στους οδηγούς στο MST Vortexer 2 και με τη γωνία με τη μεγαλύτερη εγκοπή του στατώ να βρίσκεται στην εμπρόσθια δεξιά γωνία. Ασφαλίστε το στατώ δειγμάτων μετακινώντας το μοχλό με την κόκκινη λαβή στην «κάτω» θέση, έτσι ώστε να είναι κάθετος.
- Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση ταχύτητας είναι στο 100 (μέγιστη ταχύτητα) και η τροφοδοσία ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ στο MST Vortexer 2.
- Στροβιλίστε τα σωληνάρια για 10 δευτερόλεπτα.
- ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΤΕ την τροφοδοσία στο MST Vortexer 2.
- Αφαιρέστε το στατώ δειγμάτων από το MST Vortexer 2 μετακινώντας το μοχλό με την κόκκινη λαβή στην πάνω θέση.

Χειροκίνητη μέθοδος στροβιλισμού μεμονωμένων σωληναρίων

- Επαναπαματίστε τα σωληνάρια με νέα βιδωτά πώματα σωληναρίων συλλογής δείγματος.
- Αναμίξτε πλήρως κάθε σωληνάριο στροβιλίζοντας ξεχωριστά, σε υψηλή ταχύτητα, για 5 δευτερόλεπτα.

Σημαντικό: Κατά τη διάρκεια της ανάμιξης, πρέπει να παρατηρείται εμφανής στροβιλισμός του υγρού, ο οποίος ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του

σωληναρίου.

- c. Αναστρέψτε κάθε σωληνάριο μία φορά για να πλυθεί το εσωτερικό του σωληναρίου, το καπάκι και το χείλος.
- d. Επιστρέψτε το σωληνάριο στο στατώ.

Το υγρό στο σωληνάριο πρέπει να γίνει μοβ.

4. Επώαστε τα σωληνάκια σε στατώ σε υδατόλουτρο $65 \pm 2^\circ\text{C}$ για 45 ± 5 λεπτά.

Για χειροκίνητες εξετάσεις, προετοιμάστε το μίγμα ανιχνευτών κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης (βλ. «Μίγμα ανιχνευτών», σελ. 39).

5. Αφαιρέστε τα σωληνάκια από το υδατόλουτρο μετά την επώαση.

Εάν χρησιμοποιείτε στατώ δειγμάτων, μην το αφήσετε να κρυώσει προτού αφαιρέσετε το καπάκι του στατώ. Συνεχίστε αμέσως με την εξέταση ή αφαιρέστε το καπάκι του στατώ και τη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal.

Σημείωση: Εάν το στατώ δειγμάτων κρυώσει, τα σωληνάκια μπορεί να κολλήσουν στο καπάκι του στατώ και ακολούθως να χυθούν.

Οι αποδιαταγμένοι βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας και δείγματα STM μπορούν να:

- Αποθηκευτούν (βλέπε «Προαιρετικό σημείο διακοπής των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath», σελίδα 54)
- Εξεταστούν αμέσως (προχωρήστε στο «Υβριδισμός των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath», σελίδα 55)

Προαιρετικό σημείο διακοπής των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath


Σημαντικό: Μη φυλάσσετε ή αποστέλλετε αποδιαταγμένα δείγματα σε ξηρό πάγο

Όλα τα προετοιμασμένα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των βαθμονομητών και των ορών ελέγχου ποιότητας, μπορούν να φυλαχθούν στους $2-8^\circ\text{C}$ κατά τη διάρκεια μίας νύχτας ή στους -20°C για έως 3 μήνες. Μπορεί να πραγματοποιηθεί ένας μέγιστος αριθμός 3 κύκλων κατάψυξης/απόψυξης με μέγιστο χρονικό διάστημα 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου απόψυξης.

Για φύλαξη για μία νύχτα στους 2–8°C στο στατώ δειγμάτων, καλύψτε τα δείγματα με σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal και επανατοποθετήστε το καπάκι του στατώ.

Για φύλαξη στους –20°C στο στατώ δειγμάτων, αφαιρέστε το καπάκι του στατώ και τη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal και τοποθετήστε ένα αντίστοιχο πώμα στα σωληνάρια.

Υβριδισμός των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

 Κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων δειγμάτων STM ή χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης Rapid Capture System* για οδηγίες σχετικά με τις πλήρεις εξετάσεις.

Εάν οι αποδιαταγμένοι βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας ή δείγματα έχουν φυλαχθεί, αφήστε τα να εξισορροπήσουν στους 20–25°C και, εάν φυλάχθηκαν σε στατώ δειγμάτων, αφαιρέστε και απορρίψτε τα πώματα από τα σωληνάρια.

- Υπάρχουν διαθέσιμες δύο μέθοδοι υβριδισμού των δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath: «Υβριδισμός με χρήση μικροπλακιδίου και Microplate Heater I» και «Υβριδισμός με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου».
- Τα δείγματα STM που έχουν αποδιαταχθεί με χρήση της μεθόδου MST Vortexer 2 πρέπει να χρησιμοποιούν τη μέθοδο «Υβριδισμός με χρήση μικροπλακιδίου και του Microplate Heater I» στη σελίδα **Error! Bookmark not defined.** Η μέθοδος «Υβριδισμός με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου» (σελίδα 57) δεν έχει επικυρωθεί με δείγματα STM αποδιαταγμένα με χρήση του MST Vortexer 2.
- Το μίγμα ανιχνευτών είναι ιξώδες. Βεβαιωθείτε ότι το μίγμα ανιχνευτών έχει αναμιχθεί πλήρως και ότι η απαιτούμενη ποσότητα έχει διανεμηθεί πλήρως μέσα σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού ή μικροσωληνάριο υβριδισμού.
- Κατά τη μεταφορά του δείγματος στο μικροπλακίδιο υβριδισμού ή στο μικροσωληνάριο υβριδισμού, αποφεύγετε να αγγίζετε τις πλευρές των πηγαδιών μικροπλακιδίου υβριδισμού ή των μικροσωληναρίων υβριδισμού, καθώς μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα εάν τα δείγματα δεν μεταφερθούν προσεκτικά. Περιορίστε το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, έξτρα-μακρύ ρύγχος πιπέτας για κάθε μεταφορά προκειμένου να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση.

Υβριδισμός με χρήση μικροπλακιδίου και του Microplate Heater I

1. Λάβετε και επισημάνετε ένα μικροπλακίδιο υβριδισμού.
2. Στροβιλίστε χρησιμοποιώντας μία από τις ακόλουθες μεθόδους:

Βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας, ή δείγματα STM με το MST Vortexer 2

- a. Όπως αρμόζει, καλύψτε τα σωληνάκια με σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal και ασφαλίστε το καπάκι του στατώ επάνω στο στατώ δειγμάτων.
- b. Στροβιλίστε το στατώ δειγμάτων για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ρύθμιση ταχύτητας.
- c. Τοποθετήστε αμέσως το στατώ δειγμάτων στην επιφάνεια εργασίας και απελευθερώστε τα μάνταλα. Ανασηκώστε το καπάκι του στατώ κατά περίπου 1 cm, και μετακινήστε το απαλά προς τα αριστερά και δεξιά για να απελευθερώσετε τυχόν σωληνάκια που έχουν κολλήσει στη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal. Αφαιρέστε το καπάκι του στατώ ανασηκώνοντάς το ευθεία προς τα πάνω μέχρι να απομακρυνθεί από το στατώ δειγμάτων.
- d. Ξεφλουδίστε προσεκτικά τη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal από το καπάκι του στατώ και απορρίψτε την.

Δείγματα PreservCyt ή δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με το MST Vortexer 2

- a. Όπως αρμόζει, καλύψτε τα σωληνάκια με σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal και ασφαλίστε το καπάκι του στατώ επάνω στο στατώ δειγμάτων.
- b. Στροβιλίστε το στατώ μετατροπής για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ρύθμιση ταχύτητας.
- c. Τοποθετήστε αμέσως το στατώ δειγμάτων στην επιφάνεια εργασίας και απελευθερώστε τα μάνταλα. Ανασηκώστε το καπάκι του στατώ κατά περίπου 1 cm και μετακινήστε το απαλά προς τα αριστερά και δεξιά για να απελευθερώσετε τυχόν σωληνάκια που έχουν κολλήσει στη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal. Αφαιρέστε το καπάκι του στατώ ανασηκώνοντάς το ευθεία προς τα πάνω μέχρι να απομακρυνθεί από το στατώ δειγμάτων.
- d. Ξεφλουδίστε προσεκτικά τη σφραγιστική μεμβράνη σωληναρίων DuraSeal από το καπάκι του στατώ και απορρίψτε την.

Οποιοσδήποτε τύπος δείγματος με αναδευτήρα vortexer

- a. Στροβιλίστε κάθε σωληνάριο ξεχωριστά για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.

- Χρησιμοποιώντας την πιπέτα EXPAND-4 ή μια μονοκάναλη πιπέτα με έξτρα μακρύ ρύγχος πιπέτας, μεταφέρετε 75 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας, ή δείγμα στον πάτο ενός κενού πηγαδιού μικροπλακιδίου υβριδισμού σύμφωνα με τη δημιουργημένη διάταξη πλακιδίου.

Εάν τα δείγματα πρόκειται να φυλαχθούν, πωματίστε τους αποδιαταγμένους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας και δείγματα STM με νέα βιδωτά πώματα σωληναρίων συλλογής δείγματος, και τοποθετήστε το αρχικό πώμα για κάθε δείγμα στα δείγματα PreservCyt και δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath.

Σημείωση: Φυλάξτε τα δείγματα σύμφωνα με τα όρια που καθορίζονται στην ενότητα «Προαιρετικό σημείο διακοπής των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath», σελίδα 54.

- Μετά τη μεταφορά του τελευταίου δείγματος, καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού με ένα καπάκι μικροπλακιδίου και επωάστε για 10 λεπτά στους 20–25°C.
- Στροβιλίστε πλήρως το μίγμα ανιχνευτών και διανείμετε σε κλασματικούς όγκους σε αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων.
- Μεταγγίστε με πιπέτα προσεκτικά 25 μl του μίγματος ανιχνευτών μέσα σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα και νέα ρύγχη για κάθε προσθήκη μίγματος ανιχνευτών.
- Αποφύγετε το πιτσίλισμα και το άγγιγμα των πλευρών των πηγαδιών του μικροπλακιδίου υβριδισμού.
- Καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού με ένα καπάκι μικροπλακιδίου και ανακινήστε για 3 ± 2 λεπτά στο Rotary Shaker I ρυθμισμένο σε 1.100 ± 100 rpm.

Μετά την ανακίνηση, οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας, τα δείγματα STM και τα δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath πρέπει να γίνουν κίτρινα, ενώ τα δείγματα PreservCyt πρέπει να γίνουν ροζ.

Δείγματα που παραμένουν μοβ μπορεί να μην έχουν λάβει τη σωστή ποσότητα μίγματος ανιχνευτών. Προσθέστε επιπλέον 25 μl μίγματος ανιχνευτών στα δείγματα που παραμένουν μοβ και ανακινήστε ξανά. Εάν ένα δείγμα παραμένει μοβ αφού ακολουθήσετε αυτήν τη διαδικασία, επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος.

- Τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στο Microplate Heater I εξισορροπημένο στους $65 \pm 2^\circ\text{C}$, διασφαλίζοντας ότι δεν προκαλείτε πιτσίλισμα. Επωάστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού για 60 ± 5 λεπτά.
- Προχωρήστε στην ενότητα «Δέσμευση υβριδίου», σελίδα 60, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Υβριδισμός με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου

1. Επισημάνετε και τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό καθαρών μικροσωληναρίων υβριδισμού μέσα στο στατώ μικροσωληναρίων.
2. Στροβιλίστε κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας και σωληνάριο δείγματος ξεχωριστά για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα πριν αφαιρέσετε το δείγμα.
3. Χρησιμοποιώντας μια μονοκάναλη πιπέτα με έξτρα μακρύ ρύγχος πιπέτας, μεταφέρετε 75 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας ή δείγμα στον πάτο του αντίστοιχου μικροσωληναρίου υβριδισμού σύμφωνα με τη δημιουργημένη διάταξη πλακιδίου.

Εάν τα δείγματα πρόκειται να φυλαχθούν, πωματίστε τους αποδιαταγμένους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας και δείγματα STM με νέα βιδωτά πώματα σωληναρίων συλλογής δείγματος, και τοποθετήστε το αρχικό πώμα για κάθε δείγμα στα δείγματα PreservCyt και SurePath.

Σημείωση: Φυλάξτε τα δείγματα σύμφωνα με τα όρια που καθορίζονται στην ενότητα «Προαιρετικό σημείο διακοπής των προετοιμασμένων δειγμάτων STM και των χειροκίνητα προετοιμασμένων δειγμάτων PreservCyt και δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath», σελίδα 54.

4. Αφού μεταφέρετε το τελευταίο δείγμα, επώαστε τα μικροσωληνάκια υβριδισμού για 10 λεπτά στους 20–25°C.
5. Στροβιλίστε πλήρως το μίγμα ανιχνευτών και διανείμετε σε κλασματικούς όγκους σε αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων.
6. Μεταγγίστε με πιπέτα προσεκτικά 25 μl του μίγματος ανιχνευτών σε κάθε μικροσωληνάριο υβριδισμού χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα και νέα ρύγχη για κάθε σειρά.

Αποφύγετε το πιπίλισμα και το άγγιγμα των πλευρών των μικροσωληναρίων υβριδισμού.

Επιθεωρήστε το στατώ από το κάτω μέρος για να διασφαλίσετε ότι όλα τα μικροσωληνάκια υβριδισμού έχουν λάβει τη σωστή ποσότητα μίγματος ανιχνευτών.

7. Καλύψτε τα μικροσωληνάκια υβριδισμού με σφραγιστικό πλακιδίου. Τοποθετήστε το κάλυμμα του στατώ επάνω στο στατώ. Ανακινήστε το στατώ μικροσωληναρίων για 3 ± 2 λεπτά στο Rotary Shaker I ρυθμισμένο σε 1.100 ± 100 rpm.

Μετά την ανακίνηση, οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας, τα δείγματα STM και τα δείγματα SurePath πρέπει να γίνουν κίτρινα, ενώ τα δείγματα PreservCyt πρέπει να γίνουν ροζ.

Δείγματα που παραμένουν μοβ μπορεί να μην έχουν λάβει τη σωστή ποσότητα μίγματος ανιχνευτών. Προσθέστε επιπλέον 25 μl μίγματος ανιχνευτών στα δείγματα που παραμένουν μοβ και ανακινήστε ξανά. Εάν ένα δείγμα παραμένει μοβ αφού ακολουθήσετε αυτήν τη διαδικασία, επαναλάβετε την εξέταση του δείγματος.

-
8. Επωάστε το στατώ μικροσωληναρίων για 60 ± 5 λεπτά σε υδατόλουτρο $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού στο υδατόλουτρο επαρκεί για να καλύψει ολόκληρο τον όγκο των μικροσωληναρίων υβριδισμού.
- Σημείωση:** Το στατώ μικροσωληναρίων θα επιπλεύσει στο υδατόλουτρο.
9. Προχωρήστε στην ενότητα «Δέσμευση υβριδίου», σελίδα 60, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Δέσμευση υβριδίου

1. Αφαιρέστε όλα τα περιττά πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης από το πλαίσιο πλακιδίου.
2. Επανατοποθετήστε τα αχρησιμοποίητα πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης στο αρχικό σακουλάκι και ξανασφραγίστε το.
3. Με ένα μαρκαδόρο, αριθμήστε διαδοχικά κάθε στήλη και επικολλήστε την αντίστοιχη ετικέτα στο μικροπλακίδιο δέσμευσης.

Τα δείγματα θα προστεθούν στα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης σύμφωνα με τη δημιουργημένη διάταξη πλακιδίου.

4. Όπως αρμόζει, αφαιρέστε προσεκτικά το μικροπλακίδιο υβριδισμού από το Microplate Heater I ή το στατώ μικροσωληναρίων από το υδατόλουτρο.

Αφαιρέστε αμέσως το καπάκι μικροπλακιδίου και τοποθετήστε το σε μια καθαρή επιφάνεια ή αφαιρέστε το καπάκι του στατώ και τραβήξτε αργά το σφραγιστικό πλακιδίου προς τα πάνω και πέρα από το στατώ μικροσωληναρίων.

5. Χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα, μεταφέρετε ολόκληρα τα περιεχόμενα (περίπου 100 μl) των πηγαδιών μικροπλακιδίων υβριδισμού ή των μικροσωληναρίων υβριδισμού στον πάτο των αντίστοιχων πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης.

Χρησιμοποιήστε νέα ρύγχη πιπέτας για κάθε μεταφορά και αφήστε κάθε ρύγχος πιπέτας να στραγγίσει για να βεβαιωθείτε ότι έγινε πλήρης μεταφορά δείγματος. Εάν θέλετε, η πιπέτα μπορεί να στερεωθεί ακουμπώντας το μέσο του ρύγχους πιπέτας στην επάνω άκρη των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης (βλ. Figure 2, παρακάτω).

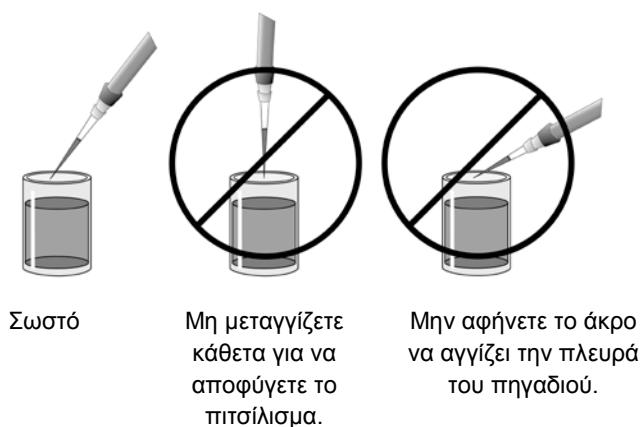


Figure 2. Correct pipetting.

6. Καλύψτε το μικροπλακίδιο δέσμευσης με το καπάκι μικροπλακιδίου ή ένα νέο σφραγιστικό πλακιδίου και ανακινήστε για 60 ± 5 λεπτά στο Rotary Shaker I σε $1.100 + 100$ rpm στους $20-25^{\circ}\text{C}$.

Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης (βλ. «Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης», σελ. 41).

7. Όταν η επώαση ολοκληρωθεί, αφαιρέστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης από το Rotary Shaker I και αφαιρέστε προσεκτικά το καπάκι μικροπλακιδίου ή το σφραγιστικό πλακιδίου.
8. Αφαιρέστε το υγρό από τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης απορρίπτοντας σε νεροχύτη. Αναστρέψτε πλήρως το μικροπλακίδιο δέσμευσης πάνω από το νεροχύτη και ανακινήστε έντονα με κίνηση προς τα κάτω.

Σημαντικό: Μην αναστρέφετε ξανά το μικροπλακίδιο.

Βεβαιωθείτε ότι δεν προκαλείτε πιπίλισμα χύνοντας το υγρό πολύ κοντά στον πάτο του νεροχύτη.

9. Στυπώστε με σταθερά απαλά κτυπήματα 2–3 φορές σε καθαρά μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι.
Βεβαιωθείτε ότι όλο το υγρό έχει αφαιρεθεί από τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης και ότι το επάνω μέρος του μικροπλακιδίου δέσμευσης είναι στεγνό.
10. Προχωρήστε στην ενότητα «Ανίχνευση υβριδίου», σελίδα 62, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Ανίχνευση υβριδίου

- Εκτελέστε προσθήκες αντιδραστήριου στο μικροπλακίδιο δέσμευσης με κατεύθυνση από αριστερά προς τα δεξιά χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα. Σκουπίστε τα ρύγχη επάνω στο αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων για να αφαιρέσετε το περίσσιο αντιδραστήριο πριν τη χορήγηση στο μικροπλακίδιο.
 - Εάν δεν χρησιμοποιηθεί 8-κάναλη πιπέτα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί στη θέση της μια επαναληπτική πιπέτα. Διανείμετε σε κλασματικούς όγκους το DR1 μέσα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου επαρκούς μεγέθους για τον απαιτούμενο όγκο.
 - Συνιστάται η εφαρμογή της τεχνικής ανάδρομης αναρρόφησης για καλύτερη συνοχή στη διανομή του αντιδραστήριου. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.
 - Εάν θέλετε, μπορείτε να σταθεροποιήσετε την πιπέτα τοποθετώντας το κέντρο του ρύγχους της πιπέτας στο επάνω άκρο των πηγαδιών των μικροπλακιδίων δέσμευσης. Προσέχετε ώστε να μην αγγίξετε τα τοιχώματα των πηγαδιών των μικροπλακιδίων δέσμευσης καθώς θα μπορούσε να προκύψει επι-μόλυνση των δειγμάτων (βλ. Figure 2, σελίδα 60).
1. Αναμίξτε το DR1 πλήρως, και μεταφέρετε προσεκτικά τον αντίστοιχο όγκο (όπως αρμόζει, βλ. Πίνακας 1, σελίδα 35, ή Πίνακας 4, σελίδα 37 **Error! Bookmark not defined.**) μέσα σε ένα καθαρό, αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων.
 2. Μεταγγίστε με πιπέτα προσεκτικά 75 μl του DR1 σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης με χρήση της τεχνικής ανάδρομης αναρρόφησης, ως εξής:
 - a. Προσαρτήστε ρύγχη σε μια 8-κάναλη πιπέτα.
 - b. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα ρύγχη είναι τοποθετημένα σταθερά.
 - c. Ωθήστε το έμβολο της πιπέτας πέρα από το πρώτο στοπ στο δεύτερο στοπ.
 - d. Εμβυθίστε τα ρύγχη μέσα στο αντιδραστήριο.
 - e. Απελευθερώστε το έμβολο αργά και αφήστε το αντιδραστήριο να γεμίσει τα ρύγχη. Διανείμετε το αντιδραστήριο μέσα στα πηγαδάκια μικροπλακιδίου πιέζοντας το έμβολο στο πρώτο στοπ.
 - f. Μην απελευθερώσετε το έμβολο μέχρι τα ρύγχη της πιπέτας να έχουν εμβυθιστεί στο αντιδραστήριο.
- Βεβαιωθείτε ότι όλα τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης έχουν γεμίσει, παρατηρώντας την ένταση του ροζ χρώματος. Όλα τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης πρέπει να έχουν ροζ χρώμα παρόμοιας έντασης.
3. Καλύψτε το μικροπλακίδιο δέσμευσης με ένα καπάκι μικροπλακιδίου, καθαρό Parafilm, ή ισοδύναμο, και επωάστε για 30–45 λεπτά στους 20–25°C.

-
4. Προχωρήστε στην ενότητα «Έκπλυση», σελίδα 64, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Έκπλυση

Πλύνετε το μικροπλακίδιο δέσμευσης χρησιμοποιώντας μία από τις μεθόδους παρακάτω.

