

# Δοκιμασία *digene*<sup>®</sup> HC2 HPV DNA

## Οδηγίες χρήσης

IVD



Μια in vitro δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκού οξέος με ενίσχυση σήματος και χρήση μικροπλακιδίου χημειοφωταύγειας για την ποιοτική ανίχνευση 18 τύπων DNA του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV) χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου σε τραχηλικά δείγματα

### Για χρήση με τα παρακάτω:

Συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA

*digene* Specimen Transport Medium

Διάλυμα Hologic PreservCyt<sup>®</sup>

Υγρό διατήρησης BD SurePath<sup>®</sup>



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road  
Germantown, MD 20874  
ΗΠΑ

EC REP

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
GERMANIA  
L2126el Avaθ. 4





## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ .....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ .....	3
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ .....	4
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ .....	5
ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ .....	6
ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ .....	8
ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ .....	8
ΔΗΛΩΣΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ .....	8
ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ .....	10
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.....	12
ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	16
ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ STM .....	16
ΤΡΑΧΗΛΙΚΕΣ ΒΙΟΨΙΕΣ .....	16
ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT .....	16
ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΥΓΡΟ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ SUREPATH .....	17
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ .....	18
ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΔΙΕΚΠΕΡΑΙΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΟΓΚΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RAPID CAPTURE SYSTEM .....	18
ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ .....	18
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ .....	20
ΣΤΡΟΒΙΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ.....	24
ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ: ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ (CPC) ΚΑΙ ΔΥΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ.....	27
ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ.....	29
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ.....	30
ΕΚΠΛΥΣΗ.....	31
ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ.....	32
ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ.....	33
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ .....	36
ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ.....	38
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	40
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ.....	41
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΔΕΙΞΗ HPV ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΑΙ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....	41
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΔΕΙΞΗ HPV ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΟΥ ΣΕ ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΟ ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ .....	45
ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ .....	48
ΑΠΟΔΟΣΗ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ (CPC).....	49
ΙΣΟΔΥΝΑΜΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ STM ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ PRESERVCYT .....	49
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ SUREPATH ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ STM ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ .....	49
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ .....	50
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ HPV ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ .....	50
ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ .....	52
ΣΧΕΔΙΟ ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ .....	52
ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ.....	53
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ STM .....	53
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT .....	53
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ STM.....	54
RLU/CO .....	54
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT .....	55
RLU/CO .....	55

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ <i>DIGENE</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΓΡΟ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ SUREPATH .....	56
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ SUREPATH ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RAPID CAPTURE SYSTEM ΓΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	56
<b>ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>58</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>60</b>
<b>ΟΔΗΓΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>63</b>
ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ .....	67
<b>ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ QIAGEN .....</b>	<b>69</b>

## ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Για διαγνωστική χρήση in vitro.

Η δοκιμασία *digene* HC2 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 18 τύπων HPV DNA χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου σε τραχηλικά δείγματα.

Τα τραχηλικά δείγματα τα οποία μπορούν να αναλυθούν με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA περιλαμβάνουν τα εξής:

- Δείγματα που συλλέγονται με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA
- Δείγματα που συλλέγονται με χρήση συσκευής συλλογής τύπου σαρώθρου ή συσκευής συλλογής συνδυασμού βούρτσας/σπάτουλας και τοποθετούνται σε διάλυμα PreservCyt (ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του kit μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 για πλήρεις λεπτομέρειες)
- Δείγματα που συλλέγονται σε υγρό διατήρησης SurePath (MONO για δοκιμασίες HPV DNA υψηλού κινδύνου)
- Βιοψίες που συλλέγονται με το *digene* Specimen Transport Medium (STM, μέσο μεταφοράς δείγματος)

Όταν χρησιμοποιούνται οι ανιχνευτές HPV χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου, η χρήση αυτής της δοκιμασίας ενδείκνυται:

- Για να βοηθήσει στη διάγνωση σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων HPV με HPV των τύπων 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68.
- Για τη διαφοροποίηση μεταξύ δύο ομάδων DNA του HPV: HPV χαμηλού κινδύνου των τύπων 6, 11, 42, 43 και 44 και HPV υψηλού κινδύνου των τύπων 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68, ωστόσο, δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός του συγκεκριμένου τύπου HPV που είναι παρών.

Όταν χρησιμοποιείται ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου, 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 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.

Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κλινικές πληροφορίες που παρέχονται από άλλες διαγνωστικές δοκιμασίες και δοκιμασίες διαλογής, κλινικές εξετάσεις και το πλήρες ιατρικό ιστορικό σύμφωνα με τις κατάλληλες διαδικασίες διαχείρισης ασθενών. Τα αποτελέσματα

από τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA **δεν πρέπει** να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση για την κλινική αξιολόγηση και τη θεραπεία των ασθενών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η παρουσία ορισμένων τύπων HPV στη γεννητική οδό της γυναίκας συσχετίζεται με έναν αριθμό παθήσεων, όπως κονδύλωμα, βλατίδωση Bowen, ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου, του κόλπου και του αιδοίου και καρκίνωμα.<sup>1-3</sup> 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.<sup>4-8</sup>

Οι ιοί των ανθρωπίνων θηλωμάτων αποτελούνται από ένα εικοσαεδρικό σωματίδιο ιού (βίριον) 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.

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 νουκλεϊκού οξέος προκειμένου να ανιχνευτεί άμεσα η παρουσία HPV DNA.

Ιστορικά, οι τύποι HPV 16 και HPV 18 έχουν θεωρηθεί ως τύποι HPV συσχετιζόμενοι με καρκίνο υψηλού κινδύνου, ενώ οι τύποι HPV 6 και 11 ως τύποι HPV χαμηλού κινδύνου.<sup>8-10</sup> Ακολούθως, οι τύποι HPV 31, 33 και 35 έχει καταδειχθεί ότι παρουσιάζουν μια ενδιάμεση συσχέτιση με τον καρκίνο.<sup>2,11-14</sup> Παρά αυτό το χρήσιμο θεωρητικό πλαίσιο, αυτοί οι 7 τύποι HPV ευθύνονται μόνο για περίπου 70% των τραχηλικών νεοπλασμάτων.<sup>9-11</sup> Πρόσθετοι τύποι HPV, συμπεριλαμβανομένων των τύπων 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68, έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριοι τύποι HPV που μπορούν να ανιχνευθούν στις υπόλοιπες βλάβες<sup>15-20,32-36</sup>. Αυτοί οι τύποι HPV μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου, ανάλογα με τη σχετική κατανομή τους σε διάφορες κατηγορίες ιστοπαθολογικής διάγνωσης.<sup>21, 32-37</sup>

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.<sup>2,10,21,31</sup> Προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι 15-28% των γυναικών που ήταν θετικές για HPV DNA ανέπτυξαν πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις (SIL) εντός 2 ετών, σε σύγκριση με αντίστοιχο ποσοστό μόλις 1-3% των γυναικών που ήταν αρνητικές για HPV DNA.<sup>22,23</sup> Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εξέλιξης για τους τύπους HPV 16 και 18 ήταν μεγαλύτερος (περίπου κατά 40%) σε σχέση με άλλους τύπους HPV.<sup>22</sup>

## ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA με χρήση τεχνολογίας HC2 είναι μια δοκιμασία υβριδισμού με δέσμευση αντισωμάτων με ενίσχυση σήματος, η οποία χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια μικροπλακιδίου. Δείγματα τα οποία περιέχουν το DNA-στόχο υβριδοποιούνται με ένα συγκεκριμένο ανιχνευτή HPV RNA. Τα παραγόμενα υβρίδια RNA:DNA δεσμεύονται στην επιφάνεια ενός μικροπλακιδίου καλά επικαλυμμένου με συγκεκριμένα αντισώματα για υβρίδια RNA:DNA. Τα ακινητοποιημένα υβρίδια αντιδρούν με συνεζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αντισώματα, ειδικά για 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) σε ένα λουμινόμετρο. Η ένταση του φωτός που εκλύεται υποδηλώνει την παρουσία ή απουσία του DNA-στόχου στο δείγμα.

Μια μέτρηση RLU ίση ή μεγαλύτερη της τιμής διακοπής υποδεικνύει την παρουσία αλληλουχιών HPV DNA στο δείγμα. Μια μέτρηση RLU μικρότερη της τιμής διακοπής υποδεικνύει την απουσία των συγκεκριμένων αλληλουχιών HPV DNA που εξετάζονται ή δηλώνει ότι τα επίπεδα HPV DNA βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας.

Εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA μπορούν να πραγματοποιηθούν με χρήση του Rapid Capture<sup>®</sup> System (RCS). Το όργανο αυτό επεξεργάζεται έως και 352 δείγματα σε οκτώ ώρες. Για να είναι δυνατός ο έλεγχος υψηλού όγκου δειγμάτων, όλα τα διαδικαστικά βήματα της δοκιμασίας εκτελούνται από το σύστημα RCS, με εξαίρεση την αποδιάταξη των δειγμάτων, την ανίχνευση σήματος με χημειοφωταύγεια και την αναφορά των αποτελεσμάτων.



## ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Κάθε κιτ δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA (*digene* HC2 HPV DNA Test) (αρ. καταλ. 5196-1330) περιέχει 96 εξετάσεις. Ο αριθμός των αποτελεσμάτων ασθενών κυμαίνεται ανάλογα με τον αριθμό των χρήσεων ανά κιτ:

1 χρήση = 40 αποτελέσματα ασθενών (χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου)  
2 χρήσεις = 32 αποτελέσματα ασθενών (χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου)

- 1 x 0,35 ml **Χρωματικός δείκτης**  
Περιέχει 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 50 ml **Αντιδραστήριο αποδιάταξης**  
Διάλυμα αραιωμένου υδροξειδίου του νατρίου (NaOH).
- 1 x 5 ml **Αραιωτικό ανιχνευτή**  
Ρυθμιστικό διάλυμα με 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 150 μl **Ανιχνευτής HPV χαμηλού κινδύνου**  
HPV 6/11/42/43/44 RNA μείγμα ανιχνευτών σε ρυθμιστικό διάλυμα (πράσινο πώμα).
- 1 x 100 μl **Ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου**  
HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 RNA μείγμα ανιχνευτών σε ρυθμιστικό διάλυμα (κόκκινο πώμα).
- 1 x 1 ml **Ορός ελέγχου ποιότητας HPV χαμηλού κινδύνου**  
5 pg/ml (500.000 αντίγραφα/ml) κλωνοποιημένου HPV 6 DNA και DNA-φορέα σε STM με 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 1 ml **Ορός ελέγχου ποιότητας HPV υψηλού κινδύνου**  
5 pg/ml (500.000 αντίγραφα/ml) κλωνοποιημένο HPV 16 DNA και DNA-φορέας σε STM με 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 2,0 ml **Αρνητικός βαθμονομητής**  
DNA-φορέας σε Specimen Transport Medium με 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 1,0 ml **Βαθμονομητής HPV χαμηλού κινδύνου**  
1 pg/ml κλωνοποιημένου HPV 11 DNA και DNA-φορέας σε STM με 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 1,0 ml **Βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου**  
1 pg/ml κλωνοποιημένου HPV 16 DNA και DNA-φορέας σε STM με 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 1 **Μικροπλακίδιο δέσμησης**  
Επικαλυμμένο με αντι-RNA:DNA υβριδικά αντισώματα.
- 1 x 12 ml **Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1**  
Συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αντισώματα με υβρίδια RNA:DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα με 0,05% w/v αζίδιο του νατρίου.
- 1 x 12 ml **Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2**  
CDP-Star® με Emerald II (χημειοφωταυγές υπόστρωμα).
- 1 x 100 ml **Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης**  
Περιέχει 1,5% w/v αζίδιο του νατρίου.

## ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

### *In Vitro* διαγνωστικός εξοπλισμός και παρελκόμενα Hybrid Capture System<sup>A</sup>

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)<sup>B</sup>

Στατώ μετατροπής και καπάκι στατώ (προαιρετικό)

Στατώ δειγμάτων και κάλυμμα στατώ *digene* (προαιρετικό)

Πιπέτα EXPAND-4 και βάση (προαιρετικό)<sup>F</sup>

Συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA<sup>A</sup>

Διανεμητής σφραγίσεων σωληναρίων και κόφτης (προαιρετικό, χρησιμοποιείται με το MST Vortexer 2)

#### Γενικός εξοπλισμός και εξαρτήματα εργαστηριακής χρήσης

Υδατόλουτρο 65 ± 2°C επαρκούς μεγέθους για 1 στατώ μετατροπής (36 x 21 x 9 cm) ή για περισσότερα στατώ δειγμάτων

Μικροσυσκευή φυγοκέντρισης (προαιρετική για τη φυγοκέντριση φιαλιδίων ανιχνευτών, ώστε να λαμβάνεται ο μέγιστος όγκος των ανιχνευτών)