Μέθοδος Automated Plate Washer

Διατηρείτε πάντα το Automated Plate Washer ενεργοποιημένο. Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο ξεπλύματος είναι γεμάτο και το δοχείο συλλογής αποβλήτων είναι άδειο. Το Automated Plate Washer θα πραγματοποιεί τακτική μηχανική έκπλυση για τον καθαρισμό του συστήματος. Ανατρέξτε στο Automated Plate Washer – Εγχειρίδιο χρήστη (*Automated Plate Washer User Manual*) για περισσότερες οδηγίες.

- Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο έκπλυσης είναι γεμάτο τουλάχιστον μέχρι τη σήμανση 1 λίτρου με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Εάν όχι, προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (βλ. «Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης», σελ. 41).
 - Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο ξεπλύματος είναι γεμάτο με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
 - Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο αποβλήτων είναι άδειο και το πώμα είναι τοποθετημένο με ασφάλεια.
 - Το Automated Plate Washer θα κάνει αυτόματα προκαταρκτική πλήρωση πριν από κάθε έκπλυση και θα ξεπλένει μετά από κάθε έκπλυση.
 - Εάν χρησιμοποιείται μερική ταινία πηγαδιών μικροπλακιδίου δέσμευσης, τοποθετήστε τα κενά πηγαδάκια μικροπλακιδίου στο μικροπλακίδιο δέσμευσης για να ολοκληρωθεί η στήλη πριν την έκπλυση.
1. Αφαιρέστε το καπάκι μικροπλακιδίου και τοποθετήστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης στην πλατφόρμα του Automated Plate Washer
 2. Βεβαιωθείτε ότι το Automated Plate Washer είναι ενεργοποιημένο, και ότι στην οθόνη εμφανίζεται η ένδειξη **Digene Wash Ready** (έκπλυση Digene έτοιμη) ή **P1**.
 3. Επιλέξτε τον αριθμό των ταινιών προς έκπλυση πατώντας το κουμπί **Rows** (σειρές) και κατόπιν **+** ή **-** για να προσαρμόσετε τον αριθμό.
 4. Πατήστε το κουμπί **Rows** για επιστροφή στο **Digene Wash Ready** ή **P1**.
 5. Πατήστε το κουμπί **Start/Stop** (έναρξη διακοπή) για να ξεκινήσετε.

Το Automated Plate Washer θα πραγματοποιήσει 6 κύκλους πλήρωσης και αναρρόφησης σε διάστημα περίπου 10 λεπτών. Κατά τη διάρκεια του προγράμματος, θα υπάρξει μια σύντομη παύση κατά την οποία δεν πρέπει να αφαιρέσετε το μικροπλακίδιο.

Όταν το Automated Plate Washer ολοκληρώσει την έκπλυση, στην οθόνη θα εμφανιστεί η ένδειξη «Digene Wash Ready» ή «P1».

6. Αφαιρέστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης από την πλατφόρμα του Automated Plate Washer μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος.

Το μικροπλακίδιο δέσμευσης πρέπει να έχει λευκή εμφάνιση χωρίς να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια των μικροπλακιδίων δέσμευσης.

7. Προχωρήστε στην ενότητα «Ενίσχυση σήματος», σελίδα 67, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Μέθοδος χειροκίνητης έκπλυσης

1. Αφαιρέστε το DR1 από τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης τοποθετώντας καθαρά μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι επάνω στο μικροπλακίδιο δέσμευσης.
2. Βεβαιωθείτε ότι τα χαρτομάντιλα έρχονται σε επαφή με ολόκληρη την επιφάνεια του πλακιδίου δέσμευσης και αναστρέψτε προσεκτικά.
3. Αφήστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης να στραγγίσει για 1–2 λεπτά.
4. Στυπώστε καλά σε καθαρά μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι.

Απορρίψτε προσεκτικά τα χρησιμοποιημένα χαρτομάντιλα για να αποφύγετε μόλυνση με αλκαλική φωσφατάση.

5. Χρησιμοποιώντας τη συσκευή έκπλυσης, πλύνετε χειροκίνητα το μικροπλακίδιο δέσμευσης 6 φορές.

Για σωστή έκπλυση, υπερχειλίστε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Αυτό θα αφαιρέσει το DR1 από το επάνω μέρος των πηγαδιών μικροπλακιδίου δέσμευσης. Η έκπλυση ξεκινά στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης A1 και συνεχίζει με ελικοειδή τρόπο προς τα δεξιά και κάτω. Αφού έχουν γεμίσει όλα τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης, χύστε το υγρό μέσα στο νεροχύτη με δυνατή κίνηση προς τα κάτω. Η δεύτερη έκπλυση ξεκινά στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης H12 προχωρώντας με ελικοειδή κίνηση προς τα αριστερά και πάνω. Αυτή η ακολουθία 2 πλύσεων επαναλαμβάνεται 2 επιπλέον φορές για ένα σύνολο 6 πλύσεων ανά πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης.

6. Μετά την έκπλυση, στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης με αναστροφή σε καθαρά μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι και σταθερά απαλά κτυπήματα 3–4 φορές. Αντικαταστήστε τα χαρτομάντιλα και στυπώστε ξανά.
7. Αφήστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης ανεστραμμένο και αφήστε το να στραγγίσει για 5 λεπτά. Στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης μία ακόμα φορά.

Το μικροπλακίδιο δέσμευσης πρέπει να έχει λευκή εμφάνιση και δεν πρέπει να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.

8. Προχωρήστε στην ενότητα «Ενίσχυση σήματος», σελίδα 67, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Ενίσχυση σήματος

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Χρησιμοποιήστε ένα νέο ζευγάρι γάντια για το χειρισμό του DR2.
 - Εκτελέστε προσθήκες αντιδραστηρίου στο μικροπλακίδιο δέσμευσης με κατεύθυνση από αριστερά προς τα δεξιά χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα.
 - Εάν δεν χρησιμοποιηθεί 8-κάναλη πιπέτα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί στη θέση της μια επαναληπτική πιπέτα. Διανείμετε σε κλασματικούς όγκους το DR2 μέσα σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου επαρκούς μεγέθους για τον απαιτούμενο όγκο.
 - Προσθέστε το DR2 χωρίς διακοπή. Ο χρόνος επώασης όλων των πηγαδιών μικροπλακιδίου δέσμευσης πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά.
 - Βεβαιωθείτε ότι δεν αγγίζετε τις πλευρές των πηγαδιών μικροπλακιδίου δέσμευσης ή πιτσιλίζετε αντιδραστήριο επάνω στα ρύγχη, καθώς θα μπορούσε να συμβεί διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων (βλ. **Figure 2**, σελίδα 60).
1. Αναμίξτε το DR2 πλήρως, και μεταφέρετε προσεκτικά τον αντίστοιχο όγκο (όπως αρμόζει, βλ. Πίνακας 1, σελίδα 35, ή Πίνακας 4, σελίδα 37) μέσα σε ένα καθαρό, αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων.
 2. Μεταγγίστε με πιπέτα προσεκτικά 75 µl DR2 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμευσης χρησιμοποιώντας την τεχνική ανάδρομης αναρρόφησης που περιγράφηκε προηγουμένως (βλ. «Ανίχνευση υβριδίου», σελίδα 62).
Βεβαιωθείτε ότι όλα τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης έχουν γεμίσει με ακρίβεια παρατηρώντας την ένταση του κίτρινου χρώματος· όλα τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης πρέπει να έχουν ίδια ένταση κίτρινου χρώματος.
 3. Καλύψτε το μικροπλακίδιο δέσμευσης με ένα καπάκι μικροπλακιδίου και επώαστε στους 20–25°C για 15 λεπτά (και όχι αργότερα από 30 λεπτά επώασης).
Σημαντικό: Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.
 4. Προχωρήστε στην ενότητα «Μέτρηση του μικροπλακιδίου δέσμευσης και παραγωγή αποτελεσμάτων», σελίδα 68, για να συνεχίσετε την εξέταση.

Μέτρηση του μικροπλακιδίου δέσμευσης και παραγωγή αποτελεσμάτων

1. Μετρήστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης χρησιμοποιώντας ένα όργανο DML.
Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του σχετικού λογισμικού για λεπτομέρειες σχετικά με τη μέτρηση μικροπλακιδίων δέσμευσης και την παραγωγή αναφορών αποτελεσμάτων εξέτασης. Το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* θα επιτρέψει την εισαγωγή των σχετικών πληροφοριών δοκιμασίας.
2. Εάν δεν χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρες μικροπλακίδιο δέσμευσης, αφαιρέστε τα χρησιμοποιημένα πηγαδάκια μικροπλακιδίου δέσμευσης από το πλαίσιο μικροπλακιδίου, ξεπλύνετε το πλαίσιο μικροπλακιδίου πλήρως με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, στεγνώστε και φυλάξτε για την επόμενη δοκιμασία.
3. Απορρίψτε όλα τα κλάσματα αντιδραστηρίων και τα προετοιμασμένα αντιδραστήρια, εκτός εάν καθορίζεται διαφορετικά.
Αραιώστε το υπολειπόμενο DNR σε μια φιάλη πριν την απόρριψη σύμφωνα με τις εθνικές και τοπικές εργαστηριακές διαδικασίες.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η τιμή CO της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA της τάξης του 1 pg/ml ισοδυναμεί με 100.000 αντίγραφα HPV/ml ή 5.000 αντίγραφα HPV ανά δοκιμασία.

Αποτελέσματα εξέτασης δειγμάτων STM

Δείγματα STM με τιμή RLU/CO $\geq 1,0$ θεωρούνται «positive» (θετικά) για 1 ή περισσότερους από τους τύπους HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68.

Δείγματα STM με τιμή RLU/CO $< 1,0$ θεωρούνται «negative» (αρνητικά) ή «no HPV DNA detected» (χωρίς ανίχνευση HPV DNA) ως προς τους 13 εξεταζόμενους τύπους HPV. Οι αλληλουχίες HPV DNA υψηλού κινδύνου είτε απουσιάζουν είτε τα επίπεδα του HPV DNA βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας.

Αποτελέσματα εξέτασης δειγμάτων SurePath

Δείγματα SurePath με τιμή RLU/CO $\geq 1,0$ θεωρούνται «positive» (θετικά) για 1 ή περισσότερους από τους τύπους HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68.

Δείγματα SurePath με τιμή RLU/CO $< 1,0$ θεωρούνται «negative» (αρνητικά) ή «no HPV DNA detected» (χωρίς ανίχνευση HPV DNA) για τους 13 εξεταζόμενους τύπους HPV. Οι αλληλουχίες HPV DNA είτε απουσιάζουν είτε τα επίπεδα του HPV DNA βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας.

Αποτελέσματα εξέτασης δειγμάτων PreservCyt

Δείγματα PreservCyt με τιμή RLU/CO $\geq 1,0$ θεωρούνται «positive» (θετικά) για 1 ή περισσότερους από τους τύπους HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68.

Δείγματα PreservCyt με τιμή RLU/CO $< 1,0$ θεωρούνται «negative» (αρνητικά) ή «no HPV DNA detected» (χωρίς ανίχνευση HPV DNA) ως προς τους 13 εξεταζόμενους τύπους HPV. Οι αλληλουχίες HPV DNA είτε απουσιάζουν είτε τα επίπεδα του HPV DNA βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας.

Για δείγματα PreservCyt με τιμή RLU/CO $\geq 1,0$ και $< 2,5$, η QIAGEN συνιστά την επανάληψη της εξέτασης του δείγματος, ως εξής:

- Εάν η τιμή RLU/CO της πρώτης επαναληπτικής εξέτασης είναι $\geq 1,0$, αναφέρετε το δείγμα ως «positive» (θετικό). Δεν απαιτείται περαιτέρω εξέταση.
- Εάν η τιμή RLU/CO της πρώτης επαναληπτικής εξέτασης είναι $< 1,0$, απαιτείται δεύτερη επαναληπτική εξέταση (τρίτο αποτέλεσμα). Το δεύτερο αποτέλεσμα είναι το τελικό αποτέλεσμα ($< 1,0$ είναι αρνητικό, $\geq 1,0$ είναι θετικό) και είναι αυτό που αναφέρεται.

Τιμή RLU/CO κοντά στο 1,0

Εάν η τιμή RLU/CO ενός δείγματος είναι κοντά στο, αλλά όχι μικρότερη από, 1,0 και υπάρχει υποψία λοίμωξης HPV υψηλού κινδύνου, σκεφθείτε εναλλακτικές μεθόδους εξέτασης ή/και επαναληπτικό δείγμα.

Άλλοι τύποι HPV

Λόγω του ότι αυτή η δοκιμασία ανιχνεύει μόνο τους τύπους HPV υψηλού κινδύνου 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68, να θυμάστε ότι μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα άλλοι τύποι HPV χαμηλού κινδύνου. Εάν η εξέταση πραγματοποιείται ειδικά για την ανίχνευση της παρουσίας σεξουαλικά μεταδιδόμενου HPV χαμηλού κινδύνου, χρησιμοποιήστε τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA, η οποία ανιχνεύει τύπους HPV DNA υψηλού και χαμηλού κινδύνου.

Επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας

Η επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας διενεργείται για να διασφαλιστεί ότι τα αντιδραστήρια, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου ποιότητας λειτουργούν σωστά, επιτρέποντας τον ακριβή προσδιορισμό της τιμής CO της δοκιμασίας. Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA απαιτεί βαθμονόμηση δοκιμασίας με κάθε εξέταση: συνεπώς, είναι απαραίτητο να επαληθεύεται κάθε δοκιμασία. Αυτή η διαδικασία επαλήθευσης δεν υποκαθιστά τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας. Αποδεκτά εύρη τιμών για τη βαθμονόμηση δοκιμασίας και τους ορούς ελέγχου ποιότητας έχουν καθοριστεί μόνο για όργανα DML εγκεκριμένα από την QIAGEN.

Η βαθμονόμηση της δοκιμασίας εκτελείται αυτόματα από το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* και εκτυπώνεται στην αναφορά ανάλυσης δεδομένων. Ωστόσο, χρήστες με έκδοση ποιοτικού λογισμικού *digene* 1.03 ή παλιότερη πρέπει να επαληθεύουν με μη αυτόματο τρόπο τη βαθμονόμηση της δοκιμασίας για να είναι δυνατή η αναφορά των αποτελεσμάτων των

ασθενών. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN για περισσότερες πληροφορίες.

Η δοκιμασία πρέπει να πληροί τα καθορισμένα κριτήρια βαθμονόμησης δοκιμασίας. Εάν οποιαδήποτε από τα ακόλουθα κριτήρια είναι μη έγκυρα, το λογισμικό δεν θα ερμηνεύσει τα αποτελέσματα των δειγμάτων.

Αρνητικός βαθμονομητής

Ο NC πρέπει να εξετάζεται εις τριπλούν σε κάθε δοκιμασία. Ο μέσος NC πρέπει να είναι ≥ 10 και ≤ 250 RLU και ο συντελεστής διακύμανσης (CV) πρέπει να είναι $\leq 25\%$. Εάν ο CV είναι $>25\%$, το λογισμικό απορρίπτει την τιμή RLU που αποκλίνει κατά το μέγιστο από τη μέση τιμή ως έκτροπη τιμή και υπολογίζει εκ νέου τη μέση τιμή και το CV χρησιμοποιώντας τις τιμές που υπολείπονται.

Εάν ο CV παραμένει $>25\%$, η βαθμονόμηση της δοκιμασίας είναι άκυρη και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί για όλα τα δείγματα ασθενών. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν πρέπει να ανακοινωθούν.

Θετικός βαθμονομητής

Ο HRC πρέπει να εξετάζεται εις τριπλούν σε κάθε δοκιμασία. Ο CV του HRC πρέπει να είναι $\leq 15\%$. Εάν ο CV είναι $>15\%$, το λογισμικό απορρίπτει την τιμή RLU που αποκλίνει κατά το μέγιστο από τη μέση τιμή ως έκτροπη τιμή και υπολογίζει εκ νέου τη μέση τιμή και το CV χρησιμοποιώντας τις τιμές που υπολείπονται.

Εάν ο CV παραμένει $>15\%$, η βαθμονόμηση της δοκιμασίας είναι άκυρη και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί για όλα τα δείγματα ασθενών. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν πρέπει να ανακοινωθούν.

Μέση τιμή θετικού βαθμονομητή / μέση τιμή αρνητικού βαθμονομητή

Το λογισμικό χρησιμοποιεί το $HRC\bar{X}$ και το $NC\bar{X}$ για τον υπολογισμό του $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Έγκυρο $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ ορίζεται ως $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$.

Εάν $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ είναι $<2,0$ ή >15 , η βαθμονόμηση της δοκιμασίας είναι άκυρη και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί για όλα τα δείγματα ασθενών. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν πρέπει να ανακοινωθούν.

Υπολογισμός της τιμής Cutoff

Το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* υπολογίζει και αναφέρει το RLU/CO και θετικά/αρνητικά αποτελέσματα για όλα τα δείγματα. Η τιμή CO για τον καθορισμό θετικών δειγμάτων είναι ο HRC \bar{X} . Το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* χρησιμοποιεί τις τιμές RLU δείγματος για να εκφράζει αποτελέσματα ως RLU δείγματος/τιμή CO.

Για εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS, το πρωτόκολλο δοκιμασίας RCS HPV εφαρμόζει ένα συντελεστή προσαρμογής βαθμονόμησης (CAF) της τάξης του 0,8 στον έγκυρο HRC \bar{X} . Αυτός ο CAF είναι αναγκαίος προκειμένου τα χαρακτηριστικά απόδοσης των αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων να παραμένουν ισοδύναμα με τις χειροκίνητες εξετάσεις. Ο CAF εφαρμόζεται μόνο στα αποτελέσματα των αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων· συνεπώς, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να επιλέγεται το σωστό πρωτόκολλο δοκιμασίας προκειμένου να ληφθούν ακριβή αποτελέσματα.

Οροί ελέγχου ποιότητας

Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρέχονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA και πρέπει να χρησιμοποιούνται για εσωτερικό έλεγχο ποιότητας. Οι παρεχόμενοι οροί ελέγχου ποιότητας είναι κλωνοποιημένοι στόχοι HPV DNA και δεν παράγονται από HPV μη μεταλλαγμένου τύπου. Αυτός είναι ο ίδιος τύπος υλικού που χρησιμοποιείται για τους παρεχόμενους βαθμονομητές. Πρόσθετοι οροί ελέγχου ποιότητας μπορούν να εξεταστούν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ή απαιτήσεις των εθνικών ή τοπικών κανονισμών ή πιστοποιημένων οργανισμών. Οι παρεχόμενοι οροί ελέγχου ποιότητας δεν χρησιμεύουν ως κατάλληλος έλεγχος ποιότητας για την επεξεργασία του διαλύματος PreservCyt ή του υγρού διατήρησης SurePath.

Συμβουλευθείτε το ισχύον εγχειρίδιο χρήστη λογισμικού ανάλυσης δοκιμασίας *digene* για οδηγίες σχετικά με την εισαγωγή των αριθμών παρτίδας και των ημερομηνιών λήξης των ορών ελέγχου ποιότητας. Για να είναι έγκυρη μια δοκιμασία, το RLU/CO κάθε ορού ελέγχου ποιότητας πρέπει να εμπίπτει στα καθορισμένα κριτήρια όπως καθορίζονται στον Πίνακα 10, παρακάτω.

Εάν οι οροί ελέγχου ποιότητας δεν εμπίπτουν σε αυτά τα εύρη τιμών, η δοκιμασία είναι μη έγκυρη και πρέπει να επαναληφθεί. Κατά συνέπεια, μην αναφέρετε αποτελέσματα ασθενούς.

Πίνακας 10. Κριτήρια εγκυρότητας δοκιμασίας ορού ελέγχου ποιότητας

Ορός ελέγχου ποιότητας	Ελάχιστο (RLU/CO)	Μέγιστο (RLU/CO)	ΣΔ (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Περιορισμοί

- Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για τους τύπους HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68 δεν συνιστάται για την εκτίμηση πιθανολογούμενης σεξουαλικής κακοποίησης.
- Ο επιπολασμός της λοίμωξης με τον ιό HPV σε έναν πληθυσμό μπορεί να επηρεάσει την απόδοση. Οι θετικές προγνωστικές τιμές μειώνονται κατά την εξέταση πληθυσμών με χαμηλό επιπολασμό ή μεμονωμένων ατόμων που δεν παρουσιάζουν κίνδυνο λοίμωξης.
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας δεν αποκλείει την πιθανότητα λοίμωξης με τον ιό HPV δεδομένου ότι τα πολύ χαμηλά επίπεδα λοίμωξης ή τυχόν σφάλμα κατά τη δειγματοληψία πιθανόν να παράγουν ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας. Επιπλέον, η δοκιμασία αυτή δεν ανιχνεύει DNA των τύπων HPV χαμηλού κινδύνου (6, 11, 42, 43 και 44).
- Η λοίμωξη με τον ιό HPV δεν είναι οριστικός δείκτης της παρουσίας νόσου του τραχήλου υψηλού βαθμού, ούτε υποδηλώνει σε όλες τις περιπτώσεις ότι θα αναπτυχθεί νόσος του τραχήλου υψηλού βαθμού ή καρκίνος.
- Υφίσταται ένα μικρό ποσοστό διασταυρούμενου υβριδισμού μεταξύ του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου και των τύπων HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 και MM9. Ασθενείς με δείγματα τα οποία περιέχουν υψηλά επίπεδα HPV αυτών των τύπων πιθανόν να παραπεμφθούν εσφαλμένα σε κολποσκόπηση (15, 35).
- Η δοκιμασία *digene* έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση τύπων HPV υψηλού κινδύνου, συμπεριλαμβανομένων των τύπων 39, 58, 59 και 68. Αναλυτικές μελέτες που διεξήχθησαν από την QIAGEN, με χρήση κλωνοποιημένων πλασμιδίων DNA HPV, υποδεικνύουν ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία ανιχνεύει αυτούς τους τύπους σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,62 pg/ml και 1,39 pg/ml. Αυτό ισοδυναμεί με τα χαρακτηριστικά ανίχνευσης των υπολοίπων τύπων HPV οι οποίοι εξετάζονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Η QIAGEN κατάφερε να επιβεβαιώσει την ανίχνευση αυτών των τύπων HPV μόνο σε έναν περιορισμένο αριθμό κλινικών δειγμάτων. Εξαιτίας του χαμηλού επιπολασμού αυτών των τύπων στον ευρύτερο πληθυσμό (28), τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ως προς την ανίχνευση του HPV των τύπων 39, 58, 59 και 68 δεν έχουν επιβεβαιωθεί στατιστικά.
- Σε περίπτωση που υφίστανται μεγάλες συγκεντρώσεις αντιμυκητιακής κρέμας, αντισυλληπτικής γέλης ή καταιονισμού κατά τη συλλογή ενός δείγματος STM που προορίζεται εξέταση, υπάρχει πιθανότητα παραγωγής ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, εφόσον τα δείγματα αυτά περιέχουν επίπεδα HPV DNA που δίνουν τιμές RLU/CO που αγγίζουν την τιμή CO της δοκιμασίας.
- Σε περίπτωση που υφίστανται μεγάλες συγκεντρώσεις αντιμυκητιακής κρέμας, κολπικής λιπαντικής γέλης ή αίματος κατά τη συλλογή ενός τραχηλικού δείγματος PreservCyt που

προορίζεται για προετοιμασία δείγματος με το kit QIAAsymphony DSP HPV Media, υπάρχει πιθανότητα παραγωγής ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, εφόσον τα δείγματα αυτά περιέχουν επίπεδα HPV DNA που δίνουν τιμές RLU/CO που αγγίζουν την τιμή CO της δοκιμασίας.

- Εάν υπάρχει αντισυλληπτική γέλη κατά το χρόνο συλλογής ενός τραχηλικού δείγματος PreservCyt για προετοιμασία δείγματος με το kit QIAAsymphony DSP AChH DNA, μπορεί να προκύψει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας.
- Σε περίπτωση παρουσίας αντισυλληπτικής γέλης, αντιμυκητιακής κρέμας ή αντιφλεγμονώδους κρέμας κατά το χρόνο συλλογής ενός τραχηλικού δείγματος SurePath για προετοιμασία δείγματος με το kit QIAAsymphony DSP HPV, μπορεί να προκύψει ένα ψευδές αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας.
- Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου και του πλασμιδίου pBR322 είναι δυνατή. Έχει αναφερθεί παρουσία ομόλογων αλληλουχιών pBR322 σε ανθρώπινα δείγματα από το γεννητικό σύστημα και θα μπορούσαν να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα υπό την παρουσία υψηλών επιπέδων βακτηριακού πλασμιδίου.
- Κατά την εκτέλεση εξετάσεων αυτοματοποιημένων με το RCS, η παράλειψη οπτικής παρατήρησης του πλακιδίου υβριδισμού για να επιβεβαιωθεί η σωστή μεταφορά δείγματος και η παράλειψη διόρθωσης για τυχόν ανεπαρκή μεταφορά δείγματος μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Κλινική απόδοση κατά τον προσυμπτωματικό έλεγχο ασθενών με φυσιολογικά αποτελέσματα κολπικού επιχρίσματος ως βοήθημα στην αξιολόγηση του κινδύνου για διαχείριση των ασθενών

Περιγράφονται παρακάτω τα αποτελέσματα 8 ανεξάρτητων κλινικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν από εξέχοντα ιατρικά, ακαδημαϊκά και κρατικά ιδρύματα σε κέντρα στις Ηνωμένες Πολιτείες και στο εξωτερικό. Οι μελέτες χρησιμοποίησαν τις καθιερωμένες μεθόδους Παπανικολάου που ήταν σε χρήση στις χώρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η μελέτη. Σε όλες εκτός από 2 περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα βαθμολόγησης Bethesda για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων Παπανικολάου. Για την αντίστοιχη ορολογία της Ευρωπαϊκής Κοινότητας σχετικά με τον προσυμπτωματικό έλεγχο για καρκίνο του τραχήλου, ανατρέξτε στο έγγραφο European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (Ευρωπαϊκές οδηγίες σχετικά με τη διασφάλιση ποιότητας σε διαγνωστικές εξετάσεις για τον καρκίνο του τραχήλου) (36). Επιπλέον, νόσος του τραχήλου υψηλού βαθμού διαγνώσθηκε μέσω της χρήσης κολποσκοπικά κατευθυνόμενης βιοψίας για κάθε μελέτη. Αυτές οι μελέτες

αξιολόγησαν την κλινική χρησιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA σε σύγκριση με το κολπικό επίχρισμα για γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (γενικά άνω των 30 ετών). Σε όλες εκτός από μία μελέτη πραγματοποιήθηκαν προγνωστικές εξετάσεις HPV χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Σε όλες εκτός από μία μελέτη πραγματοποιήθηκαν προγνωστικές εξετάσεις HPV χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά παρακάτω. Δύο από τις μελέτες πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, 2 στην Ευρώπη, 2 στη Λατινική Αμερική, μία στην Αφρική, και μία στην Ασία.

Συνοψίζεται η απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA που παρατηρήθηκε από 6 συγχρονικές μελέτες (βλ. Πίνακες 11 και 12, παρακάτω) για γυναίκες ηλικίας 30 ετών και άνω και οι οποίες διαγνώσθηκαν με ιστολογικά επιβεβαιωμένη νεοπλασία του τραχήλου υψηλού βαθμού, η οποία ορίζεται ως ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου (CIN) βαθμού 3 ή πιο σοβαρή.

Πίνακας 11. Εκτιμήσεις απόδοσης — ευαισθησία και ειδικότητα

Πληθυσμός	Ευαισθησία (%)				Ειδικότητα (%)		
	n	(n/N)			(n/N)		
		95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI)				95% CI	
		Παπανικολάου μόνο	HPV μόνο	HPV + Παπανικολάου	Παπανικολάου μόνο	HPV μόνο	HPV + Παπανικολάου
Δυτική Ευρώπη 1	759 ²	51.6	96.3	100.0	98.5	96.2	95.1
		(14/27)	(26/27)	(27/27)	(7453/7565)	(7275/7565)	(7193/7565)
		32.0–71.3	81.0–99.9	87.2–100.0	98.2–98.8	95.7–96.6	94.6–95.6
Λατινική Αμερική 1	611 ⁵	58.4	94.8	97.4	98.7	93.9	93.4
		(45/77)	(73/77)	(75/77)	(5962/6038)	(5669/6038)	(5637/6038)
		46.68–69.6	87.2–98.6	90.9–99.7	98.4–99.0	93.3–94.5	92.7–94.0
Λατινική Αμερική 2*	617 ⁶	77.9	89.7	94.1	94.1	94.0	89.9
		(53/68)	(61/68)	(64/68)	(5745/6108)	(5742/6108)	(5490/6108)
		66.2–87.1	79.9–95.8	85.6–98.4	93.4–94.6	93.4–94.6	89.1–90.6
Αφρική	292 ⁵	84.1	89.7	92.5	86.4	80.0	76.4
		(90/107)	(96/107)	(99/107)	(2436/2818)	(2253/2818)	(2152/2818)
		75.8–90.5	82.4–94.8	85.8–96.7	85.1–87.7	78.4–81.4	74.8–77.9
Ασία	193 ⁶	97.6	100.0	100.0	76.3	83.0	68.0
		(41/42)	(42/42)	(42/42)	(1445/1894)	(1572/1894)	(1287/1894)
		87.4–99.9	91.6–100.0	91.6–100.0	74.3–78.2	81.2–85.0	65.8–70.1
ΗΠΑ 1	104 ⁰	50.0	100.0	100.0	97.6	96.2	95.5
		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1013/1038)	(999/1038)	(991/1038)
		1.26–98.7	15.8–100.0	15.8–100.0	96.5–98.4	94.9–97.3	94.0–96.7

* δεδομένα δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA όπου είναι διαθέσιμα, αλλιώς χρησιμοποιούνται δεδομένα HCS· συνδυασμένα δεδομένα.

Πίνακας 12. Εκτιμήσεις απόδοσης — θετική και αρνητική προγνωστική αξία

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

* δεδομένα δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA όπου είναι διαθέσιμα, αλλιώς χρησιμοποιούνται δεδομένα HCS· συνδυασμένα δεδομένα.

Σε όλες τις μελέτες, υπάρχει μια ομοιόμορφη, και συχνά πολύ σημαντική, βελτίωση στην ευαισθησία της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ως προς το τεστ Παπανικολάου μόνο. Όπως με την ευαισθησία, η αρνητική προγνωστική αξία του HPV υπερβαίνει εκείνη του τεστ Παπανικολάου μόνο, σε όλες τις περιπτώσεις, πλησιάζοντας το 100%. Αυτή η αρνητική προγνωστική αξία καταδεικνύει την υψηλή πιθανότητα της απουσίας νόσου του τραχήλου υψηλού βαθμού ή καρκίνου σε γυναίκες με φυσιολογική κυτταρολογία οι οποίες δεν έχουν μόλυνση με HPV.

Αν και η ειδικότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA είναι χαμηλότερη από εκείνη του τεστ Παπανικολάου μόνο, η ανάλυση του λόγου πιθανοτήτων κατέδειξε ότι η παρατηρούμενη μείωση στην ειδικότητα δεν είναι αρκετά σημαντική ώστε να επηρεάσει την κλινική χρησιμότητα της χρήσης της δοκιμασίας για την αναγνώριση γυναικών που βρίσκονται σε μικρό ή σε κανένα κίνδυνο να έχουν ή να αναπτύξουν νόσο του τραχήλου. Παρόλ' αυτά, είναι σημαντικό η απόφαση για παραπομπή μιας ασθενούς σε κολποσκόπηση να βασίζεται σε όλες τις κλινικές πληροφορίες και τις πληροφορίες κινδύνου, καθώς και στο ιστορικό της ασθενούς

που είναι διαθέσιμο στον γιατρό. Σημαντικές μεταβλητές περιλαμβάνουν ιστορικό μόλυνσης με HPV ή/και μη φυσιολογικό κολπικό επίχρισμα, ηλικία κατά την πρώτη σεξουαλική επαφή, αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, και συνυπάρχοντα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (37, 38).

Αν και ο επιπολασμός της νόσου υψηλού βαθμού δεν ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των μελετών από τις οποίες καθορίστηκε η απόδοση, ο επιπολασμός της μόλυνσης με HPV σε έναν πληθυσμό μπορεί να επηρεάσει την απόδοση και τυπικά ποικίλλει με τον πληθυσμό ασθενών. Επιπλέον, ο επιπολασμός της μόλυνσης με HPV έχει καταδειχθεί ότι μειώνεται δραματικά με την ηλικία (17, 24–29, 38–40). Οι θετικές προγνωστικές τιμές μειώνονται όταν εξετάζονται πληθυσμοί με χαμηλό επιπολασμό ή άτομα με μικρό κίνδυνο μόλυνσης.

Πραγματοποιήθηκε διαχρονική ανάλυση με χρήση των αποτελεσμάτων από 2 μελέτες· η μία πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες από το National Cancer Institute (NCI, Εθνικό Ινστιτούτο για τον Καρκίνο) στο Πόρτλαντ, Όρεγκον, και η άλλη πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία στο Laboratoire Pol Bouin C.H.U. (Εργαστήριο Pol Bouin, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο) της Ρένς. Αυτές οι διαχρονικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για να καταδείξουν ότι οι αρνητικές για Παπανικολάου- / αρνητικές για HPV- ασθενείς βρίσκονται σε χαμηλότερο κίνδυνο να έχουν νόσο του τραχήλου σε σύγκριση με τις παραδοσιακά οριζόμενες γυναίκες χαμηλού κινδύνου των οποίων η κατάσταση HPV δεν είναι γνωστή και σε σύγκριση με τις αρνητικές για Παπανικολάου- / θετικές για HPV- ασθενείς (βλ. Πίνακες 13 και 14, παρακάτω).

Πίνακας 13. Διαχρονική ανάλυση — σχετικός κίνδυνος νόσου υψηλού βαθμού

Ομάδα μελέτης	Ηλικία	Ταξινόμηση χαμηλού κινδύνου	n	Περιπτώσεις CIN 3+	Ποσοστό (ανά 100 έτη ασθενών)	Σχετικός κίνδυνος 95% CI
NCI	30 και άνω	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Παπανικολάου*	9429	19	0.048	1.000
	Όλες	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Παπανικολάου*	13,392	44	0.082	1.000
Γαλλία	30 και άνω	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Παπανικολάου†	2026	4	0.099	1.000
	Όλες	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Παπανικολάου†	2650	7	0.136	1.000

* Τρία φυσιολογικά Παπανικολάου επί περίπου 2 έτη.

† Δύο φυσιολογικά Παπανικολάου επί περίπου 2 έτη

Πίνακας 14. Διαχρονική ανάλυση — ποσοστά νόσου στρωματοποιημένα κατά κατάσταση HPV γραμμής βάσης

Ομάδα μελέτης	Ηλικία	Κατάσταση γραμμής βάσης	n	Περιπτώσεις CIN 3+	Ποσοστό (ανά 100 έτη ασθενών)	Σχετικός κίνδυνος 95% CI
NCI	30 και άνω	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV θετικό	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	12,054	28	0.043	1.00
	Όλες	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV θετικό	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	17,594	48	0.056	1.00
Γαλλία	30 και άνω	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV θετικό	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)

Ομάδα μελέτης	Ηλικία	Κατάσταση γραμμής βάσης	n	Περιπτώσεις CIN 3+	Ποσοστό (ανά 100 έτη ασθενών)	Σχετικός κίνδυνος 95% CI
		Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	1696	3	0.084	1.00
	Όλες	Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV θετικό	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Παπανικολάου φυσιολογικό, HPV αρνητικό	2180	3	0.066	1.00

Η κλινική χρησιμότητα του αποτελέσματος της δοκιμασίας HPV καταδεικνύεται περαιτέρω από τον αυξημένο κίνδυνο νόσου του τραχήλου σε γυναίκες θετικές για HPV- σε σύγκριση με γυναίκες αρνητικές για HPV-.

Κλινική απόδοση κατά τον προσυμπτωματικό έλεγχο ασθενών με αποτελέσματα ανάλυσης κολπικού επιχρίσματος ASC-US προκειμένου να προσδιοριστεί η ανάγκη παραπομπής σε κολποσκόπηση

Μια μελέτη με τίτλο «Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears» (Χρησιμότητα της εξέτασης HPV DNA σε επιλεγμένη ομάδα γυναικών με οριακά αποτελέσματα εξέτασης κολπικού επιχρίσματος) πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ το 1996 υπό την επίβλεψη του Kaiser Foundation Research Institute (Ερευνητικό Ινστιτούτο Ιδρύματος Kaiser) και της Kaiser Permanente Medical Group (Ιατρική ομάδα Kaiser Permanente). Ελήφθησαν τραχηλικά δείγματα για εξετάσεις κολπικού επιχρίσματος ρουτίνας και για τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA από γυναίκες οι οποίες επισκέπτονταν την κλινική Kaiser. Τα αρχικά κολπικά επιχρίσματα αξιολογήθηκαν σύμφωνα με την ταξινόμηση Bethesda. Για την αντίστοιχη ορολογία της Ευρωπαϊκής Κοινότητας σχετικά με τον προσυμπτωματικό έλεγχο για καρκίνο του τραχήλου, ανατρέξτε στο έγγραφο European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (Ευρωπαϊκές οδηγίες σχετικά με τη διασφάλιση ποιότητας σε διαγνωστικές εξετάσεις για τον καρκίνο του τραχήλου) (42). Οι γυναίκες (15 ετών και άνω) οι οποίες κατόπιν εξέτασης κολπικού επιχρίσματος παρουσίασαν «άτυπα κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας» (ASC-US) παραπέμφθηκαν σε κολποσκόπηση και βιοψία. Τα κολποσκοπικά κατευθυνόμενα ιστολογικά δείγματα εξετάστηκαν από παθολογοανατόμους και στη συνέχεια έγινε μια πρώτη διάγνωση. Κάθε ιστολογικό δείγμα επανεξετάστηκε επίσης από ανεξάρτητο παθολογοανατόμο και για τις ασυμφωνίες μεταξύ της αρχικής εξέτασης και της ανεξάρτητης εξέτασης αποφάνθηκε ένας τρίτος παθολογοανατόμος.

Το αρχικό δείγμα εξετάστηκε με ένα πρωτότυπο της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA που περιείχε ανιχνευτές για 11 από τους 13 τύπους HPV (εξαιρουμένων των τύπων HPV 59 και 68). Αυτή η διαφορά δεν αναμενόταν να οδηγήσει σε σημαντικά διαφορετικό προφίλ απόδοσης για τη δοκιμασία.

Διαθέσιμα ήταν τα αποτελέσματα δοκιμασίας HPV DNA υψηλού κινδύνου και οι ιστολογικές διαγνώσεις από 885 γυναίκες με κολπικό επίχρισμα ASC-US. Στην πλειοψηφία των ασθενών η εξέταση πραγματοποιήθηκε με δείγματα τα οποία ελήφθησαν σε STM και σε διάλυμα PreservCyt. Εξαιτίας των ομοιοτήτων στα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για το STM και το διάλυμα PreservCyt, η απόδοση παρουσιάζεται μόνο για το διάλυμα PreservCyt.

Μεταξύ εκείνων που παρουσίασαν κολπικό επίχρισμα με παραπομπή λόγω ASC-US, η αρνητική προγνωστική αξία της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για παρουσία HSIL ή υψηλότερης νόσου στην κολποσκόπηση είναι 99% (βλ. Πίνακα 15, παρακάτω).

Πίνακας 15. Σύγκριση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA έναντι συναινετικής ιστολογίας· πληθυσμός Παπανικολάου με παραπομπή λόγω ASC-US· μελέτη Kaiser, δείγματα PreservCyt

		HSIL ή υψηλότερο κατά το χρόνο της κολποσκόπησης		Σύνολο
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Σύνολο		71	814	885

Ευαισθησία [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)
 95% CI = 84,3–97,7
 Ειδικότητα [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)
 95% CI = 57,7–64,4
 Επιπολασμός νόσου = 8,0% (71/885)
 Θετική προγνωστική αξία δοκιμασίας = 17,2% (66/383)
 Αρνητική προγνωστική αξία δοκιμασίας = 99,0% (497/502)

Καθορίστηκε η θεωρητική θετική και αρνητική προγνωστική τιμή με βάση τους διάφορους επιπολασμούς για ένα αρχικό αποτέλεσμα ASC-US που βρέθηκε ότι ήταν HSIL ή υψηλότερο βάσει των αποτελεσμάτων δοκιμασίας HPV υψηλού κινδύνου (βλ. Πίνακα 16, παρακάτω).

Πίνακας 16. Θεωρητική θετική και αρνητική προγνωστική τιμή δοκιμασιών HPV υψηλού κινδύνου των αποτελεσμάτων κολπικού επιχρίσματος ASC-US

Θεωρητικός επιπολασμός για HSIL	Αρχικό αποτέλεσμα κολπικού επιχρίσματος ASC-US	
	Θετική προγνωστική αξία δοκιμασίας	Αρνητική προγνωστική αξία δοκιμασίας
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

Καθορίστηκε η διακύμανση μεταξύ των διάφορων ηλικιακών ομάδων που συμπεριλήφθηκαν σε αυτήν τη μελέτη (βλ. Πίνακα 17, παρακάτω).

Πίνακας 17. Δεδομένα μελέτης Kaiser: Απόδοση δοκιμασίας digene HC2 High-Risk HPV DNA έναντι αποτελεσμάτων συναινετικής ιστολογίας (HSIL) — χαρακτηριστικά ειδικά για την ηλικία

	Ηλικία <30	Ηλικία 30–39	Ηλικία >39
n	287	233	365
Επιπολασμός νόσου (%)	12.2	11.2	2.7
Ευαισθησία (%) (n/N)	100 (35/35)	88.46 (23/26)	80.0 (8/10)
95% CI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Ειδικότητα (%) (n/N)	31.4 (79/252)	66.2 (132/207)	79.15 (281/355)
95% CI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Αρνητική προγνωστική αξία (%) (n/N)	100.0 (79/79)	97.86 (137/140)	99.29 (281/283)
Θετική προγνωστική αξία (%) (n/N)	16.83 (35/208)	24.73 (23/93)	9.76 (8/82)

Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα για τον προσδιορισμό του κινδύνου νόσου υψηλού βαθμού σε γυναίκες με κολπικό επίχρισμα LSIL ή HSIL

Μια πολυκεντρική κλινική μελέτη με εφαρμογή της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA πραγματοποιήθηκε με χρήση δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε ορισμένα μεγάλα νοσοκομεία τραχηλικών νόσων και HPV και από τα τμήματα κολποσκόπησης ιατρικών κέντρων (3 τοποθεσίες) στις δυτικές και νότιες Ηνωμένες Πολιτείες. Η εξέταση HPV πραγματοποιήθηκε σε 3 ερευνητικά κέντρα ανεξάρτητα από τις κλινικές κολποσκόπησης όπου έγινε η συλλογή των δειγμάτων. Ο πληθυσμός αυτής της κλινικής μελέτης περιλάμβανε γυναίκες στις οποίες είχε

διαγνωσθεί LSIL ή HSIL κατόπιν εξέτασης κολπικού επιχρίσματος και οι οποίες παραπέμφθηκαν σε συμπληρωματική κολποσκόπηση. Σε σύνολο 702 ασθενών που εντάχθηκαν στη μελέτη, 327 παρουσίασαν αποτελέσματα κολπικού επιχρίσματος υψηλότερα από ASC-US και είχαν επαρκείς διαθέσιμες πληροφορίες. Από αυτές, οι 96 παρουσίασαν τελικό στάδιο νόσου HSIL ή υψηλότερο.

Δείγματα απολεπισμένων τραχηλικών κυττάρων ελήφθησαν είτε με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA και μετά τοποθετήθηκαν σε STM, είτε με δειγματολήπτη τύπου σαρώθρου ο οποίος στη συνέχεια ξεπλύθηκε σε διάλυμα PreservCyt. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά την κολποσκόπηση. Τα δείγματα εξετάστηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το στάδιο της νόσου που προσδιορίστηκε για κάθε ασθενή. Το στάδιο της νόσου βασίστηκε στα αποτελέσματα της ιστολογικής αξιολόγησης. Ωστόσο, σε περίπτωση αρνητικής ιστολογικής εξέτασης ή απουσίας ιστολογικού αποτελέσματος, το στάδιο της νόσου προσδιορίστηκε από κυτταρολογική εξέταση κατά την κολποσκόπηση (βλ. Πίνακα 18, παρακάτω).

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA διεξήχθη σε 3 μεγάλα μητροπολιτικά ιατρικά κέντρα ανεξάρτητα από τους τόπους συλλογής των δειγμάτων κατά την κολποσκόπηση. Η κυτταρολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε σε παθολογοανατομικό εργαστήριο αναφοράς, ενώ η ιστολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε στα ιδρύματα όπου έγινε η κολποσκόπηση. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων συγκρίθηκαν με το στάδιο της νόσου προκειμένου να εκτιμηθεί η ευαισθησία, η ειδικότητα και οι αρνητικές και θετικές προγνωστικές τιμές της δοκιμασίας για την ανίχνευση τραχηλικής νεοπλασίας υψηλού βαθμού. Εξαιτίας των ομοιοτήτων στα χαρακτηριστικά απόδοσης μεταξύ των δοκιμασιών *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για το STM και το διάλυμα PreservCyt, η απόδοση της δοκιμασίας παρουσιάζεται μόνο για τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt. Δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά στα αποτελέσματα δοκιμασιών HPV υψηλού κινδύνου μεταξύ δειγμάτων σε STM και δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt.

Πίνακας 18. Αλγόριθμος κατάστασης νόσου ασθενούς

Κυτταρολογικό αποτέλεσμα	Ιστολογικό αποτέλεσμα	Κατάσταση νόσου
Αρνητικό	Αρνητικό ή δεν διενεργήθηκε*	Αρνητικό
LSIL	Αρνητικό	LSIL
HSIL	Αρνητικό	HSIL
Καρκίνος	Αρνητικό	HSIL+
Αρνητικό	LSIL	LSIL
LSIL	Δεν διενεργήθηκε*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Καρκίνος	LSIL	LSIL
Αρνητικό	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Δεν διενεργήθηκε*	HSIL
Καρκίνος	HSIL	HSIL
Αρνητικό	Καρκίνος	HSIL+
LSIL	Καρκίνος	HSIL+
HSIL	Καρκίνος	HSIL+
Καρκίνος	Δεν διενεργήθηκε*	HSIL+
Καρκίνος	Καρκίνος	HSIL+

* Βιοψία ή/και ενδοτραχηλική απόξεση (ECC) δεν διενεργήθηκαν λόγω του ότι δεν παρατηρήθηκαν ανωμαλίες κατά την κολποσκόπηση ή το ιστολογικό αποτέλεσμα δεν ήταν διαθέσιμο.