Μείκτης ισχυρής ανάδευσης με προσαρτημένο κύπελλο Μονοκάναλη μικροπιπέτα, μεταβλητές ρυθμίσεις για όγκους 20-200 μl και 200-1.000 μl

Επαναληπτική πιπέτα θετικής εκτόπισης, όπως η πιπέτα Eppendorf<sup>®</sup> Repeater<sup>®</sup> ή ισοδύναμη

8-κάναλη πιπέτα: μεταβλητές ρυθμίσεις για όγκους 25-200 μl Χρονόμετρο

Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου, 5% v/v (ή λευκαντικό οικιακής χρήσης)

Parafilm<sup>®</sup> ή ισοδύναμο

Αναλώσιμα ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερούματος για μονοκάναλη πιπέτα (20 έως 200 μl και 200-1.000 μl)

Αναλώσιμα ρύγχη για πιπέτα Eppendorf Repeater (25 και 500 μl)

Αναλώσιμα ρύγχη για 8-κάναλη πιπέτα (25 έως 200 μl)

Μαντιλάκια Kimtowels<sup>®</sup> ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι

Αναλώσιμο κάλυμμα επιφάνειας εργασίας

Γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας

Σωληνάρια από πολυπροπυλένιο με στρογγυλό πυθμένα και κουμπωτό πώμα των 5 ml ή/και 15 ml (για αραίωση ανιχνευτών)

Μικροσωληνάρια φυγοκέντρισης από πολυπροπυλένιο των 2,0 ml με πώματα

#### Πρόσθετος εξοπλισμός και εξαρτήματα για επεξεργασία δειγμάτων στο υγρό διατήρησης Surepath

Φυγόκεντρος ταλαντευόμενου κάδου με δυνατότητα επίτευξης 800 ± 15 x g και συγκράτησης κωνικών σωληναρίων φυγόκεντρου από πολυπροπυλένιο των 15 ml

Σωληνάρια μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 (κωνικά σωληνάρια των 15 ml)<sup>ST</sup>

Πιπέτα μεταφοράς ή ισοδύναμη με τυπικό ρύγχος των 7 ml

Μέσα μεταφοράς δείγματος της QIAGEN

Αναλώσιμα ρύγχη για πιπέτα Eppendorf Repeater (100 μl)

Rapid Capture System (προαιρετικό για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου)<sup>E</sup>

Συσκευή έκπλυσης

Μικροπλακίδια υβριδισμού

Καπάκια μικροπλακιδίων

Κενές ταινίες μικροπλακιδίου (διαθέσιμες από την Costar, Μοντέλο αρ. 2581), προαιρετικά για χρήση με το Automated Plate Washer

Πολύ μακριά ρύγχη πιπέτας για την αφαίρεση δειγμάτων

Σωληνάρια συλλογής δειγμάτων

Στατώ για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων

Βιδωτά πώματα για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων

Αναλώσιμα δοχεία αποθήκευσης αντιδραστηρίων

Μεμβράνη σφράγισης σωληναρίων DuraSeal<sup>TM</sup>

Μικροσωληνάρια υβριδισμού

Στατώ μικροσωληναρίων

Καλύμματα πλακιδίων

#### Πρόσθετος εξοπλισμός και εξαρτήματα για επεξεργασία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt

Φυγόκεντρος ταλαντευόμενου κάδου με δυνατότητα επίτευξης 2.900 ± 150 x g και συγκράτησης κωνικών σωληναρίων φυγόκεντρου από πολυπροπυλένιο των 10 ml ή 15 ml Ορολογικές πιπέτες των 5 ml ή πιπέτες μετάγγισης Kit *digene* HC2 Sample Conversion<sup>A</sup>

Αναλώσιμα ρύγχη για πιπέτα Eppendorf Repeater (50 και 100 μl)

#### Για τη διαδικασία στροβιλισμού με το χέρι:

Σωληνάρια μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 (κωνικά των 15 ml)<sup>ST</sup>, κωνικά σωληνάρια Sarstedt των 10 ml με πώματα ή σωληνάρια φυγόκεντρου από πολυπροπυλένιο με κωνικό πυθμένα VWR<sup>®</sup> ή Corning<sup>®</sup> των 15 ml με πώματα Στατώ σωληναρίων με δυνατότητα υποδοχής κωνικών σωληναρίων των 10 ml ή 15 ml

#### Για τη διαδικασία Multi-Specimen Tube Vortexer 2

Σωληνάρια μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 (κωνικά των 15 ml)<sup>ST</sup>