Η απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA προσδιορίστηκε με χρήση 327 δειγμάτων PreservCyt, 96 από τα οποία συλλέχθηκαν από γυναίκες που διαγνώστηκαν με νόσο του τραχήλου υψηλού βαθμού (βλ. Πίνακες 19 και 20, παρακάτω). Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας όλες τις ασθενείς της μελέτης με παραπομπή λόγω μη φυσιολογικών αποτελεσμάτων κολπικού επιχρίσματος.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα δοκιμασιών HPV υψηλού κινδύνου

		Τελική κατάσταση νόσου HSIL		Τελική κατάσταση νόσου LSIL		Τελική κατάσταση νόσου αρνητική		Σύνολο
		+	-	+	-	+	-	
Αποτέλεσμα κολπικού επιχρίσματος με παραπομπή	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Σύνολο	89	7	107	47	33	44	327
	Σύνολο	96		154		77		327

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA κατέδειξε περίπου 93% συνολική ευαισθησία για την αναγνώριση γυναικών με νεοπλασία υψηλού βαθμού σε πληθυσμό που παραπέμφθηκε για κολποσκόπηση με βάση διάγνωση κολπικού επιχρίσματος LSIL, HSIL ή ισοδύναμη (βλ. Πίνακα 20, παρακάτω). Η δοκιμασία κατέδειξε επίσης αρνητική προγνωστική αξία σχεδόν 95% σε αυτόν τον πληθυσμό.

Πίνακας 20. Χαρακτηριστικά απόδοσης δοκιμασιών HPV DNA υψηλού κινδύνου μεταξύ ασθενών με κολπικό επίχρισμα με παραπομπή για LSIL ή υψηλότερο και τελική κατάσταση νόσου HSIL

		Τελική κατάσταση νόσου		Σύνολο
		HSIL	LSIL ή αρνητικό	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Σύνολο	96	231	327

Ευαισθησία [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
 95% CI = 85,6-97,0
 Ειδικότητα [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
 95% CI = 33,1-46,0
 Επιπολασμός νόσου για παραπομπή LSIL σε τελική HSIL = 21,4%
 Επιπολασμός νόσου για παραπομπή HSIL σε τελική HSIL = 46,6%
 Συνολική θετική προγνωστική αξία = 38,9% (89/229)
 Συνολική αρνητική προγνωστική αξία = 92,8% (91/98)

Ενώ η ειδικότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA φαίνεται κάπως χαμηλή, μια αυστηρή συσχέτιση μεταξύ της απουσίας νεοπλασίας και ενός αρνητικού αποτελέσματος HPV δεν αναμένεται. Το HPV DNA μπορεί να είναι παρόν σε γυναίκες που δεν έχουν προχωρήσει σε νόσο υψηλότερου βαθμού. Στην πραγματικότητα, όταν πραγματοποιήθηκε δοκιμασία HPV αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (δοκιμασία με ερευνητική χρήση μόνο) σε δείγματα με θετικά αποτελέσματα δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA και των οποίων

η αντίστοιχη κατάσταση νόσου ήταν χαμηλότερη από νεοπλασία χαμηλού βαθμού, σχεδόν 75% ήταν θετικά.

Καθορίστηκαν οι θεωρητικές θετικές και αρνητικές προγνωστικές τιμές της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για αρχικά αποτελέσματα κολπικού επιχρίσματος LSIL ή HSIL που βρέθηκαν ότι είναι HSIL ή πιο σοβαρή νόσος κατά την κολποσκόπηση (βλ. Πίνακα 21, παρακάτω).

Πίνακας 21. Θεωρητική θετική και αρνητική προγνωστική τιμή της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA αρχικών αποτελεσμάτων κολπικού επιχρίσματος LSIL ή HSIL

Θεωρητικός επιπολασμός για HSIL	Αρχικό αποτέλεσμα κολπικού επιχρίσματος LSIL ή HSIL	
	Θετική προγνωστική αξία δοκιμασίας	Αρνητική προγνωστική αξία δοκιμασίας
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

Απόδοση της συλλογής από τον ιατρό ή αυτολήψης κολπικών δειγμάτων

Στη βιβλιογραφία που αναφέρεται για την απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA από κολπικά δείγματα που λαμβάνονται με αυτολήψη, εντάχθηκαν πάνω από 141.000 γυναίκες ηλικίας μεταξύ 16–54 ετών. Οι κοόρτες της μελέτης περιλάμβαναν γυναίκες από την Κίνα (41, 42), το Μεξικό (43, 44) και το Ηνωμένο Βασίλειο (45). Οι σχεδιασμοί της μελέτης είχαν ελαφρές διακυμάνσεις, αλλά σε γενικές γραμμές προσφέρθηκε στις γυναίκες με θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας περαιτέρω εξέταση μέσω κολποσκόπησης, και αναφέρθηκαν αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα έναντι της συγκριτικής μεθόδου.

Σε δύο μελέτες όπου υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για τη σύγκριση των δειγμάτων που λαμβάνονται με αυτολήψη έναντι των δειγμάτων που συλλέγονται από γιατρό, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν υψηλή ευαισθησία για το CIN2+ και για τις δύο μεθόδους (42, 45), 81–85% για δείγματα που λαμβάνονται με αυτολήψη έναντι 96–100% για δείγματα που συλλέγονται από

γιατρό. Τα αποτελέσματα ειδικότητας ήταν παρόμοια για το CIN2+ και για τις δύο μεθόδους (42, 45), 81–82% για τα δείγματα που λαμβάνονται με αυτολήψη έναντι 83–85% για τα δείγματα που συλλέγονται από γιατρό. Σε άλλες μελέτες με διαθέσιμα δεδομένα απόδοσης μόνο για αυτολήψη, η απόδοση ευαισθησίας της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για το CIN2+ ήταν 3,4 φορές υψηλότερη από ότι η κυτταρολογική εξέταση (43) και 98% ευαισθησία πριν την προσαρμογή επαλήθευσης για μεροληψία (44).

Αναλυτική ευαισθησία

Ένα μη κλινικό σετ κλωνοποιημένων πλασμιδίων DNA HPV εξετάστηκε προκειμένου να καθοριστεί κατά πόσο καθένας από τους 13 τύπους HPV είναι ανιχνεύσιμος από τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA και προκειμένου να προσδιοριστεί η αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας για καθέναν από τους τύπους HPV. Κάθε συγκέντρωση-στόχος HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml και 0,2 pg/ml) από καθέναν από τους 13 τύπους HPV DNA (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68) εκτελέστηκε εις τριπλούν. Η μέση τιμή RLU για κάθε συγκέντρωση του εκάστοτε τύπου HPV υπολογίστηκε και συγκρίθηκε με το θετικό βαθμονομητή.

Καθορίστηκε το ανιχνεύσιμο όριο κάθε τύπου HPV σε STM (βλ. Πίνακα 22, παρακάτω). Τα ανιχνεύσιμα όρια κυμάνθηκαν μεταξύ 0,62 pg/ml και 1,39 pg/ml, ανάλογα με τον υπό εξέταση τύπο HPV. Το μέσο ανιχνεύσιμο όριο όλων των 13 τύπων HPV DNA ήταν 1,08 pg/ml με τυπική απόκλιση της τάξης του 0,05 pg/ml.

Πίνακας 22. Περίληψη των ανιχνεύσιμων ορίων ευαισθησίας για κάθε τύπο HPV DNA σε STM

Τύπος HPV DNA	Ανιχνεύσιμη συγκέντρωση HPV DNA (pg/ml)	Τυπική απόκλιση	95% CI
16	1.09	0.06	0.94–1.29
18	1.05	0.05	0.88–1.29
31	1.01	0.05	0.91–1.15
33	1.35	0.02	1.26–1.45
35	1.11	0.05	0.95–1.31
39	1.39	0.09	1.16–1.71
45	1.14	0.04	0.99–1.35
51	0.78	0.10	0.70–0.88
52	1.37	0.06	1.21–1.58
56	0.62	0.04	0.58–0.67
58	0.82	0.04	0.73–0.94
59	1.10	0.06	1.00–1.21
68	1.19	0.04	1.03–1.39
Μέση τιμή (όλοι οι τύποι)	1.08	0.05	0.95–1.25

Ισοδυναμία μεταξύ τύπων δειγμάτων

Ισοδυναμία μεταξύ δειγμάτων STM και PreservCyt

Η ισοδυναμία μεταξύ δειγμάτων σε STM και PreservCyt εξετάστηκε για ίση ανάκτηση του HPV 18 DNA. Περίπου 10^6 θετικά κύτταρα HeLa τα οποία περιείχαν ενσωματωμένα γονιδιώματα HPV 18 εισήχθησαν σε STM και σε δεξαμενή αρνητικών κυττάρων σε PreservCyt. Η επεξεργασία κάθε τύπου δείγματος έγινε σύμφωνα με τις αντίστοιχες διαδικασίες προετοιμασίας δείγματος και αποδιάταξης που περιγράφονται στις κατάλληλες οδηγίες χρήσης και εξετάστηκε με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάκτηση του HPV 18 DNA από ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος είναι ισοδύναμη για τα δύο μέσα και ότι η προετοιμασία δείγματος του διαλύματος PreservCyt δεν επηρεάζει την αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIAAsymphony DSP HPV Media

Διενεργήθηκαν μελέτες με χρήση δειγμάτων PreservCyt που συλλέχθηκαν από έναν υποπληθυσμό γυναικών με φυσιολογική κυτταρολογία (n=1.276) και έναν πληθυσμό γυναικών

με κυτταρολογία ASC-US ή υψηλότερη από ASC-US (n=402). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος για προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media συνοδευόμενη από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (βλ. Πίνακα 23, παρακάτω).

Πίνακας 23. Συμφωνία αποτελεσμάτων δειγμάτων PreservCyt μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δειγμάτων και προετοιμασίας δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media (n=1.678)

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO $\geq 2,5$)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO $< 0,8$)
96.0	97.6	96.2	99.1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα δοκιμασίας των δειγμάτων PreservCyt που προετοιμάστηκαν με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media συσχετίζεται σε υψηλό βαθμό με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με χρήση της μεθόδου χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος, όπως φαίνεται από το χαμηλότερο όριο του 95% CI τόσο για θετική όσο για αρνητική συμφωνία.

Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες με χρήση δειγμάτων PreservCyt που συλλέχθηκαν από έναν υποπληθυσμό γυναικών ηλικίας 30 ετών και άνω με φυσιολογική κυτταρολογία (n=1.901) και έναν υποπληθυσμό γυναικών με κυτταρολογία ASC-US (n=398). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος για προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA συνοδευόμενη από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (βλ. Πίνακα 24, παρακάτω).

Πίνακας 24. Συμφωνία αποτελεσμάτων δειγμάτων PreservCyt μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δειγμάτων και προετοιμασίας δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA (n=2.299)

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO $\geq 2,5$)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO $< 0,8$)
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα δοκιμασίας των δειγμάτων PreservCyt που προετοιμάστηκαν με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA συσχετίζεται σε υψηλό βαθμό με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με χρήση της μεθόδου χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος, όπως φαίνεται από το χαμηλότερο όριο του 95% CI τόσο για θετική όσο για αρνητική συμφωνία.

Ισοδυναμία μεταξύ STM και χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath

Πραγματοποιήθηκε κλινική αξιολόγηση δύο φάσεων χρησιμοποιώντας 6 κέντρα συλλογής και 3 τοποθεσίες δοκιμασίας στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ασθενείς που επισκέφθηκαν μια κλινική για ΣΜΝ, μαιευτική/γυναικολογική κλινική, κλινική κολποσκοπησης, νοσοκομείο, ή κέντρο οικογενειακού προγραμματισμού είναι επιλέξιμες για ένταξη σύμφωνα με τα προκαθορισμένα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού. Στη φάση σκοπιμότητας, που σκοπό είχε να καθορίσει μια κατάλληλη τιμή CO της δοκιμασίας digene HC2 High-Risk HPV DNA για χρήση με δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath, εντάχθηκαν περίπου 400 ασθενείς. Η φάση κλινικής επικύρωσης, στην οποία εντάχθηκαν περίπου 1.500 ασθενείς για την επικύρωση της επιλεγμένης τιμής CO, ξεκίνησε μετά από μια ενδιάμεση ανάλυση της φάσης σκοπιμότητας και κατέδειξε ότι μια τιμή CO 1,0 RLU/CO χρησιμοποιώντας δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath έδωσε αποδεκτή συμφωνία με τα αποτελέσματα δειγμάτων STM.

Και στις δύο φάσεις αξιολόγησης, ζευγαρωμένα τραχηλικά δείγματα SurePath και STM συλλέχθηκαν από κάθε συμμετέχουσα γυναίκα με τη συναίνεσή της. Το δείγμα SurePath στάλθηκε στη συνέχεια στο κυτταρολογικό εργαστήριο και προετοιμασία αντικειμενοφόρου. Μετά την κυτταρολογική προετοιμασία, τα υπόλοιπα δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath και το αντίστοιχο δείγμα STM εξετάστηκαν με τη δοκιμασία digene HC2 High-Risk HPV DNA χρησιμοποιώντας τιμή CO 1,0 RLU/CO (βλ. Πίνακα 25, παρακάτω).

Πίνακας 25. Συμφωνία αποτελεσμάτων δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με αποτελέσματα δειγμάτων STM (όλες οι ηλικίες και κυτταρολογική ταξινόμηση) (n=1490)

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO ≥ 2,5)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO <0,80)
93.5 (401/429)	96.4 (378/392)	95.3 (1011/1061)	96.0 (1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα δοκιμασίας από την εξέταση δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath συσχετίζεται σε υψηλό βαθμό με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την εξέταση δειγμάτων STM όπως φαίνεται από το χαμηλότερο όριο του 95% CI τόσο για θετική όσο για αρνητική συμφωνία.

Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media

Διενεργήθηκαν μελέτες με χρήση δειγμάτων SurePath που συλλέχθηκαν από τους ακόλουθους υποπληθυσμούς:

- Γυναίκες με φυσιολογική κυτταρολογία (n=1.189)
- Γυναίκες με κυτταρολογία ASC-US ή υψηλότερη από ASC-US (n=199)

Για κάθε δείγμα SurePath, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία δείγματος του δείγματος SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media και χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος του δείγματος σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση. Αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία digene HC2 High-Risk HPV DNA (βλέπε Πίνακα 26, παρακάτω) πραγματοποιήθηκε για καθένα από τα προετοιμασμένα δείγματα.

Πίνακας 26. Συμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων SurePath και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media (n=1.388)

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO $\geq 2,5$)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO $< 0,8$)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα δοκιμασίας των δειγμάτων SurePath που προετοιμάστηκαν με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media συσχετίζεται σε υψηλό βαθμό με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με χρήση της μεθόδου χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος, όπως φαίνεται από το χαμηλότερο όριο του 95% CI τόσο για θετική όσο για αρνητική συμφωνία.

Ισοδυναμία μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath και προετοιμασίας δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media

Διενεργήθηκαν μελέτες με χρήση δειγμάτων SurePath που συλλέχθηκαν από τους ακόλουθους υποπληθυσμούς:

- Γυναίκες με φυσιολογική κυτταρολογική εξέταση (n=1.200)
- Γυναίκες με κυτταρολογική εξέταση ASC-US ή υψηλότερη από ASC-US (n=183)

Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος και προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media πραγματοποιήθηκαν για κάθε δείγμα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath ακολουθούμενες από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία digene HC2 High-Risk HPV DNA (βλέπε Πίνακα 27, παρακάτω).

Πίνακας 27. Συμφωνία αποτελεσμάτων δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath μεταξύ χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος και προετοιμασίας δείγματος με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media (n=1.383)

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρά θετική περιοχή RLU/CO \geq 2,5	Όλα αρνητικά	Ισχυρά αρνητική περιοχή RLU/CO $<$ 0,8
92.6 (188/203) 88.2–95.5	97.4 (147/151) 93.4–99.0	94.4 (1114/1180) 92.9–95.6	99.3 (1078/1086) 98.6–99.6

Η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα δοκιμασίας των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath που προετοιμάστηκαν με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media συσχετίζεται σε υψηλό βαθμό με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με χρήση της μεθόδου χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος, όπως φαίνεται από το χαμηλότερο όριο του 95% CI τόσο για θετική όσο για αρνητική συμφωνία.

Συμφωνία μεταξύ μεθόδων δοκιμασίας

των αποτελεσμάτων κλινικών δοκιμασιών με το RCS σε σύγκριση με τα αποτελέσματα δοκιμασιών με χρήση της χειροκίνητης μεθόδου. Δοκιμασίες διενεργήθηκαν σε 3 τοποθεσίες, εξωτερικά της QIAGEN, με δείγματα ασθενών που συλλέχθηκαν από 5 τοποθεσίες συλλογής. Το σύνολο δεδομένων αποτελείται από 1.269 τραχηλικά δείγματα που συλλέχθηκαν σε διάλυμα PreservCyt και 1.001 δείγματα που συλλέχθηκαν σε STM.

Οι στατιστικές συμφωνίες, μεταξύ των αντιστοιχισμένων δειγμάτων που εξετάστηκαν με το RCS και με τη χειροκίνητη δοκιμασία, υπολογίστηκαν για το συγκεκριμένο πληθυσμό ασθενών (βλ. Πίνακες 28 και 29, παρακάτω).

Πίνακας 28. Περίληψη της συμφωνίας μεταξύ αυτοματοποιημένων με το RCS και χειροκίνητων εξετάσεων — δείγματα STM (n=1.001)

Κυτταρολογική ταξινόμηση	Επιπολασμός HPV (%)	Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
		Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO >2,5)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO <0,8)
WNL* <30 years	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥30 years	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Other	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
All STM specimens	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = εντός φυσιολογικών ορίων.

Πίνακας 29. Περίληψη της συμφωνίας μεταξύ αυτοματοποιημένων με το RCS και χειροκίνητων εξετάσεων — δείγματα PreservCyt (n=1269)

Κυτταρολογική ταξινόμηση	HPV Επιπολασμός (%)	Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
		Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO >2,5)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO <0,8)
WNL <30 ετών	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL ≥30 ετών	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Άλλη κυτταρολογία	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Όλα τα δείγματα PreservCyt*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

*WNL = εντός φυσιολογικών ορίων..

† Κυτταρολογικά δεδομένα μη διαθέσιμα από 4 ασθενείς.

Μια συμπληρωματική κλινική μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση αρχειοθετημένων υπολειπόμενων δειγμάτων PreservCyt που συλλέχθηκαν από έναν υποπληθυσμό γυναικών ηλικίας 30 ετών και άνω με φυσιολογική κυτταρολογία (βλ. Πίνακα 30, παρακάτω) με επιπολασμό HPV 4,8%.

Πίνακας 30. Περίληψη της συμφωνίας μεταξύ αυτοματοποιημένων με το RCS και χειροκίνητων εξετάσεων — γυναίκες WNL ηλικίας 30 ετών και άνω (n=2.077)

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO >2,5)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή (RLU/CO <0,8)
92.0 (92/100)	91.8 (78/85)	99.3 (1964/1977)	99.7 (1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

Υπήρξαν 7 ασύμφωνα αποτελέσματα μεταξύ των αποτελεσμάτων χειροκίνητων και αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων στην ισχυρή θετική περιοχή. Τα αρχικά αποτελέσματα χειροκίνητων εξετάσεων για αυτά τα 7 δείγματα βρίσκονταν εκτός του συνιστώμενου αλγορίθμου επανάληψης δοκιμασίας δειγμάτων PreservCyt· ωστόσο, λόγω του ότι ο σχεδιασμός της μελέτης απαιτούσε την εξέταση όλων των δειγμάτων εις τριπλούν, υπήρχαν διαθέσιμα επαναληπτικά αποτελέσματα για την επίλυση της ασυμφωνίας.

Τα δεδομένα επαναληπτικής εξέτασης για καθένα από τα 7 ασύμφωνα δείγματα υποδηλώνουν ότι όλα τα ασύμφωνα δείγματα είναι αρνητικά για HPV DNA (βλ. Πίνακα 31, παρακάτω). Με βάση τα επαναληπτικά αρνητικά αποτελέσματα που ελήφθησαν και για τα δύο αντίγραφα, καθένα από τα αρχικώς θετικά αποτελέσματα χειροκίνητης δοκιμασίας ήταν πιθανώς ψευδώς θετικό.

Πίνακας 31. Ασύμφωνα δείγματα PreservCyt για γυναίκες WNL ηλικίας 30 ετών και άνω (n=7)

Δείγμα	Τοποθεσία	Χειροκίνητες εξετάσεις (RLU/CO)			Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS (RLU/CO)		
		Αρχικό	Επαναληπτικό 1	Επαναληπτικό 2	Αρχικό	Επαναληπτικό 1	Επαναληπτικό 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Τα αποτελέσματα από αυτήν την κλινική μελέτη υποδεικνύουν μια συνολική συμφωνία μεταξύ αυτοματοποιημένων με το RCS και χειροκίνητων εξετάσεων χρησιμοποιώντας είτε δείγματα

STM είτε PreservCyt.

Αναπαραγωγιμότητα

Συνολική αναπαραγωγιμότητα των χειροκίνητων εξετάσεων

Μια πολυκεντρική μελέτη αναπαραγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας μεταξύ ημερών, μεταξύ τοποθεσιών και συνολικής αναπαραγωγιμότητας της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA χρησιμοποιώντας ένα σετ στόχων HPV DNA και HPV-θετικών και HPV-αρνητικών κλινικών δειγμάτων STM.

Τρία εξωτερικά εργαστήρια πραγματοποίησαν τις εξετάσεις με την ίδια παρτίδα κιτ δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA σε 3 διαφορετικές ημέρες με ένα σετ ταυτόσημης αναπαραγωγιμότητας. Το σετ αναπαραγωγιμότητας περιλάμβανε τα ακόλουθα δείγματα:

- 12 δεξαμενές αποδιαταγμένων κλινικών δειγμάτων STM
- 3 δεξαμενές μη αποδιαταγμένων κλινικών δειγμάτων PreservCyt
- Αρνητικός βαθμονομητής
- Θετικός βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου σε συγκεντρώσεις 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml και 10 pg/ml.

Όλες οι μονάδες του σετ εξετάστηκαν κάθε μέρα εις τριπλούν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA με κλινικά δείγματα είναι πολύ καλή (βλ. Πίνακα 32, παρακάτω).

Πίνακας 32. Συνολική αναπαραγωγιμότητα — πολυκεντρική αναπαραγωγιμότητα (όλες οι εκτελέσεις σε όλες τις τοποθεσίες)

Στατιστικό μέτρο	Αποτέλεσμα
Αναμενόμενα θετικά με παρατηρούμενο θετικό αποτέλεσμα (95% CI)	100.0% (99.0–100.0)
Αναμενόμενα αρνητικά με παρατηρούμενο αρνητικό αποτέλεσμα (95% CI)	99.0% (97.49–99.73)
Συμφωνία (95% CI)	99.5% (98.70–99.86)
Κάππα	0.990

Αναπαραγωγιμότητα με κλινικά δείγματα STM

Χειροκίνητες εξετάσεις

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας των χειροκίνητων εξετάσεων κλινικών δειγμάτων STM με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Ένα σετ 20 μονάδων που αποτελείται από κλινικές δεξαμενές (10 θετικές και 10 αρνητικές) προετοιμάστηκε συνδυάζοντας προηγουμένως εξετασθέντα δείγματα STM. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε αντίγραφα των 4, κάθε μέρα για 5 ημέρες, για ένα σύνολο 20 αντιγράφων ανά δείγμα. Πραγματοποιήθηκαν εξετάσεις με χρήση ενός συνδυασμένου μίγματος ανιχνευτών που αποτελείται από τον ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου και έναν ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου. Η αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας δεν ήταν αναμενόμενο ότι θα διέφερε χρησιμοποιώντας μόνο το μίγμα ανιχνευτών στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Υπολογίστηκαν η μέση τιμή RLU/CO και το 95% CI γύρω από τη μέση τιμή (βλ. Πίνακα 33, παρακάτω).

Πίνακας 33. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων STM — χειροκίνητες εξετάσεις (φθίνουσα σειρά από μέση τιμή RLU/CO)

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

Για τα 5 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO της τάξης του 20% ή μεγαλύτερη άνω της τιμής CO, 100 στα 100 αντίγραφα (100,0%) ήταν θετικά. Για τα 5 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO εντός του 20% άνω ή κάτω της τιμής CO, 60 στα 100 (60%· 95% CI = 49,7–69,6) αντίγραφα ήταν θετικά και 40 στα 100 (40%) ήταν αρνητικά. Για τα 10 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO άνω του 20% ή χαμηλότερα της τιμής CO, 200 στα 200 αντίγραφα (100%) ήταν αρνητικά.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δείγματα κατά 20% ή περισσότερο μακριά από την τιμή CO μπορεί να αναμένεται ότι δίνουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα κοντά στην τιμή CO έδωσαν περίπου ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι οι χειροκίνητες εξετάσεις δειγμάτων STM με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δίνουν αναπαραγωγίμα αποτελέσματα.

Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας εντός εκτέλεσης, από μέρα σε μέρα, και μεταξύ εργαστηρίων των αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων δειγμάτων STM με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Ένα σετ 16 μονάδων συγκεντρωμένων κλινικών δειγμάτων (βλ. Πίνακα 34, παρακάτω) εξετάστηκε χρησιμοποιώντας μία και μόνο παρτίδα αντιδραστηρίων, δύο φορές την ημέρα σε 3 διαφορετικές ημέρες. Κάθε μονάδα του σετ εξετάστηκε εις τετραπλούν..

Πίνακας 34. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων STM — Σύνθεση σετ αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων

Μονάδα σετ	Κατά προσέγγιση RLU/CO	Αναμενόμενο αποτέλεσμα δοκιμασίας
1N	<0.4	Αρνητικό
2N	0.4–0.8	Αρνητικό
3P	0.8–1.2	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
4P	0.8–1.2	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
5P	0.8–1.2	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
6P	1.2–2.0	Χαμηλό θετικό
7P	1.2–2.0	Χαμηλό θετικό
8P	1.2–2.0	Χαμηλό θετικό
9P	2.0–5.0	Χαμηλό θετικό
10P	5.0–10.0	Μεσαίο θετικό
11N	<0.4	Αρνητικό
12N	<0.4	Αρνητικό
13N	<0.4	Αρνητικό
14XR	Θετικό για HPV DNA χαμηλού κινδύνου κλινικό υλικό στην κλινική αρνητική δεξαμενή STM	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
15XR	Πλασμίδιο HPV DNA χαμηλού κινδύνου στην κλινική αρνητική δεξαμενή STM	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
16XR	Μάρτυρας DNA πλασμιδίου φορέα στην κλινική αρνητική δεξαμενή STM	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό

Συμπεριλήφθηκαν δύο μονάδες σετ (14XR και 15XR) για την αξιολόγηση της πιθανότητας διασταυρούμενου υβριδισμού του μίγματος ανιχνευτών της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA με δείγματα που περιέχουν μόνο τους τύπους HPV DNA χαμηλού κινδύνου 6, 11, 42, 43 και 44. Η μονάδα σετ 16XR αποτελείται από pGEM[®] DNA σε συγκέντρωση 1,49 ng/ml και χρησίμευσε ως μάρτυρας ελέγχου για τη μονάδα σετ 15XR. Τα αποτελέσματα αυτών των εξετάσεων δεν έδειξαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα δοκιμασίας λόγω της παρουσίας τύπων HPV DNA χαμηλού κινδύνου στα κλινικά δείγματα. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συμβατά με τις χειροκίνητες εξετάσεις.

Η αναπαραγωγιμότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο έγγραφο NCCLS E5-A* (βλ. Πίνακα 35, παρακάτω). Αυτή η μέθοδος απαιτεί τον υπολογισμό των συνιστωσών διασποράς για καθεμία από τις πηγές μεταβλητότητας: εργαστήριο, ημέρα, εκτέλεση και σφάλμα (καθοριζόμενα ως μεταβλητότητα εντός δοκιμασίας και μεταξύ δοκιμασιών).

Πίνακας 35. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων STM — Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS• ποσοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση				Σύνολο	Συνολικός CV (%)
			Εντός εκτέλεσης	Μεταξύ εκτελέσεων	Μεταξύ ημερών	Μεταξύ εργαστηρίων		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P [†]	70	1.95	N/A [‡]	N/A [‡]	N/A [‡]	N/A [‡]	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Οι αρνητικές συνιστώσες διασποράς είναι ρυθμισμένες ίσες με το μηδέν.

† Δύο μη έγκυρα αντίγραφα για τη μονάδα σετ 8P δεν επέτρεψαν την ανάλυση των συνιστωσών διασποράς λόγω σύγκρισης ομάδων άνισου μεγέθους.

‡ Δ/εφαρμ.: ανάλυση διασποράς αδύνατη λόγω λιγότερων αντιγράφων από άλλες μονάδες του σετ

Αναπαραγωγιμότητα κλινικών δειγμάτων PreservCyt

Χειροκίνητες εξετάσεις

Η αναπαραγωγιμότητα των χειροκίνητων εξετάσεων δειγμάτων PreservCyt με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA καθορίστηκε σε μια μελέτη με χρήση 24 εικονικών δειγμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις HPV DNA. Τα δείγματα αποτελούνταν από διάλυμα PreservCyt και λευκά αιμοσφαίρια, με και χωρίς βακτήρια που περιείχαν πλασμίδιο HPV 16.

Τα δείγματα εξετάστηκαν σε αντίγραφα των 4, κάθε μέρα για 5 ημέρες, για ένα σύνολο 20 αντιγράφων ανά δείγμα. Κάθε μέρα από τις 5 ημέρες της μελέτης, προετοιμαζόταν και εξεταζόταν ένα δείγμα 8 ml από κάθε δείγμα σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του kit *digene* HC2 Sample Conversion. Υπολογίστηκαν η μέση τιμή και το 95% CI (βλ. Πίνακα 36, παρακάτω)..

Πίνακας 36. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — χειροκίνητες εξετάσεις με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων· ποιοτική αναπαραγωγιμότητα (φθίνουσα σειρά από μέση τιμή RLU/CO)

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

Για τα 6 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO της τάξης του 20% ή μεγαλύτερη άνω της τιμής CO, 114 στα 120 αντίγραφα (95,0%) ήταν θετικά. Για τα 7 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO εντός του 20% άνω ή κάτω της τιμής CO, 88 στα 139 (63,3%· 95% CI = 54,3–70,9) αντίγραφα ήταν θετικά και 51 στα 139 (36,7%) ήταν αρνητικά. Για τα 4 δείγματα εντός 10% άνω ή κάτω της τιμής CO, 41 στα 79 (51,9%) αντίγραφα ήταν θετικά και 38 στα 79 (48,1%) ήταν αρνητικά. Για τα 11 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO άνω του 20% ή χαμηλότερα της τιμής CO, 220 στα 220 αντίγραφα (100%) ήταν αρνητικά.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δείγματα κατά 20% ή περισσότερο μακριά από την τιμή CO μπορεί να αναμένεται ότι δίνουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα κοντά στην τιμή CO έδωσαν περίπου ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι οι χειροκίνητες εξετάσεις δειγμάτων PreservCyt με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δίνουν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.

Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων

Μια εσωτερική μελέτη αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κλινικά δείγματα PreservCyt που ελήφθησαν κυρίως από γυναίκες με κυτταρολογικό αποτέλεσμα ASC-US ή υψηλότερο από ASC-US (επιπολασμός HPV 57%). Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 2 κλάσματα· κάθε κλάσμα υποβλήθηκε κατόπιν σε επεξεργασία ξεχωριστά με χρήση του kit *digene* HC2 Sample Conversion και εξετάστηκε εις διπλούν με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Όπως και με άλλες ποιοτικές δοκιμασίες IVD, η μεταβλητότητα στα αποτελέσματα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA που λαμβάνονται από κλινικά δείγματα συσχετίζεται κυρίως με ένα ή ένα συνδυασμό από τα ακόλουθα: συλλογή δειγμάτων, προετοιμασία δοκιμίων, και διαδικασία δοκιμασίας. Λόγω του ότι τα συγκρινόμενα αποτελέσματα δοκιμασίας ελήφθησαν από το ίδιο κλινικό δείγμα, ο πειραματικός σχεδιασμός έλαβε υπόψη τη μεταβλητότητα λόγω της συλλογής δείγματος. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από 2 ξεχωριστά προετοιμασμένα κλάσματα από το ίδιο κλινικό δείγμα (που αναφέρεται παρακάτω ως «μεταξύ προετοιμασμένων κλασμάτων») αντικατοπτρίζει τη διακύμανση λόγω του συνδυασμού της προετοιμασίας των δοκιμίων και της διαδικασίας δοκιμασίας. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από το ίδιο κλάσμα (που αναφέρεται παρακάτω ως «εντός του προετοιμασμένου κλάσματος») αντικατοπτρίζει τη διακύμανση από τη διαδικασία δοκιμασίας μόνο (βλ. Πίνακα 37, παρακάτω).

Πίνακας 37. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — Αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων· ποιοτική αναπαραγωγιμότητα

Ανάλυση	Θετική συμφωνία (%)	Αρνητική συμφωνία (%)	Συνολική συμφωνία (%)	
	(n/N) 95% CI	(n/N) 95% CI	(n/N) 95% CI	
Εντός του προετοιμασμένου κλάσματος	Όλα τα δεδομένα	99.62 (261/262) 97.9–100.0	94.7 (160/169) 90.1–97.5	97.7 (421/431) 95.8–98.9
	Ισχυρές θετικές και ισχυρές αρνητικές περιοχές	100.0 (249/249) 98.5–100.0	98.2 (160/163) 94.7–99.6	99.3 (409/412) 97.9–99.9
Μεταξύ προετοιμασμένων κλασμάτων	Όλα τα δεδομένα	99.6 (264/265) 97.9–100.0	98.2 (163/166) 94.8–99.6	99.1 (427/431) 97.6–99.8
	Ισχυρές θετικές και ισχυρές αρνητικές περιοχές	100.0 (249/249) 98.5–100.0	99.4 (161/162) 96.6–100.0	99.8 (410/411) 98.7–100.0

Μια πρόσθετη μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ποσοτικής αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις προσομοιωμένων δειγμάτων PreservCyt. Στη μελέτη συμμετείχαν τρεις τοποθεσίες δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένης της QIAGEN.

Κάθε εργαστήριο δοκιμασίας πραγματοποίησε τόσο αυτοματοποιημένες με το RCS όσο και χειροκίνητες εξετάσεις της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δύο φορές την ημέρα σε 5 διαφορετικές ημέρες με ένα παρεχόμενο σετ αναπαραγωγιμότητας 6 μονάδων. Κάθε μονάδα σετ αποτελείται από καλλιεργημένα κύτταρα εμβολιασμένα μέσα σε διάλυμα PreservCyt με σκοπό να ληφθεί μια τιμή RLU/CO κατά προσέγγιση (βλ. Πίνακα 38, παρακάτω).

Οι θετικές για HPV DNA μονάδες του σετ προετοιμάστηκαν με προσθήκη κυμαινόμενων ποσοτήτων θετικών για HPV DNA κυττάρων SiHa (από μια εργαστηριακή κυτταρική σειρά). Η αρνητική μονάδα σετ αποτελείται από αρνητικά για HPV κύτταρα Jurkat (από μια διαφορετική εργαστηριακή κυτταρική σειρά). Η τελική κυτταρική συγκέντρωση και των 6 μονάδων σετ ήταν περίπου 5×10^4 κύτταρα/ml.

Πίνακας 38. Αναπαραγωγικότητα δειγμάτων PreservCyt — Αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων· μονάδες σετ ποσοτικής αναπαραγωγικότητας

Μονάδα σετ	Κυτταρικός τύπος	Κατά προσέγγιση RLU/CO	Αναμενόμενο αποτέλεσμα
1N	Jurkat	<1.0	Αρνητικό
2N	Jurkat	<1.0	Αρνητικό
3P	SiHa και Jurkat	5.0–8.0	Χαμηλό θετικό
4P	SiHa και Jurkat	5.0–8.0	Χαμηλό θετικό
5P	SiHa	30.0–50.0	Μεσαίο θετικό
6P	SiHa	200.0	Υψηλό θετικό

Η αναπαραγωγικότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο έγγραφο NCCLS E5-A* (βλ. Πίνακα 39, παρακάτω). Αυτή η μέθοδος απαιτεί τον υπολογισμό των συνιστωσών διασποράς για καθεμία από τις πηγές μεταβλητότητας: εργαστήριο, ημέρα, εκτέλεση και σφάλμα (καθοριζόμενα ως μεταβλητότητα εντός δοκιμασίας και μεταξύ δοκιμασιών). Καθεμία από τις 6 μονάδες σετ εξετάστηκε εις τετραπλούν σε καθεμία από τις 10 εκτελέσεις (2 εκτελέσεις την ημέρα επί 5 ημέρες δοκιμασίας) σε καθένα από τα 3 εργαστήρια δοκιμασίας.

Πίνακας 39. Αναπαραγωγικότητα δειγμάτων PreservCyt — Αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων· ποσοτική αναπαραγωγικότητα

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση				Σύνολο	Συνολικός CV (%)
			Εντός εκτέλεσης	Μεταξύ εκτελέσεων	Μεταξύ ημερών	Μεταξύ εργαστηρίων		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

* Οι αρνητικές συνιστώσες διασποράς είναι ρυθμισμένες ίσες με το μηδέν.

Για να συμπληρωθεί αυτή η αρχική μελέτη αναπαραγωγικότητας με δεδομένα από δείγματα πολύ κοντά στην τιμή Cutoff της δοκιμασίας, πραγματοποιήθηκε μια πρόσθετη μελέτη ακρίβειας σε μια τοποθεσία εξωτερικά της QIAGEN με χρήση του RCS.

Το σετ αποτελείται από 1 αρνητική, 2 αρνητικές ή χαμηλές θετικές, και 2 χαμηλές θετικές μονάδες. Κάθε μονάδα σετ προετοιμάστηκε εμβολιάζοντας καλλιεργημένα κύτταρα Jurkat και SiHa μέσα σε διάλυμα PreservCyt για να ληφθούν οι στοχευόμενες τιμές RLU/CO (βλ. Πίνακα 39, παρακάτω).

Αυτή η εξωτερική τοποθεσία ολοκλήρωσε τις αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις χρησιμοποιώντας μία και μόνο παρτίδα αντιδραστηρίων της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για κάθε εκτέλεση δοκιμασίας, διενεργώντας τη δοκιμασία 2 φορές την ημέρα σε 3 διαφορετικές ημέρες με ένα παρεχόμενο σετ 5 μονάδων προσομοιωμένων δειγμάτων PreservCyt. Κάθε μονάδα σετ χωρίστηκε σε 4 δείγματα και εξετάστηκαν και τα 4 δείγματα στο ίδιο μικροπλακίδιο (βλ. Πίνακα 40, παρακάτω).

Πίνακας 40. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — Αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων· μονάδες σετ ποσοτικής αναπαραγωγιμότητας κοντά στην τιμή CO της δοκιμασίας

Μονάδα σετ	Κατά προσέγγιση	Μονάδα σετ
1N	0.2	Αρνητικό
2N	0.8–1.2	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
3P	0.8–1.2	Υψηλό αρνητικό/χαμηλό θετικό
4P	1.2–2.0	Χαμηλό θετικό
5P	1.2–2.0	Χαμηλό θετικό

Πίνακας 41. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — Αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων· ποσοτική αναπαραγωγιμότητα κοντά στην τιμή CO της δοκιμασίας

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση			Σύνολο	ΣΔ (%)
			Εντός εκτέλεσης	Μεταξύ εκτελέσεων	Μεταξύ ημερών		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Οι αρνητικές συνιστώσες διασποράς είναι ρυθμισμένες ίσες με το μηδέν.

Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media

Μια εσωτερική μελέτη προετοιμασίας δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media διενεργήθηκε με χρήση κλινικών δειγμάτων PreservCyt που ελήφθησαν από γυναίκες με ένα από τα δύο ακόλουθα κυτταρολογικά αποτελέσματα:

- ASC-US ή υψηλότερο από ASC-US
- αρνητικές για ενδοεπιθηλιακή αλλοίωση ή κακοήθεια (NILM)

Δύο δοκίμια αφαιρέθηκαν από κάθε δείγμα. Κάθε δοκίμιο προετοιμάστηκε ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το κιτ QIASymphony DSP HPV Media και τα αποτελέσματα καθορίστηκαν μέσω αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Όπως και με άλλες ποιοτικές δοκιμασίες IVD, η μεταβλητότητα στα αποτελέσματα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA που λαμβάνονται από κλινικά δείγματα συσχετίζεται κυρίως με ένα ή ένα συνδυασμό από τα ακόλουθα: συλλογή δειγμάτων, προετοιμασία δοκιμίων, και διαδικασία δοκιμασίας. Λόγω του ότι τα συγκρινόμενα αποτελέσματα δοκιμασίας ελήφθησαν από το ίδιο κλινικό δείγμα (αναφέρονται ως «μεταξύ δοκιμίων»), ο πειραματικός σχεδιασμός έλαβε υπόψη τη μεταβλητότητα λόγω της συλλογής δείγματος. Η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων (βλ. Πίνακα 42, παρακάτω) που ελήφθησαν από 2 ξεχωριστά προετοιμασμένα δοκίμια από το ίδιο κλινικό δείγμα αντιπροσωπεύει διακύμανση λόγω της προετοιμασίας των δοκιμίων και της διαδικασίας δοκιμασίας.

Πίνακας 42. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media, ποιοτική αναπαραγωγιμότητα μεταξύ δοκιμίων

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	Συνολική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI
99.0 (95/96) 94.3–99.8	96.4 (161/167) 92.4–98.3	97.3 (256/263) 94.6–98.7

Μια πρόσθετη μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων με χρήση προσομοιωμένων δειγμάτων PreservCyt. Η προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media ακολουθήθηκε από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Οι 8 θετικές μονάδες του σετ

προετοιμάστηκαν προσθέτοντας HPV DNA-θετικά SiHa ή HeLa κύτταρα σε HPV DNA-αρνητικά C-33 A κύτταρα σε διάλυμα PreservCyt, ενώ οι 2 HPV DNA-αρνητικές μονάδες του σετ περιείχαν μόνο HPV DNA-αρνητικά C-33 A κύτταρα.

Τρεις διαφορετικοί χειριστές πραγματοποίησαν εξέταση σε μία μεμονωμένη ημέρα με χρήση τριών διαφορετικών οργάνων QIASymphony SP και τριών διαφορετικών παρτίδων του κιτ QIASymphony DSP HPV Media με τις μονάδες σετ 2N, 3E, 5P, 7P και 9P. Οι μονάδες σετ 2N, 3E, 5P και 7P εξετάστηκαν με 18 αντίγραφα σε 3 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 54 σημεία δεδομένων για κάθε μονάδα του σετ. Η μονάδα σετ 9P εξετάστηκε με 16 αντίγραφα σε 3 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 48 σημεία δεδομένων.

Ένας χειριστής πραγματοποίησε τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA σε τρεις διαφορετικές ημέρες με χρήση τριών διαφορετικών οργάνων QIASymphony SP και μίας παρτίδας του κιτ QIASymphony DSP HPV Media με τις μονάδες σετ 1N, 4E, 6P, 8P και 10P. Οι μονάδες σετ 1N, 4E, 6P και 8P εξετάστηκαν με 18 αντίγραφα σε 8 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 144 σημεία δεδομένων για κάθε μονάδα του σετ. Η μονάδα σετ 10P εξετάστηκε με 16 αντίγραφα σε 8 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 128 σημεία δεδομένων.

Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο πάνω από την τιμή CO, 572 στα 572 (100,0%) ήταν θετικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO εντός 20% πάνω ή κάτω από την τιμή CO, 98 στα 198 (49,5%) ήταν θετικά και 100 στα 198 (50,5%) ήταν αρνητικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο κάτω από την τιμή CO, 198 στα 198 (100,0%) ήταν αρνητικά (βλ. Πίνακα 43, παρακάτω).

Πίνακας 43. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media, ποιοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	Κυτταρικός τύπος	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση	Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa και C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa και C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa και C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa και C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa και C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa και C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa και C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa και C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δείγματα κατά 20% ή περισσότερο μακριά από την τιμή CO μπορεί να αναμένεται ότι δίνουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα κοντά στην τιμή CO έδωσαν περίπου ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media ακολουθούμενη από εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δίνει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα της εσωτερικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την αξιολόγηση της ποσοτικής αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την προετοιμασία δειγμάτων των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media (βλ. Πίνακα 44 και Πίνακα 45, παρακάτω).

Πίνακας 44. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media, ποσοτική αναπαραγωγιμότητα με τον ίδιο χειριστή

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση			Εκτιμώμενη συνολική τυπική απόκλιση	Εκτιμώμενος συνολικός CV (%)
			Εντός εκτελέσεων	Μεταξύ εκτελέσεων	Μεταξύ συνδυασμών*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Between combinations of QIASymphony SP instruments and different days.

Πίνακας 45. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media, ποσοτική αναπαραγωγιμότητα κατά την ίδια ημέρα

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση		Εκτιμώμενη συνολική τυπική απόκλιση	Εκτιμώμενος συνολικός CV (%)
			Εντός εκτελέσεων	Μεταξύ εκτελέσεων [†]		
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†] Μια εκτέλεση αποτελείται από ένα συνδυασμό του κιτ QIASymphony DSP HPV Media, ενός οργάνου QIASymphony SP, και ενός χειριστή.

Η ποσοτική αναπαραγωγικότητα είναι πολύ υψηλή όπως υποδεικνύεται από όλες τις τιμές CV που παραμένουν κάτω του 25%. Οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ εκτελέσεων είναι συγκρίσιμες με την αντίστοιχη τιμή εντός εκτελέσεων, το οποίο υποδεικνύει συνεπή αποτελέσματα ανεξάρτητα από το όργανο ή την παρτίδα kit που χρησιμοποιείται.

Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Μια εσωτερική μελέτη προετοιμασίας δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA διενεργήθηκε με χρήση κλινικών δειγμάτων PreservCyt που ελήφθησαν από γυναίκες με κυτταρολογία ASC-US ή NILM. Δύο δοκίμια αφαιρέθηκαν από κάθε δείγμα. Κάθε δοκίμιο προετοιμάστηκε ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το kit QIASymphony DSP AXpH DNA και τα αποτελέσματα καθορίστηκαν μέσω αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Όπως και με άλλες ποιοτικές δοκιμασίες IVD, η μεταβλητότητα στα αποτελέσματα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA που λαμβάνονται από κλινικά δείγματα συσχετίζεται κυρίως με ένα ή ένα συνδυασμό από τα ακόλουθα: συλλογή δειγμάτων, προετοιμασία δοκιμίων, και διαδικασία δοκιμασίας. Λόγω του ότι τα συγκρινόμενα αποτελέσματα δοκιμασίας ελήφθησαν από το ίδιο κλινικό δείγμα (αναφέρονται ως «μεταξύ δοκιμίων»), ο πειραματικός σχεδιασμός έλαβε υπόψη τη μεταβλητότητα λόγω της συλλογής δείγματος. Η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων (βλ. Πίνακα 46, παρακάτω) που ελήφθησαν από 2 ξεχωριστά προετοιμασμένα δοκίμια από το ίδιο κλινικό δείγμα αντιπροσωπεύει διακύμανση λόγω της προετοιμασίας των δοκιμίων και της διαδικασίας δοκιμασίας.

Πίνακας 46. Αναπαραγωγικότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA, ποιοτική αναπαραγωγικότητα μεταξύ δοκιμίων

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	Συνολική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI
95.3 (101/106) 89.4–98.0	96.7 (176/182) 92.3–98.5	96.2 (277/288) 93.3–97.9

Μια πρόσθετη μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αναπαραγωγικότητας των αποτελεσμάτων με χρήση προσομοιωμένων δειγμάτων PreservCyt. Η προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA ακολουθήθηκε από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Τρεις διαφορετικοί χειριστές εκτέλεσαν τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA σε διαφορετικές ημέρες χρησιμοποιώντας διαφορετικά όργανα και διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων με ένα σετ 9-μονάδων. Κάθε μονάδα σετ εξετάστηκε εις διπλούν σε 24 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 48 σημεία δεδομένων για κάθε μονάδα σετ. Οι 8 θετικές μονάδες του σετ προετοιμάστηκαν προσθέτοντας HPV DNA-θετικά SiHa ή HeLa κύτταρα σε HPV DNA-αρνητικά H9 κύτταρα σε διάλυμα PreservCyt, ενώ η HPV DNA-αρνητική μονάδα του σετ περιείχε μόνο HPV DNA-αρνητικά H9 κύτταρα.

Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο πάνω από την τιμή CO, 237 στα 240 (98,8%) ήταν θετικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO εντός 20% πάνω ή κάτω από την τιμή CO, 95 στα 144 (66,0%) ήταν θετικά και 49 στα 144 (34,0%) ήταν αρνητικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο κάτω από την τιμή CO, 48 στα 48 (100,0%) ήταν αρνητικά (βλ. Πίνακα 47, παρακάτω).

Πίνακας 47. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIAAsymphony DSP AXpH DNA, ποιοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	Κυτταρικός τύπος	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση	Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 και HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 και HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 και SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 και SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 και HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 και SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 και HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 και SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δείγματα κατά 20% ή περισσότερο μακριά από την τιμή CO μπορεί να αναμένεται ότι δίνουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα κοντά στην τιμή CO έδωσαν περίπου ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του κιτ QIAAsymphony DSP AXpH DNA ακολουθούμενη από εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δίνει αναπαραγωγίμα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα της εσωτερικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την αξιολόγηση της ποσοτικής αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την προετοιμασία

δείγματος των δειγμάτων PreservCyt με χρήση του kit QIAasymphony DSP AΧρΗ DNA (βλ. Πίνακα 48, παρακάτω).

Πίνακας 48. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων PreservCyt — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIAasymphony DSP AΧρΗ DNA, ποσοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση			Εκτιμώμενη συνολική τυπική απόκλιση	Εκτιμώμενος συνολικός CV (%)
			Εντός εκτελέσεων	Μεταξύ εκτελέσεων	Μεταξύ συνδυασμών*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

* Μεταξύ συνδυασμών των kit δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, των kit QIAasymphony DSP AΧρΗ DNA, του RCS που χρησιμοποιείται, του QIAasymphony SP που χρησιμοποιείται, και χειριστή.

Αναπαραγωγιμότητα κλινικών δειγμάτων SurePath

Χειροκίνητες εξετάσεις

Η αναπαραγωγιμότητα των χειροκίνητων εξετάσεων δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA καθορίστηκε σε μια μελέτη με χρήση 3 διαφορετικών εργαστηρίων. Οι μονάδες του σετ εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας μια τιμή CO 1,0 RLU/CO σε διαφορετικές ημέρες και με διαφορετικές εκτελέσεις χρησιμοποιώντας μια ταυτόσημη ομάδα μονάδων σετ γνωστής θετικής ή αρνητικής κατάστασης για HPV. Το σετ αποτελείται από 5 θετικές, 2 υψηλές αρνητικές/χαμηλές θετικές, και 5 αρνητικές μονάδες.

Κάθε μονάδα σετ προετοιμάστηκε συνδυάζοντας μοναδικά κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν σε υγρό διατήρησης SurePath με γνωστή αρνητική και θετική κατάσταση για HPV με σκοπό τη λήψη των επιθυμητών στοχευόμενων τιμών RLU/CO. Κάθε μονάδα σετ εξετάστηκε εις διπλούν, δύο φορές την ημέρα, για μια περίοδο 5 ημερών σε καθένα από τα 3 συμμετέχοντα εργαστήρια (βλ. Πίνακα 49, παρακάτω).

Πίνακας 49. Αναπαραγωγικότητα δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath — Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος· ποιοτική αναπαραγωγικότητα

Μονάδα σελ	Μέση τιμή RLU/CO	Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS

Η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με χειροκίνητες εξετάσεις. Εξετάστηκαν δύο ξεχωριστά κλάσματα από το ίδιο επεξεργασμένο δοκίμιο (από το ίδιο δείγμα) σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath (βλ. Πίνακα 50, παρακάτω).

Πίνακας 50. Αναπαραγωγικότητα δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath — Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS· συμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ αυτοματοποιημένων με το RCS και χειροκίνητων εξετάσεων

Θετική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI		Αρνητική συμφωνία (%) (n/N) 95% CI	
Όλα θετικά	Ισχυρή θετική περιοχή (RLU/CO ≥2,5)	Όλα αρνητικά	Ισχυρή αρνητική περιοχή
99.0 (417/421)	100.0 (375/375)	97.7 (1057/1079)	98.7 (1050/1064)
97.6–99.7	99.0–100.0	96.9–98.75	97.8–99.28

Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media

Μια μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων με χρήση προσομοιωμένων δειγμάτων SurePath. Η προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media ακολουθήθηκε από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Οι 4 θετικές μονάδες του σετ προετοιμάστηκαν προσθέτοντας HPV DNA-θετικά SiHa κύτταρα σε HPV DNA-αρνητικά H-9 κύτταρα σε υγρό διατήρησης SurePath, ενώ η HPV DNA-αρνητική μονάδα του σετ περιείχε μόνο HPV DNA-αρνητικά H-9 κύτταρα στο υγρό διατήρησης SurePath.

Τρεις διαφορετικοί χειριστές πραγματοποίησαν εξέταση σε 6 διαφορετικές ημέρες με χρήση 3 διαφορετικών οργάνων QIASymphony SP και 3 διαφορετικών παρτίδων του κιτ QIASymphony DSP HPV Media με τις μονάδες σετ 1N, 2E, 3P, 4P και 5P. Οι μονάδες σετ 1N, 2E, 3P και 4P εξετάστηκαν με 18 αντίγραφα σε 37 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 666 σημεία δεδομένων για τις μονάδες σετ 2E και 3P και 665 σημεία δεδομένων για τις μονάδες σετ 1N και 4P. Η μονάδα σετ 5P εξετάστηκε με 16 αντίγραφα σε 37 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 590 σημεία δεδομένων. Τέσσερα σημεία δεδομένων αποκλείστηκαν λόγω ανεπαρκούς όγκου, όπως επισημάνθηκε από το QIASymphony SP κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας δειγμάτων.

Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο πάνω από την τιμή CO, 1921 στα 1921 (100,0%) ήταν θετικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO εντός 20% πάνω ή κάτω από την τιμή CO, 410 στα 666 (61,6%) ήταν θετικά και 256 στα 666 (38,4%) ήταν αρνητικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο κάτω από την τιμή CO, 664 στα 665 (99,8%) ήταν αρνητικά (βλ. Πίνακα 51, παρακάτω).

Πίνακας 51. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων SurePath — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media, ποιοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	Κυτταρικός τύπος	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση	Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa και H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa και H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa και H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa και H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δείγματα SurePath κατά 20% ή περισσότερο μακριά από την τιμή CO μπορεί να αναμένεται ότι δίνουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα SurePath κοντά στην τιμή CO έδωσαν περίπου ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του

kit QIASymphony DSP HPV Media ακολουθούμενη από εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δίνει αναπαραγωγίμα αποτελέσματα..

Τα αποτελέσματα της εσωτερικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την αξιολόγηση της ποσοτικής αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media (βλ. Πίνακα 51, παρακάτω).

Τρεις διαφορετικοί χειριστές πραγματοποίησαν εξέταση σε 6 διαφορετικές ημέρες με χρήση 3 διαφορετικών οργάνων QIASymphony SP και 3 διαφορετικών παρτίδων του kit QIASymphony DSP HPV Media με τις μονάδες σετ 1N, 2E, 3P, 4P και 5P. Οι μονάδες σετ 1N, 2E, 3P και 4P εξετάστηκαν με 18 αντίγραφα, δίνοντας 162 σημεία δεδομένων για κάθε μονάδα του σετ. Η μονάδα σετ 5P εξετάστηκε με 16 αντίγραφα, δίνοντας 144 σημεία δεδομένων (βλ. Πίνακα 52, παρακάτω).

Πίνακας 52. Αναπαραγωγιμότητα δειγμάτων SurePath — προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media, ποσοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση			Εκτιμώμενη συνολική τυπική απόκλιση	Εκτιμώμενος συνολικός CV (%)
			Εντός εκτελέσεων	Μεταξύ ημερών	Μεταξύ συνδυασμών*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

* Μια εκτέλεση αποτελείται από ένα συνδυασμό του kit QIASymphony DSP HPV Media, ενός οργάνου QIASymphony SP, και ενός χειριστή σε μια συγκεκριμένη ημέρα.

Η ποσοτική αναπαραγωγιμότητα είναι πολύ υψηλή όπως υποδεικνύεται από όλες τις τιμές CV που παραμένουν κάτω του 26%. Οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ εκτελέσεων είναι συγκρίσιμες με την αντίστοιχη τιμή εντός εκτελέσεων, το οποίο υποδεικνύει συνεπή αποτελέσματα ανεξάρτητα από το όργανο ή την παρτίδα kit που χρησιμοποιείται.

Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων με χρήση προσομοιωμένων δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά-τη διαβάθμιση SurePath. Η προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media συνοδεύτηκε από αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Χρησιμοποιήθηκε υλικό κυτταρικής καλλιέργειας σε 70% υγρό διατήρησης

SurePath μιμούμενο τα δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath. Οι 4 θετικές μονάδες του σετ προετοιμάστηκαν με προσθήκη HPV DNA-θετικών SiHa κυττάρων σε HPV DNA-αρνητικά H-9 κύτταρα σε υγρό διατήρησης SurePath, ενώ η HPV DNA-αρνητική μονάδα του σετ περιείχε μόνο HPV DNA-αρνητικά H-9 κύτταρα σε υγρό διατήρησης SurePath.

Τέσσερις διαφορετικοί χειριστές πραγματοποίησαν εξέταση 6 διαφορετικές ημέρες χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά όργανα QIASymphony SP και 3 διαφορετικές παρτίδες κιτ QIASymphony DSP HPV Media Kit με μονάδες σετ 1, 2, 3, 4 και 5. Οι μονάδες σετ 1, 2, 3 και 4 εξετάστηκαν με 18 θυγατρικούς κλώνους σε 37 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 666 σημεία δεδομένων για τις μονάδες σετ 1 και 3, και 665 σημεία δεδομένων για τις μονάδες σετ 2 και 4. Δύο σημεία δεδομένων αποκλείστηκαν λόγω ανεπαρκούς όγκου όπως επισημάνθηκαν από το QIASymphony SP κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας δείγματος. Η μονάδα σετ 5 εξετάστηκε με 16 θυγατρικούς κλώνους σε 37 διαφορετικές εκτελέσεις, δίνοντας 592 σημεία δεδομένων.

Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο πάνω από την τιμή CO, 1.923 στα 1.923 (100,0%) ήταν θετικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO εντός 20% πάνω ή κάτω από την τιμή CO, 416 στα 665 (62,6%) ήταν θετικά και 249 στα 665 (37,4%) ήταν αρνητικά. Για μονάδες σετ με μέση τιμή RLU/CO κατά 20% ή περισσότερο κάτω από την τιμή CO, 666 στα 666 (100%) ήταν αρνητικά (βλ. Πίνακα 53, παρακάτω).

Πίνακας 53. Αναπαραγωγιμότητα των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath — προετοιμασία δείγματος με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media· ποιοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	Κυτταρικός τύπος	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση	ΣΔ (%)	Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa και H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa και H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa και H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa και H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath κατά 20% ή περισσότερο μακριά από την τιμή CO μπορεί να αναμένεται ότι δίνουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath κοντά στην τιμή CO έδωσαν περίπου ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η προετοιμασία δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media ακολουθούμενη από εξέταση με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δίνει αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα της εσωτερικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την αξιολόγηση της ποσοτικής αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media.

Τέσσερις διαφορετικοί χειριστές πραγματοποίησαν εξέταση 6 διαφορετικές ημέρες χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά όργανα QIASymphony SP και 3 διαφορετικές παρτίδες κιτ QIASymphony DSP HPV Media Kit με μονάδες σετ 1, 2, 3, 4 και 5. Οι μονάδες σετ 1, 2, 3 και 4 εξετάστηκαν με 18 θυγατρικούς κλώνους, δίνοντας 162 σημεία δεδομένων για κάθε μονάδα του σετ. Η μονάδα σετ 5 εξετάστηκε με 16 θυγατρικούς κλώνους, δίνοντας 144 σημεία δεδομένων (βλέπε Πίνακα 54, παρακάτω).

Πίνακας 54. Αναπαραγωγιμότητα των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath — προετοιμασία δείγματος με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media· ποσοτική αναπαραγωγιμότητα

Μονάδα σετ	n	Μέση τιμή RLU/CO	Τυπική απόκλιση			Εκτιμώμενη συνολική τυπική απόκλιση	Εκτιμώμενος συνολικός CV (%)
			Εντός εκτελέσεων	Μεταξύ ημερών	Μεταξύ συνδυασμών*		
1	162	0.12	0.02	0.00	0.01	0.02	19.80
2	162	1.00	0.08	0.02	0.06	0.10	10.27
3	162	4.99	0.37	0.13	0.38	0.55	11.00
4	162	9.78	0.61	0.23	0.54	0.85	8.72
5	144	26.40	2.19	0.70	1.51	2.75	10.41

* Μεταξύ συνδυασμών διαφορετικών ημερών, χειριστών, παρτίδων κιτ QIASymphony DSP HPV Media και οργάνων QIASymphony SP.

Η ποσοτική αναπαραγωγιμότητα είναι πολύ υψηλή όπως υποδεικνύεται από όλες τις τιμές CV που παραμένουν κάτω του 20%. Οι τυπικές αποκλίσεις μεταξύ εκτελέσεων είναι συγκρίσιμες με την αντίστοιχη τιμή εντός εκτελέσεων, το οποίο υποδεικνύει συνεπή αποτελέσματα ανεξάρτητα από το όργανο ή την παρτίδα κιτ που χρησιμοποιείται

Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Μια συστοιχία βακτηρίων, ιών και πλασμιδίων που εντοπίζεται συχνά στη γυναικεία πρωκτογεννητική οδό, καθώς και μια συλλογή δερμότροπων τύπων HPV για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμοι κλώνοι, υποβλήθηκαν σε δοκιμασία προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο θα υπήρχε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Όλοι οι μικροοργανισμοί εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 1×10^5 και 1×10^7

οργανισμών ανά ml. Το DNA από το οποίο αφαιρέθηκαν ιοί και πλασμίδια εξετάστηκε σε συγκέντρωση 4 ng/ml.

Εξετάστηκαν τα ακόλουθα βακτήρια και όλα έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 ή 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)
- *Neisseria sicca* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (στέλεχος Cowan)

* Αναλύθηκε και το στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη πλασμιδίων (HB101) και ένα κλινικό απομόνωμα *E. coli*.

- Staphylococcus epidermidis
- Streptococcus faecalis (ATCC 14508)
- Streptococcus pyogenes (ATCC 27762)
- Treponema pallidum
- Trichomonas vaginalis
- Ureaplasma urealyticum

Εξετάστηκε το ακόλουθο ιικό ή πλασμιδιακό DNA ή ανθρώπινος ορός και όλα έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

- Αδενοϊός 2
- Κυτταρομεγαλοϊός
- Ιός Epstein-Barr
- Ορός θετικός για επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας Β
- Απλός έρπης Ι
- Απλός έρπης ΙΙ
- Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV, RT DNA)
- Τύποι HPV 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 και 30
- Ιός του πιθήκου τύπου 40 (SV40)

Το μόνο πλασμίδιο που παρουσίασε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ήταν το ρBR322. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του ρBR322 και του μίγματος ανιχνευτών είναι αναμενόμενη δεδομένου ότι είναι δύσκολο να αφαιρεθούν όλα τα πλασμίδια ρBR322 DNA κατά την απομόνωση του ένθετου HPV. Η παρουσία ομόλογων αλληλουχιών ρBR322 έχει αναφερθεί σε ανθρώπινα γεννητικά δείγματα και θα μπορούσαν να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε περίπτωση παρουσίας υψηλών επιπέδων βακτηριακού πλασμιδίου. Ωστόσο, 298 κλινικά δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά κατά τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα λόγω του ρBR322 όταν εξετάστηκαν με ανιχνευτή ρBR322. Συνεπώς, η πιθανότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA εξαιτίας ομόλογων αλληλουχιών ρBR322 σε κλινικά δείγματα εμφανίζεται μικρή.

Διασταυρούμενος υβριδισμός

Δέκα οκτώ διαφορετικοί τύποι HPV (υψηλού κινδύνου και χαμηλού κινδύνου) εξετάστηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA σε συγκεντρώσεις 4 ng/ml HPV DNA. Όλοι οι στόχοι HPV υψηλού κινδύνου ήταν θετικοί. Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης ότι υπάρχει μικρό

ποσοστό διασταυρούμενου υβριδισμού μεταξύ HPV τύπου 6 και 42 και της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Δείγματα ασθενών με υψηλά επίπεδα (4 ng/ml ή υψηλότερα) HPV τύπου 6 ή 42 πιθανόν να έχουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Η κλινική σημασία αυτής της διαπίστωσης είναι ότι οι ασθενείς με τιμές 4 ng/ml ή υψηλότερες από τους τύπους HPV 6 ή 42 πιθανόν να παραπεμφθούν άσκοπα σε κολποσκόπηση.

Η δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA επιπλέον έχει αποδείξει ότι υφίσταται διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με HPV τύπου 40, 53 και 66. Αυτοί οι τύποι είναι σπάνιοι και οι ενδείξεις είναι ανεπαρκείς ώστε να προσδιοριστεί μια ακριβής συσχέτιση μεταξύ λοίμωξης με τους συγκεκριμένους τύπους και ανάπτυξης νόσου υψηλού βαθμού (15). Επίσης έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι σύνθετοι ανιχνευτές, παρόμοιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη δοκιμασία, πιθανόν να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα εξαιτίας διασταυρούμενου υβριδισμού με HPV τύπου 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ή MM9 (35). Παρόλο που αρκετοί από αυτούς τους τύπους HPV είναι σπάνιοι ή καινοφανείς που δεν απαντώνται συχνά με νόσους υψηλού βαθμού, ασθενείς των οποίων τα δείγματα περιέχουν υψηλά επίπεδα HPV DNA αυτών των τύπων πιθανόν να παραπεμφθούν εσφαλμένα σε κολποσκόπηση.

Επίδραση του αίματος και άλλων ουσιών σε δείγματα STM

Η επίδραση του αίματος και άλλων δυναμικών παρεμβατικών προσδιορισμένων ή μη προσδιορισμένων ουσιών εκτιμήθηκε στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Ολικό αίμα, καταιονισμός, αντιμυκητιακές κρέμες και αντισυλληπτική γέλη (παράγοντες οι οποίοι συχνά εντοπίζονται σε τραχηλικά δείγματα) προστέθηκαν σε STM-αρνητικά και STM-θετικά δείγματα (δεξαμενές κλινικών δειγμάτων και μη κλινικά δείγματα) σε συγκεντρώσεις οι οποίες μπορεί να εντοπιστούν σε τραχηλικά δείγματα.

Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με κανέναν από τους τέσσερις παράγοντες σε καμία συγκέντρωση. Ωστόσο, πιθανόν να αναφερθεί ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα σε κλινικά δείγματα με επίπεδα HPV DNA τα οποία αγγίζουν την τιμή CO για τη δοκιμασία (1 pg/ml) εφόσον υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αντιμυκητιακής κρέμας ή αντισυλληπτικής γέλης. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά απίθανο ένα κλινικό δείγμα να αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από μία από αυτές τις ουσίες, δεδομένου ότι ο τράχηλος κατά κανόνα καθαρίζεται πριν από τη λήψη κολπικού επιχρίσματος και για την εξέταση HPV.

Επίδραση του αίματος και άλλων ουσιών σε δείγματα PreservCyt

Χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος

Η επίδραση του αίματος και άλλων δυνητικώς παρεμβατικών προσδιορισμένων ή μη προσδιορισμένων ουσιών οι οποίες πιθανόν να υπάρχουν σε δείγματα PreservCyt εκτιμήθηκε στη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Ολικό αίμα, καταιονισμός, αντι-μυκητιακές κρέμες και αντισυλληπτική γέλη (παράγοντες οι οποίοι συχνά εντοπίζονται σε τραχηλικά δείγματα) προστέθηκαν σε δεξαμενές αρνητικών και θετικών κλινικών δειγμάτων PreservCyt σε συγκεντρώσεις οι οποίες μπορεί να εντοπιστούν σε τραχηλικά δείγματα. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με κανένα από τους 4 παράγοντες σε καμία συγκέντρωση. Επιπλέον, ουσίες οι οποίες ενυπάρχουν σε ορισμένα κλινικά δείγματα δεν εμποδίζουν την ανίχνευση του HPV DNA μέσω της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media

Οι επιδράσεις του αίματος και άλλων ουσιών δυνητικής παρεμβολής σε δείγματα PreservCyt αξιολογήθηκαν με χρήση του kit QIASymphony DSP HPV Media για προετοιμασία δειγμάτων και αυτοματοποιημένες με το RCS εξετάσεις με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Εξετάστηκαν οι επιδράσεις των ακόλουθων δυνητικώς παρεμβατικών ουσιών:

- Αντιμυκητιακή κρέμα
- Αντιφλεγμονώδης κρέμα
- Αίμα
- Αντισυλληπτική γέλη
- Καταιονισμός
- Γυναικεία αποσμητικά υπόθετα
- Λιπαντική γέλη
- Σπερματοκτόνο

Κάθε ουσία προστέθηκε σε αρνητικές και θετικές κλινικές δεξαμενές. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με καμία από τις ουσίες σε συγκεντρώσεις που μπορεί να απαντώνται στα τραχηλικά δείγματα. Ωστόσο, πιθανόν να αναφερθεί ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα σε κλινικά δείγματα με επίπεδα HPV DNA τα οποία αγγίζουν την τιμή CO για τη δοκιμασία εφόσον υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αντιμυκητιακής κρέμας, κολπικής λιπαντικής γέλης, ή αίματος. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά απίθανο ένα κλινικό δείγμα να αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από μία από αυτές τις ουσίες, δεδομένου ότι ο τράχηλος κατά κανόνα καθαρίζεται πριν από τη λήψη κολπικού επιχρίσματος και για την εξέταση HPV.

Προετοιμασία δειγμάτων με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Η επίδραση του ολικού αίματος σε δείγματα PreservCyt αξιολογήθηκε με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA για την προετοιμασία δειγμάτων και τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για την εξέταση. Ορατά αιματηρά κλινικά δείγματα επιλέχθηκαν και εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος όσο και τη μέθοδο αυτοματοποιημένης προετοιμασίας δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν για 238 δείγματα και έδωσαν συνολική συμφωνία 94,12% και μια τιμή p McNemar 0,2850, υποδεικνύοντας απουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ της μεθόδου χειροκίνητης προετοιμασίας δείγματος και της μεθόδου αυτοματοποιημένης προετοιμασίας δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

Εξετάστηκαν οι επιδράσεις των ακόλουθων δυνητικών παρεμβατικών ουσιών:

- Καταιονισμός
- Αντιμυκητιακή κρέμα
- Αντισυλληπτική γέλη
- Μονοπύρηνια κύτταρα ολικού αίματος (PBMC)
- Λιπαντική γέλη
- Γυναικείο σπρέι
- Σπερματοκτόνο
- Μαγνητικά σωματίδια
- Υγρό TopElute

Κάθε ουσία προστέθηκε σε αρνητικές και θετικές κυτταρικές δεξαμενές σε συγκεντρώσεις που μπορεί να απαντώνται στα τραχηλικά δείγματα ή μπορεί να προστεθούν κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του δείγματος. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με οποιαδήποτε από τις ουσίες σε οποιαδήποτε συγκέντρωση. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με την εξαίρεση της αντισυλληπτικής γέλης.

Μη συλλέξετε τραχηλικό δείγμα PreservCyt για αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος με χρήση του kit QIASymphony DSP AXpH DNA σε περίπτωση παρουσίας αντισυλληπτικής γέλης.

Επίδραση του αίματος και άλλων ουσιών σε δείγματα SurePath

Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media

Οι επιδράσεις του αίματος και άλλων πιθανώς παρεμβαλλόμενων ουσιών στα δείγματα SurePath αξιολογήθηκαν με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media για προετοιμασία δείγματος και αυτοματοποιημένη με το-RCS εξέταση με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Εξετάστηκαν οι επιδράσεις των ακόλουθων δυνητικών παρεμβατικών ουσιών:

- Αντιμυκητιακή κρέμα
- Αντιφλεγμονώδης κρέμα
- Αίμα
- Αντισυλληπτική γέλη
- Καταιονισμός
- Γυναικεία αποσμητικά υπόθετα
- Λιπαντική γέλη
- Σπερματοκτόνο

Κάθε ουσία προστέθηκε σε αρνητικές και θετικές κλινικές δεξαμενές. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με καμία από τις ουσίες σε συγκεντρώσεις που μπορεί να απαντώνται στα τραχηλικά δείγματα.

Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με την εξαίρεση των ακόλουθων ουσιών:

- Η αντισυλληπτική γέλη προκάλεσε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση.
- Εάν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση αντιμυκητιακής κρέμας στο δείγμα, μπορεί να αναφερθεί ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στα κλινικά δείγματα με επίπεδα HPV DNA κοντά στην τιμή CO για τη δοκιμασία. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά απίθανο ένα κλινικό δείγμα να αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από αντιμυκητιακή κρέμα, δεδομένου ότι ο τράχηλος κατά κανόνα καθαρίζεται πριν από τη λήψη κολπικού επιχρίσματος και για την εξέταση HPV.

Μη συλλέγετε ένα τραχηλικό δείγμα SurePath για αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος με το κιτ QIASymphony DSP HPV Media σε περίπτωση παρουσίας αντιμυκητιακής κρέμας ή αντισυλληπτικής γέλης.

Προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media

Οι επιδράσεις του αίματος και άλλων πιθανώς παρεμβαλλόμενων ουσιών στα δείγματα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath αξιολογήθηκαν με χρήση του κιτ QIASymphony DSP HPV Media για προετοιμασία δείγματος και αυτοματοποιημένη με το RCS εξέταση με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Εξετάστηκαν οι επιδράσεις των ακόλουθων δυνητικώς παρεμβατικών ουσιών:

- Αντιμυκητιακή κρέμα
- Αντιφλεγμονώδης κρέμα
- Αίμα
- Αντισυλληπτική γέλη
- Καταιονισμός
- Γυναικεία αποσμητικά υπόθετα
- Λιπαντική γέλη
- Σπερματοκτόνο

Κάθε ουσία προστέθηκε σε αρνητικές και θετικές κλινικές δεξαμενές που στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία μέσω του συστήματος BD PrepMate μιμούμενες ένα δείγμα σφαιριδίων κυττάρων μετά τη διαβάθμιση SurePath. Παρατηρήθηκε ένα μεμονωμένο ψευδές θετικό αποτέλεσμα τόσο για αίμα όσο και για αντιμυκητιακή κρέμα· ωστόσο, η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντική παρεμβολή. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με οποιαδήποτε από τις άλλες ουσίες σε συγκέντρωση που μπορεί να απαντηθεί στα τραχηλικά δείγματα.

Ψευδή αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για αντιμυκητιακή κρέμα, αντιφλεγμονώδη κρέμα και αντισυλληπτική γέλη. Μη συλλέγετε ένα τραχηλικό δείγμα SurePath για αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος με το κιτ QIASymphony DSP HPV Media σε περίπτωση παρουσίας αντιμυκητιακής κρέμας, αντιφλεγμονώδους κρέμας ή αντισυλληπτικής γέλης.

Μεταφορά

Το RCS σχεδιάστηκε για να ελαχιστοποιεί τη μόλυνση των δειγμάτων ή τη μεταφορά υπολειμματικής αλκαλικής φωσφατάσης μέσω της χρήσης αναλώσιμων ρυγχών πιπέτας για την αναρρόφηση αντιδραστηρίων και δειγμάτων. Για την επιβεβαίωση αυτού του χαρακτηριστικού σχεδιασμού, η QIAGEN πραγματοποίησε διάφορες μελέτες για να αξιολογηθεί το εάν η χρήση

του RCS αύξανε την πιθανότητα μεταφοράς ή διασταυρούμενης μόλυνσης των δειγμάτων σε σύγκριση με τη χειροκίνητη μέθοδο. Χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλά όργανα RCS για την αξιολόγηση της πιθανότητας μεταφοράς από σύστημα σε σύστημα.

Σε μία μελέτη, 2 ng και 20 ng του πλασμιδίου HPV DNA προστέθηκαν σε υλικό αρνητικού μάρτυρα για την προετοιμασία υψηλών θετικών δειγμάτων STM. Η συγκέντρωση 20 ng/ml δίνει τιμές RLU περίπου 3–5 φορές υψηλότερες από εκείνες του υψηλότερου θετικού κλινικού δείγματος που αναμένεται να παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια κλινικών εξετάσεων ρουτίνας. Αυτά τα προσομοιωμένα υψηλά θετικά δείγματα τοποθετήθηκαν σε ολόκληρο το μικροπλακίδιο σε μοτίβο σκακιέρας σε εναλλαγή με πηγαδάκια που περιείχαν μόνο αρνητικό μάρτυρα (πηγαδάκια δοκιμασίας). Αυτός ο σχεδιασμός εξετάζει τις δυνητικά προσθετικές επιδράσεις διαδοχικών υψηλών θετικών δειγμάτων. Τα μικροπλακίδια εξετάστηκαν στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τόσο τη χειροκίνητη όσο και την αυτοματοποιημένη με το RCS μέθοδο δοκιμασίας. Μετά την επεξεργασία, συγκρίθηκαν οι αριθμοί των ψευδώς θετικών πηγαδιών δοκιμασίας. Η αυτοματοποιημένη με το RCS δοκιμασία δεν έδωσε περισσότερα ψευδώς θετικά πηγαδάκια δοκιμασίας από ό,τι η χειροκίνητη δοκιμασία με αυτά τα προσομοιωμένα δείγματα STM, ακόμα και όταν το μικροπλακίδιο περιείχε υπερβολικά υψηλή ακολουθία θετικών δειγμάτων.

Σε μια δεύτερη αξιολόγηση μεταφοράς, HPV-θετικά δείγματα ασθενούς PreservCyt συνδυάστηκαν για να δημιουργήσουν ένα σετ δειγμάτων με διαφορετικά επίπεδα χημειοφωτάγειας προκειμένου να ληφθούν τιμές RLU/CO αντιπροσωπευτικές του εύρους που αναμένεται κατά τη διάρκεια των αυτοματοποιημένων με το RCS κλινικών εξετάσεων ρουτίνας. Τα θετικά δείγματα κυμαίνονταν από περίπου 200–1.800 RLU/CO. Για την αξιολόγηση της δυνατότητας μεταφοράς, συμπεριλαμβανομένων των πιθανών προσθετικών επιδράσεων των διαδοχικών υψηλών θετικών, αυτές οι θετικές μονάδες σετ τοποθετήθηκαν σε μικροπλακίδια σε μοτίβο σκακιέρας δίπλα σε πηγαδάκια αρνητικού μάρτυρα. Αυτά τα πλακίδια εξετάστηκαν στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την αυτοματοποιημένη με το RCS μέθοδο δοκιμασίας.

Τα αποτελέσματα αυτής της αξιολόγησης μεταφοράς, με χρήση συγκεντρωμένων δειγμάτων ασθενών, υποδεικνύει ένα πιθανό ποσοστό ψευδώς θετικών 0,3% λόγω επιδράσεων μεταφοράς κατά την εκτέλεση αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Η εμπειρία της QIAGEN από τη διεξαγωγή εξετάσεων με συγκεντρωμένα δείγματα PreservCyt υποδεικνύει ότι οι δεξαμενές δειγμάτων ασθενών PreservCyt δημιουργούν δείγματα που δεν παρουσιάζουν όμοια χαρακτηριστικά με τα δείγματα μεμονωμένων ασθενών. Αν και οι επιδράσεις αυτών των δεξαμενών δειγμάτων στην πιθανότητα μεταφοράς για τις αυτοματοποιημένες με το RCS δοκιμασίες είναι άγνωστες, πρόσθετη προκλινική εξέταση των αυτοματοποιημένων με το RCS δοκιμασιών δεν έδειξε αυξημένη πιθανότητα ψευδώς θετικών

αποτελεσμάτων λόγω μεταφοράς. Αυτές οι αξιολογήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση δειγμάτων τεχνητών πλασμιδίων με συγκεντρώσεις DNA σχεδόν 5 φορές υψηλότερες από εκείνες που παρατηρούνται στο κλινικό περιβάλλον.

Μια τρίτη αξιολόγηση μεταφοράς δημιούργησε δείγματα δοκιμασίας προσθέτοντας μια φθορίζουσα χρωστική σε συγκεντρώσεις αντιπροσωπευτικές του δυναμικού εύρους RLU της δοκιμασίας σε μήτρες υποβάθρου που προσέγγιζαν το ιξώδες των κλινικών δειγμάτων και των αντιδραστηρίων δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Αυτά τα δείγματα δοκιμασίας υποβλήθηκαν κατόπιν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας 3 ξεχωριστά όργανα RCS, και αξιολογήθηκε η πιθανότητα μεταφοράς για καθένα από τα ακόλουθα βασικά βήματα διαδικασίας του RCS:

- Μεταφορά δείγματος
- Μεταφορά από πλακίδιο σε πλακίδιο
- Προσθήκη ανιχνευτών
- Ανακίνηση μικροπλακιδίου
- Έκπλυση μικροπλακιδίου

Ο φθορισμός που προέκυψε μετρήθηκε σε μήκος κύματος διέγερσης 485 nm και μήκος κύματος εκπομπής 535 nm, και ήταν αρκετά ευαίσθητος για να ανιχνεύσει ένα συμβάν μεταφοράς της τάξης του 1:20.000, το οποίο θα αντιστοιχούσε σε ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (δηλ. 1 pg στα 20 ng). Τα αποτελέσματα αυτής της αξιολόγησης δεν κατέδειξαν κανένα συμβάν μεταφοράς κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε από τα βασικά βήματα διαδικασίας του RCS που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Σταθερότητα αντιδραστηρίων επί του οργάνου

Η QIAGEN αξιολόγησε τα χαρακτηριστικά απόδοσης των αυτοματοποιημένων με το RCS εξετάσεων με χρήση αντιδραστηρίων που παρέμειναν επί της πλατφόρμας του συστήματος για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Τα αντιδραστήρια που είναι πιθανότερο ότι θα υποστούν παρατεταμένη τοποθέτηση επί του οργάνου περιλαμβάνουν το μίγμα ανιχνευτών, το DR1, το DR2, και το μικροπλακίδιο δέσμευσης.

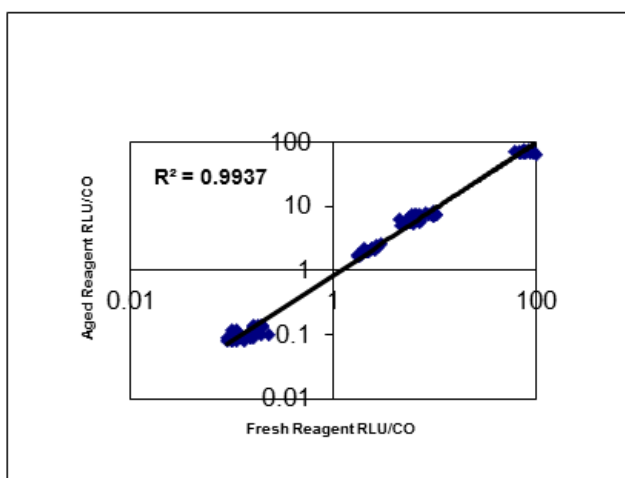
Η απόδοση της δοκιμασίας αξιολογήθηκε με χρήση τόσο φρέσκων προετοιμασμένων αντιδραστηρίων όσο και αντιδραστηρίων που αφέθηκαν επί του οργάνου RCS σε θερμοκρασία δωματίου για μια περίοδο 16 ωρών (προσομοιώνοντας 2 βάρδιες εργασίας στο εργαστηριακό περιβάλλον). Εξετάστηκαν προσομοιωμένα κλινικά δείγματα με χρήση 2 οργάνων RCS κάθε

μέρα επί 2 ημέρες δοκιμασίας με καθορισμένο πίνακα αντιδραστηρίων (βλ. Πίνακα 55, παρακάτω).

Πίνακας 55. Σχεδιασμός μελέτης για σταθερότητα αντιδραστηρίων επί του οργάνου

Όργανο RCS	Ημέρα 1	Ημέρα 2
1	Γηρασμένα αντιδραστήρια	Φρέσκα αντιδραστήρια
2	Φρέσκα αντιδραστήρια	Γηρασμένα αντιδραστήρια

Ένα διάγραμμα όλων των σημείων δεδομένων RLU/CO φαίνεται στην Εικόνα 3, παρακάτω. Το διάγραμμα και η ανάλυση παλινδρόμησης για τα γηρασμένα αντιδραστήρια έναντι των φρέσκων αντιδραστηρίων υποδεικνύουν συμφωνία μεταξύ γηρασμένων και φρέσκων αντιδραστηρίων.



Εικόνα 3. Διάγραμμα σκεδασμού που συγκρίνει τις τιμές βαθμονομητή δοκιμασίας και μάρτυρα χρησιμοποιώντας γηρασμένα και φρέσκα αντιδραστήρια.

Περαιτέρω εξέταση των αποτελεσμάτων συμφωνίας δείχνει ότι δεν άλλαξε κανένα ποιοτικό αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιήθηκαν γηρασμένα αντιδραστήρια (βλ. Πίνακα 56, παρακάτω).

Πίνακας 56. Συμφωνία φρέσκων έναντι γηρασμένων αντιδραστηρίων

Στατιστικό μέτρο	Αποτέλεσμα
Συνολική συμφωνία (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
95% CI	97.97–100.0
Θετική συμφωνία (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
95% CI	97.97–100.0
Αρνητική συμφωνία (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
95% CI	97.97–100.0
R ²	0.9937
Κλίση	0.97
Τομή	0.47
Κάππα	1.0

Τα δεδομένα ανάλυσης δείχνουν ότι τα αποτελέσματα είναι στατιστικά ταυτόσημα για φρέσκα και γηρασμένα αντιδραστήρια, υποδεικνύοντας ότι τα αντιδραστήρια είναι επαρκώς σταθερά όταν τοποθετούνται επί-του οργάνου για μια περίοδο έως 16 ωρών.

Βιβλιογραφία

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

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










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

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

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

Σύμβολα

Σε αυτές τις οδηγίες χρήσης χρησιμοποιούνται τα σύμβολα στον ακόλουθο πίνακα.

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
	Περιέχει υλικό που επαρκεί για 96 δοκιμασίες
	Περιέχει υλικό που επαρκεί για 384 δοκιμασίες
	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Αριθμός καταλόγου
	Κατασκευαστής
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα
	Ημερομηνία λήξης
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Σχόλια και προτάσεις

Παρατηρείται εσφαλμένη ή καμία χρωματική αλλαγή κατά την αποδιάταξη.

- | | |
|--|---|
| α) Ακατάλληλη προετοιμασία του DNR | Βεβαιωθείτε ότι το DNR περιέχει το χρωματικό δείκτη και έχει σκούρο μοβ χρώμα. |
| β) Δεν προστέθηκε DNR | Βεβαιωθείτε ότι έχει προστεθεί DNR στο δείγμα μετρώντας τον όγκο του δείγματος (ο οποίος πρέπει να ανέρχεται σε 1,5 ml). Εάν ο όγκος υποδεικνύει ότι δεν έχει προστεθεί DNR, κάντε τη σωστή προσθήκη, αναμίξτε και προχωρήστε με τη δοκιμασία εφόσον παρατηρείται η κατάλληλη χρωματική αλλαγή. |
| γ) Το δείγμα περιέχει αίμα ή άλλες ουσίες που συγκαλύπτουν τη χρωματική αλλαγή | Η ακριβής χρωματική αλλαγή που περιγράφεται δεν αναμένεται με αυτούς τους τύπους δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν θα πρέπει να επηρεάζονται δυσμενώς. |
| δ) Το pH του δείγματος πιθανόν να είναι ασυνήθιστα όξινο | Εάν δεν ισχύει καμία από τις προηγούμενες αιτίες, το δείγμα πιθανόν να είναι ασυνήθιστα όξινο και η αναμενόμενη χρωματική αλλαγή δεν θα εμφανιστεί. Συλλέξτε ένα νέο δείγμα πριν από την εφαρμογή οξικού οξέος στον τράχηλο, δεδομένου ότι το ακατάλληλο pH του δείγματος θα επηρεάσει δυσμενώς τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. |

Οι οροί ελέγχου ποιότητας παράγουν εσφαλμένα αποτελέσματα.

- | | |
|--|--|
| α) Λανθασμένη επιλογή πρωτοκόλλου δοκιμασίας για την εξέταση | Εάν το πρωτόκολλο δοκιμασίας είναι ακατάλληλο για την εκτελούμενη δοκιμασία, διαβάστε ξανά το μικροπλακίδιο, εντός 30 λεπτών από την προσθήκη του DR2, χρησιμοποιώντας το σωστό πρωτόκολλο δοκιμασίας. |
| β) Αντίστροφη τοποθέτηση των QC1-LR και QC2-HR | Επανεξετάστε τα δείγματα. |
| γ) Αντίστροφη τοποθέτηση των HRC και QC2-HR | Επανεξετάστε τα δείγματα. |

Σχόλια και προτάσεις

Παρατηρείται λάθος χρωματική αλλαγή κατά τον υβριδισμό

- | | |
|--|--|
| α) Ανεπαρκής ανάμιξη του μίγματος ανιχνευτών με τους αποδιαταγμένους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας ή/και δείγματα· ή δεν έχει προστεθεί το μίγμα ανιχνευτών· ή προσθήκη λάθος όγκου αντιδραστηρίου | Ανακινήστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού ή το στατώ μικροσωληναρίων που περιέχει τα μικροσωληνάκια για ακόμα 2 λεπτά. Εάν υπάρχουν μικροσωληνάκια ή πηγαδάκια μικροπλακιδίου τα οποία παραμένουν ακόμα μοβ, προσθέστε επιπλέον 25 μl του σωστού μίγματος ανιχνευτών και αναμίξτε καλά. Εάν, κατά την προσθήκη του μίγματος ανιχνευτών και την εκ νέου ανάμιξη, δεν εμφανιστεί η σωστή χρωματική αλλαγή, και εφόσον το δείγμα δεν περιείχε αίμα ή άλλες ουσίες, επανεξετάστε το δείγμα. |
| β) Το δείγμα περιέχει αίμα ή άλλες ουσίες που συγκαλύπτουν τη χρωματική αλλαγή | Η ακριβής χρωματική αλλαγή που περιγράφεται δεν αναμένεται με αυτούς τους τύπους δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν θα πρέπει να επηρεάζονται δυσμενώς. |
| γ) Το δείγμα περιείχε <1.000 μl STM | Ελέγξτε τον όγκο του αρχικού δείγματος. Ο όγκος πρέπει να ανέρχεται σε 1.425 μl ± 20 μl (μετά την αφαίρεση υποπολλαπλάσιου 75 μl για εξέταση). Εάν ο όγκος είναι <1.425 μl, το αρχικό δείγμα περιείχε <1.000 μl STM. Προβείτε σε λήψη νέου δείγματος. |

Η δοκιμασία δεν πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης. Δεν παρατηρείται κανένα σήμα στους θετικούς βαθμονομητές, στους ορούς ελέγχου ποιότητας, ή στα δείγματα.

- | | |
|---|--|
| α) Δεν έχει προστεθεί ανιχνευτής στο αραιωτικό ανιχνευτή | Προετοιμάστε το μίγμα ανιχνευτών όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης. Επικολλήστε προσεκτικά ετικέτες στα σωληνάκια. |
| β) Ο ανιχνευτής έχει μολυνθεί με RNάση κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας | Κατά τη μετάγγιση του ανιχνευτή, χρησιμοποιήστε ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολύματος και φοράτε γάντια. Προετοιμάστε το μίγμα ανιχνευτών σε αποστειρωμένο δοχείο. Χρησιμοποιείτε μόνο καθαρά, καινούρια, αναλώσιμα δοχεία αντιδραστηρίων. |
| γ) Ανεπαρκής ανάμιξη του μίγματος ανιχνευτών | Μετά την προσθήκη του ανιχνευτή στο αραιωτικό ανιχνευτή, αναμίξτε πολύ καλά με στροβιλισμό σε υψηλή ταχύτητα για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα. Πρέπει να δημιουργηθεί εμφανής στρόβιλος. |

Σχόλια και προτάσεις

- | | |
|---|--|
| δ) Ανεπαρκής ανάμιξη του μίγματος ανιχνευτών και του αποδιαταγμένου δείγματος | Μετά την προσθήκη του μίγματος ανιχνευτών και του δείγματος σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού ή μικροσωληνάριο υβριδισμού, ανακινήστε στο Rotary Shaker I ρυθμισμένο σε 1.100 ± 100 rpm για 3 ± 2 λεπτά. Ελέγξτε για χρωματική αλλαγή από μοβ σε κίτρινο σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου ή μικροσωληνάριο. |
| ε) Λάθος χρόνος ή θερμοκρασία κατά το στάδιο του υβριδισμού | Υβριδίστε για 60 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Ελέγξτε τη θερμοκρασία του Microplate Heater I ή του υδατόλουτρου. Βεβαιωθείτε ότι το Microplate Heater I ή το υδατόλουτρο έχει ρυθμιστεί κατάλληλα ώστε να θερμάνει τα δείγματα στην κατάλληλη θερμοκρασία και έχει προθερμανθεί για 60 λεπτά πριν από τη χρήση. Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού επαρκεί ώστε να θερμαίνονται τα δείγματα στη σωστή θερμοκρασία. Τα υδατόλουτρα πρέπει να βαθμονομούνται περιοδικά. |
| στ) Ανεπαρκής ανάμιξη κατά το στάδιο της δέσμευσης | Ανακινήστε σε ένα Rotary Shaker I για 60 ± 5 λεπτά στους $20-25^\circ\text{C}$ όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης. Επαληθεύστε την ταχύτητα του Rotary Shaker I με βαθμονόμηση. (Ανατρέξτε στο Rotary Shaker I – Εγχειρίδιο χρήστη [<i>Rotary Shaker I User Manual</i>]). |
| ζ) Δεν προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα DR1 ή δεν έγινε επώαση για την προκαθορισμένη διάρκεια | Μεταγγίστε με πιπέτα 75 μl DR1 σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα. Επώαστε σε θερμοκρασία $20-25^\circ\text{C}$ για 30–45 λεπτά. |
| η) Δεν προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα DR2 ή δεν έγινε επώαση για την προκαθορισμένη διάρκεια | Μεταγγίστε με πιπέτα 75 μl DR2 σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα. Επώαστε σε θερμοκρασία $20-25^\circ\text{C}$ για 15–30 λεπτά. |
| θ) Δυσλειτουργία ή λανθασμένος προγραμματισμός του οργάνου DML | Για περισσότερες οδηγίες, ανατρέξτε στο ισχύον εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου DML και στο εγχειρίδιο χρήσης του λογισμικού, ή επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN. |

Αυξημένες τιμές RLU στους βαθμονομητές, στους ορούς ελέγχου ποιότητας ή/και στα

Σχόλια και προτάσεις

δείγματα (≥ 200 RLU σε πολλά ή σε όλα τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου). Η δοκιμασία πιθανόν να μην πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.

- α) Δεν προστέθηκε DNR· ή προστέθηκε λανθασμένος όγκος αντιδραστηρίου· ή ανεπαρκής ανάμιξη του DNR με τα δείγματα, τους βαθμονομητές ή τους ορούς ελέγχου ποιότητας
- Βεβαιωθείτε ότι η επαναληπτική πιπέτα μεταγγίζει με ακρίβεια πριν την προσθήκη του DNR. Οι βαθμονομημένες πιπέτες είναι εξαιρετικά σημαντικές. Προσθέστε μισό όγκο DNR σε κάθε σωληνάριο και αναμίξτε καλά. Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου. Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα πρέπει να γίνουν μοβ μετά την προσθήκη του DNR.
- β) Ελαφριά διαρροή στο όργανο DML· η πόρτα δεν σφραγίστηκε· η στεγανοποίηση γύρω από την πόρτα έχει σπάσει
- Ελέγξτε την ένδειξη υποβάθρου (μέτρηση ακατέργαστων δεδομένων) του οργάνου DML διαβάζοντας ένα κενό μικροπλακίδιο. Μια ένδειξη μεγαλύτερη από 50 RLU υποδεικνύει ότι υπάρχει ελαφριά διαρροή. Ανατρέξτε στο ισχύον εγχειρίδιο χρήστη του οργάνου DML για οδηγίες, ή επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN.
- γ) Μόλυνση του DR2 ή των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης με DR1 ή εξωγενή αλκαλική φωσφατάση
- Βλ. «Έλεγχος μόλυνσης του DR2», σελίδα 145.
- δ) Μολυσμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης
- Βλ. «Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού», σελίδα 145.
- ε) Μολυσμένο Automated Plate Washer
- Βλ. «Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού», σελίδα 145.
- στ) Ανεπαρκής έκπλυση των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης μετά την επώαση DR1
- Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, είτε υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια είτε χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer. Δεν θα πρέπει να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων μετά την έκπλυση. Ανατρέξτε στο Automated Plate Washer – Εγχειρίδιο χρήστη (*Automated Plate Washer User Manual*) για οδηγίες σχετικά με τη δοκιμασία για

Σχόλια και προτάσεις

- | | |
|--|--|
| | μόλυνση ή δυσλειτουργίες. |
| ζ) Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων με DR1 | Βεβαιωθείτε ότι όλες οι επιφάνειες εργασίας είναι καθαρές και στεγνές. Απαιτείται προσοχή κατά τη χρήση του DR1. Αποφεύγετε τα αερολύματα. |
| η) Στύπωση διαλύματος υβριδισμού στην ίδια περιοχή των μαντηλιών Kimtowels ή αντίστοιχων χαρτομάντιλων χωρίς χνούδι. | Μη στυπώνετε ξανά επάνω σε προηγουμένως χρησιμοποιημένα μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι. |
| θ) Χρησιμοποιήθηκαν ακατάλληλα μαντηλάκια στύπωσης | Χρησιμοποιείτε μαντηλάκια Kimtowels ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι για στύπωση. |

Χαμηλές αναλογίες PC/NC ή υψηλός αριθμός χαμηλών θετικών δειγμάτων με αναλογίες <2,0 (>20%). Η δοκιμασία πιθανόν να μην πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.

- | | |
|--|--|
| α) Ανεπαρκής προετοιμασία δείγματος | <p>Προσθέστε το σωστό όγκο DNR και αναμίξτε πλήρως με στροβιλισμό. Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου.</p> <p>Για δείγματα PreservCyt, βεβαιωθείτε ότι έχει ολοκληρωθεί η κατάλληλη ανάμιξη και επανεναιώρηση του σφαιριδίου κυττάρων πριν την επώαση αποδιάταξης.</p> <p>Θα πρέπει να είναι ορατή μια διακριτή χρωματική αλλαγή από διαυγές σε σκούρο μοβ. Επώαστε για 45 ± 5 λεπτά στους $65 \pm 2^\circ\text{C}$.</p> |
| β) Ανεπαρκής ανάμιξη του μίγματος ανιχνευτών ή προστέθηκε ανεπαρκής ποσότητα μίγματος ανιχνευτών | <p>Προετοιμάστε το μίγμα ανιχνευτών σύμφωνα με τις οδηγίες. Αναμίξτε πλήρως με στροβιλισμό, επιβεβαιώνοντας ότι παράγεται εμφανής στρόβιλος. Το μίγμα ανιχνευτών πρέπει να προστίθεται στα σωληνάρια με πιπέτα θετικής εκτόπισης ή πολυκάναλη πιπέτα προκειμένου να διασφαλιστεί η ακριβής μετάγγιση.</p> |
| γ) Προσθήκη ανεπαρκούς όγκου μίγματος ανιχνευτών σε κάθε μικροσωληνάριο | <p>Βεβαιωθείτε ότι η 8-κάναλη πιπέτα μεταγγίζει με ακρίβεια πριν την προσθήκη του μίγματος ανιχνευτών. Προσθέστε 25 μl μίγματος ανιχνευτών σε κάθε μικροσωληνάριο ή πηγαδάκι μικροπλακιδίου που περιέχει αποδιαταγμένους</p> |

Σχόλια και προτάσεις

υβριδισμού ή πηγαδάκι μικροπλακιδίου	βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας και δείγματα. Θα πρέπει να συμβεί χρωματική αλλαγή από σκούρο μοβ σε κίτρινο μετά την προσθήκη και πλήρη ανάμιξη. Τα δείγματα PreservCyt πρέπει να αποκτήσουν ροζ αντί για κίτρινο χρώμα.
δ) Απώλεια δραστηριότητας του DR1	Φυλάσσετε το DR1 σε θερμοκρασία 2–8°C. Χρησιμοποιήστε το πριν από την ημερομηνία λήξης.
ε) Ανεπαρκής δέσμευση	Το βήμα δέσμευσης πρέπει να πραγματοποιείται με χρήση ενός Rotary Shaker I ρυθμισμένου σε 1.100 ±100 rpm. Επικυρώστε την ταχύτητα της συσκευής ανακίνησης με βαθμονόμηση.
στ) Ανεπαρκής έκπλυση	Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίων σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, είτε υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια είτε χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer.
ζ) Μολυσμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης	Βλ. «Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού», σελίδα 145.

Ακολουθία θετικών δειγμάτων με τιμές RLU περίπου πανομοιότυπες

α) Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας	Καλύπτετε το μικροπλακίδιο δέσμευσης κατά τη διάρκεια όλων των επωάσεων. Αποφεύγετε την έκθεση των σωληναρίων στη μόλυνση από αερολύματα κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας. Φοράτε γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας κατά τη διάρκεια των χειρισμών.
β) Μόλυνση του DR2	Βεβαιωθείτε ότι δεν μολύνετε το πρωτογενές διάλυμα κατά τη μετάγγιση του DR2 μέσα στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης. Αποφεύγετε τη μόλυνση του DR2 με αερολύματα από το DR1 ή από εργαστηριακή σκόνη κ.λπ.
γ) Δυσλειτουργία του Automated Plate Washer	Βλ. «Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού», σελίδα 145, ή ανατρέξτε στο Automated Plate Washer – Εγχειρίδιο χρήστη (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) για οδηγίες σχετικά με τη δοκιμασία για μόλυνση ή δυσλειτουργίες.

Ευρύς CV μεταξύ αντιγράφων.

Σχόλια και προτάσεις

- | | |
|---|---|
| α) Ανακριβής μετάγγιση | Ελέγξτε την πιπέτα για να διασφαλίσετε ότι μεταγγίζονται επαναλήψιμοι όγκοι. Βαθμονομείτε τις πιπέτες τακτικά. |
| β) Ανεπαρκής ανάμιξη | Αναμιγνύετε πλήρως σε όλα τα στάδια. Στροβιλίστε πριν και μετά την επώαση αποδιάταξης και μετά την προσθήκη του μίγματος ανιχνευτών. Βεβαιωθείτε ότι δημιουργείται εμφανής στρόβιλος. |
| γ) Ατελής μεταφορά υγρού από τα μικροσωληνάρια υβριδισμού ή τα πηγαδάκια μικροπλακιδίων υβριδισμού στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης | Βεβαιωθείτε κατά τη διάρκεια του βήματος μεταφοράς από το μικροπλακίδιο υβριδισμού ή τα μικροσωληνάρια υβριδισμού στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης ότι μεταφέρονται επαναλήψιμοι όγκοι. |
| δ) Ακατάλληλες συνθήκες έκπλυσης | Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου πλήρως με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, είτε υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια είτε χρησιμοποιώντας Automated Plate Washer. |
| ε) Μόλυνση των πηγαδίων μικροπλακιδίων με DR1 | Βεβαιωθείτε ότι όλες οι επιφάνειες εργασίας είναι καθαρές και στεγνές. Απαιτείται προσοχή κατά τη χρήση του DR1. Αποφεύγετε τα αερολύματα. |

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα προκύπτουν από γνωστά ως αρνητικά δείγματα.

- | | |
|---|---|
| α) Μολυσμένο DR2 | Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων καθώς διανείμετε κλασματικούς όγκους DR2 μεταξύ των δειγμάτων. Εάν χρησιμοποιείται μόνο μέρος ενός κιτ, διανείμετε τους απαιτούμενους κλασματικούς όγκους για τη συγκεκριμένη δοκιμασία μέσα σε ένα καθαρό αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων πριν γεμίσετε την πιπέτα. |
| β) Μόλυνση των πηγαδίων μικροπλακιδίων με DR1 | Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου πλήρως με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, είτε υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια είτε χρησιμοποιώντας Automated Plate Washer. Δεν θα πρέπει να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων μετά την έκπλυση. |

Σχόλια και προτάσεις

- | | |
|--|---|
| γ) Στύπωση στην ίδια περιοχή των μαντηλιών Kimtowels ή αντίστοιχων χαρτομάντιλων χωρίς χνούδι σε πολλές σειρές | Μη στυπώνετε σε μια περιοχή που έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως. |
| δ) Ανεπαρκής προετοιμασία δείγματος | Προσθέστε το σωστό όγκο DNR και αναμίξτε πλήρως με στροβιλισμό. Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου.

Για χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων PreservCyt, βεβαιωθείτε ότι έχει ολοκληρωθεί η κατάλληλη ανάμιξη και επανεναιώρηση του σφαιριδίου κυττάρων πριν την επώαση αποδιάταξης. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion.

Θα πρέπει να είναι ορατή μια διακριτή χρωματική αλλαγή από διαυγές σε σκούρο μοβ. Επώαστε για 45 ± 5 λεπτά στους $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Για χειροκίνητη προετοιμασία δειγμάτων SurePath, βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα επωάζονται για 90 ± 5 λεπτά στους $65 \pm 2^\circ\text{C}$. |
| ε) Ακατάλληλες συνθήκες έκπλυσης | Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίων σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, είτε υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια είτε χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer. |
| στ) Μόλυνση του ρύγχους πιπέτας με μη αποδιαταγμένο υλικό κατά τη διάρκεια της μεταφοράς αποδιαταγμένου δείγματος στο μικροσωληνάριο υβριδισμού ή πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού | Το βήμα αποδιάταξης της διαδικασίας επεξεργασίας δείγματος πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες χρήσης. Τυχόν λανθασμένος στροβιλισμός του δείγματος, αναστροφή του σωληναρίου και ανάδευση μπορεί να οδηγήσουν σε ατελή αποδιάταξη μη ειδικών υβριδίων RNA–DNA που είναι ενδογενή στα τραχηλικά δείγματα. Ειδικότερα για δείγματα PreservCyt ή SurePath, αυτά τα υβρίδια είναι πιθανό ότι θα είναι παρόντα στα εσωτερικά τοιχώματα του σωληναρίου αποδιάταξης δείγματος. Για να αποφευχθεί η μεταφορά |

Σχόλια και προτάσεις

αυτού του μη αποδιαταγμένου κυτταρικού υλικού, το ρύγχος της πιπέτας δεν πρέπει να αγγίζει τις πλευρές του σωληναρίου αποδιάταξης δείγματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του αποδιαταγμένου δείγματος στο μικροσωληνάριο υβριδισμού ή πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού.

Αυξημένες τιμές NC RLU (>200 RLU). Το υπόλοιπο της δοκιμασίας εκτελείται κανονικά.

- | | |
|---|---|
| α) Το DR2 επώαστηκε σε θερμοκρασία υψηλότερη των 20–25°C. | Επανεκτελέστε τη διαδικασία και βεβαιωθείτε ότι τα βήματα δέσμευσης και ανίχνευσης επωάζονται σε θερμοκρασία 20–25°C. |
| β) Το DR2 επώαστηκε για περισσότερο από 30 λεπτά. | Διαβάστε το μικροπλακίδιο μετά από 15 λεπτά επώασης (και όχι αργότερα από 30 λεπτά επώασης) σε θερμοκρασία 20–25°C. |
| γ) Το DR2 ή το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μολύνθηκε με αλκαλική φωσφατάση ή DR1. | Βλ. «Έλεγχος μόλυνσης του DR2», σελίδα 145, ή «Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού», σελίδα 145. |

Η δοκιμασία δεν πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης. Αυξημένο $\overline{PC\bar{X}/NC\bar{X}}$.

- | | |
|---|---|
| α) Αντίστροφη τοποθέτηση του HRC και του QC2-HR | Επανεξετάστε τα δείγματα. Διαβάστε προσεκτικά τις ετικέτες στα φιαλίδια βαθμονομητή και ορού ελέγχου ποιότητας για να αποφύγετε την αντίστροφη τοποθέτηση αυτών των αντιδραστηρίων. |
|---|---|

Έλεγχος μόλυνσης του DR2

1. Μεταγγίστε με πιπέτα 75 µl του κλασματοποιημένου, υπολειπόμενου ή αρχικού φιαλιδίου DR2 σε ένα κενό πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης.
Σημείωση: Η εξέταση του DR2 σε επαναλήψεις των 3 παρέχει βέλτιστη αξιολόγηση της απόδοσης.
2. Επωάστε στους 20–25°C για 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.
3. Μετρήστε το μικροπλακίδιο χρησιμοποιώντας ένα όργανο DML.
Ο μάρτυρας DR2 πρέπει να είναι <50 RLU.
Εάν οι τιμές DR2 είναι <50 RLU, το DR2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επανάληψη της δοκιμασίας.
Εάν έχει μολυνθεί (>50 RLU), πάρτε ένα νέο κιτ και επαναλάβετε τη δοκιμασία.

Έλεγχος μόλυνσης της συσκευής έκπλυσης ή/και της πηγής νερού

1. Επισημάνετε τα πηγαδάκια 1–4. Μεταγγίστε με πιπέτα 75 µl DR2 σε 4 ξεχωριστά πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.
Το πηγαδάκι 1 χρησιμεύει ως ο μάρτυρας DR2.
2. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τη φιάλη έκπλυσης στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 2.
3. Αφήστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης να τρέξει μέσα από τις σωληνώσεις της συσκευής έκπλυσης. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 µl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τη σωλήνωση στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 3.
4. Λάβετε ένα υποπολλαπλάσιο νερού που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 µl του νερού στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 4.
5. Επωάστε στους 20–25°C για 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.
6. Μετρήστε το μικροπλακίδιο χρησιμοποιώντας ένα όργανο DML.

Ο μάρτυρας DR2 (πηγαδάκι 1) πρέπει να είναι <50 RLU.

Συγκρίνετε την τιμή RLU από τα πηγαδάκια 2, 3 και 4 με την τιμή RLU του μάρτυρα DR2. Οι μεμονωμένες τιμές RLU για τα πηγαδάκια 2, 3 και 4 δεν πρέπει να υπερβαίνουν τις 50 RLU της τιμής RLU του μάρτυρα DR2.

Τιμές που υπερβαίνουν τις 50 RLU του μάρτυρα DR2 δηλώνουν μόλυνση. Βλ. «Μέθοδος χειροκίνητης έκπλυσης», σελίδα 65, για οδηγίες σχετικά με τον καθαρισμό και τη συντήρηση της συσκευής έκπλυσης.

Έλεγχος μόλυνσης του Automated Plate Washer

1. Επισημάνετε τα πηγαδάκια 1–5. Μεταγγίστε με πιπέτα 75 μl DR2 σε 5 ξεχωριστά πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.
Το πηγαδάκι 1 χρησιμεύει ως ο μάρτυρας DR2.
1. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τη φιάλη έκπλυσης της συσκευής έκπλυσης πλακιδίων στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 2.
2. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 μl υγρού ξεπλύματος από τη φιάλη ξεπλύματος της συσκευής έκπλυσης πλακιδίων στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 3.
3. Πατήστε το κουμπί **Prime** (προκαταρκτική πλήρωση) στο πληκτρολόγιο της συσκευής έκπλυσης πλακιδίων, επιτρέποντας στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης να τρέξει μέσα από τις γραμμές. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τον αυλάκι στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 4.
4. Πατήστε το κουμπί **Rinse** (ξέπλυμα) στο πληκτρολόγιο της συσκευής έκπλυσης πλακιδίων, επιτρέποντας στο υγρό ξεπλύματος να τρέξει μέσα από τις γραμμές. Μεταγγίστε με πιπέτα 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τον αυλάκι στο πηγαδάκι μικροπλακιδίου 5.
5. Καλύψτε και επώαστε για 15 λεπτά στους 20–25°C. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.
6. Μετρήστε το μικροπλακίδιο χρησιμοποιώντας ένα όργανο DML.

Ο μάρτυρας DR2 (πηγαδάκι 1) πρέπει να είναι <50 RLU.

Συγκρίνετε την τιμή RLU από τα πηγαδάκια 2, 3, 4 και 5 με την τιμή RLU μάρτυρα DR2. Οι μεμονωμένες τιμές RLU για τα πηγαδάκια 2, 3, 4 και 5 δεν πρέπει να υπερβαίνουν τις 50 RLU της τιμής RLU του μάρτυρα DR2.

Τιμές που υπερβαίνουν τις 50 RLU του μάρτυρα DR2 δηλώνουν μόλυνση της συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.

Ανατρέξτε στο Automated Plate Washer – Εγχειρίδιο χρήστη (*Automated Plate Washer User Manual*) για τη διαδικασία απολύμανσης.

Πληροφορίες επικοινωνίας

Χρησιμοποιήστε το φύλλο πληροφοριών επικοινωνίας της QIAGEN που παρέχεται στο κιτ δοκιμασίας για να επικοινωνήσετε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της QIAGEN.

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

Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευμένα από το νόμο, ακόμη και αν δεν επισημαίνονται ειδικά ως τέτοια.

Αυτό το προϊόν και η μέθοδος χρήσης του καλύπτονται από ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα διπλώματα ευρεσιτεχνίας:

Η τεχνολογία Hybrid Capture καλύπτεται από το Ευρωπαϊκό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας αρ. 0 667 918 κατατεθέν σε Αυστρία, Βέλγιο, Ελβετία, Λιχτενστάιν, Γερμανία, Δανία, Ισπανία, Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ελλάδα, Ιρλανδία, Ιταλία, Λουξεμβούργο, Ολλανδία και Σουηδία.

Δίπλωμα ευρεσιτεχνίας Hybrid Capture στις ΗΠΑ

6,228,578 B1

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας HPV στις ΗΠΑ

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

© 2012- 2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

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