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Στατώ μετατροπής και καπάκι (ειδικό για κωνικά σωληνάρια των 15 ml)

Διανεμητής σφραγίσεων σωληναρίων και κόφτης Μεμβράνη σφράγισης σωληναρίων DuraSeal (χρησιμοποιείται με το MST Vortexer 2)

- <sup>A</sup> Μόνο εξοπλισμός και υλικά που έχουν επικυρωθεί με τις δοκιμασίες *digene* HC2 HPV DNA είναι διαθέσιμα από την QIAGEN.
- <sup>B</sup> Απαιτείται επίσης για χρήση κατά την εκτέλεση της ημι-αυτοματοποιημένης εφαρμογής RCS.
- <sup>Γ</sup> Προσαρμοσμένο στοιχείο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσαρμοσμένες επεκτάσιμες πολυκάναλες πιπέτες εφόσον η απόσταση των ρυγχών μετά την επέκταση φτάνει τα 3,2 cm. Διαφορετικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια μονοκάναλη πιπέτα με δυνατότητα μετάγγισης 75 μl.
- <sup>Δ</sup> Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA καθορίστηκαν μόνο με τα υποδεικνυόμενα κιτ συλλογής.
- <sup>E</sup> Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) για οδηγίες όσον αφορά τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου με αυτήν τη δοκιμασία.
- <sup>ΣΤ</sup> Πρέπει να χρησιμοποιούνται τα σωληνάρια μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 (μάρκας VWR ή Corning®) που είναι διαθέσιμα από την QIAGEN προκειμένου να διασφαλίζεται η σωστή διεξαγωγή της δοκιμασίας κατά τη χρήση της διαδικασίας Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

## ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΔΙΑΒΑΣΤΕ ΠΡΟΣΕΚΤΙΚΑ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΙΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΤΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ.

### ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

ΟΛΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς λοιμώδη. Καμία γνωστή μέθοδος δοκιμασίας δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διασφάλιση ότι τα δείγματα δεν θα μεταδώσουν μόλυνση. Συνιστάται ο χειρισμός των ανθρωπίνων δειγμάτων να γίνεται σύμφωνα με τις εθνικές/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:

1. Μην προβαίνετε σε αναρρόφηση δια στόματος.
2. Μην καπνίζετε, μην τρώτε και μην πίνετε σε χώρους όπου γίνεται χειρισμός και επεξεργασία αντιδραστηρίων ή δειγμάτων.
3. Κατά το χειρισμό αντιδραστηρίων ή δειγμάτων, φοράτε αναλώσιμα γάντια -χωρίς επικάλυψη πούδρας. Πλύνετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας.
4. Καθαρίστε και απολυμάνετε όλους τους λεκέδες από δείγματα χρησιμοποιώντας ένα φυματιοκτόνο απολυμαντικό, όπως 0,5% v/v υποχλωριώδες νάτριο ή άλλο κατάλληλο απολυμαντικό.<sup>42,43</sup>
5. Απολυμάνετε και απορρίψτε όλα τα δείγματα, αντιδραστήρια και άλλα δυνητικώς μολυσμένα υλικά σύμφωνα με τους εθνικούς και τοπικούς κανονισμούς.

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 Διεύθυνση Ασφάλειας και Υγιεινής στον Χώρο 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 και (4) ξεπλύνετε καλά με νερό.

### Εξετάσεις αυτοματοποιημένες με το RCS

Ανατρέξτε στο *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.

### ΔΗΛΩΣΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Για τα συστατικά του kit δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA εφαρμόζονται οι ακόλουθες φράσεις κινδύνου και ασφάλειας:

#### Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης



Περιέχει: Αζίδιο του νατρίου. Προειδοποίηση! H302 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/ το δοχείο σε εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης απορριμμάτων.

### **Αντιδραστήριο αποδιάταξης**



Περιέχει: υδροξείδιο του νατρίου. Κίνδυνος! Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/ το δοχείο σε εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης απορριμμάτων. 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.

### **Αραιωτικό ανιχνευτή**



Περιέχει: οξικό οξύ, πολυακρυλικό οξύ. Κίνδυνος! Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/ το δοχείο σε εγκεκριμένες εγκαταστάσεις διάθεσης απορριμμάτων. 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.

### **Βαθμονομητής HPV υψηλού κινδύνου**

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

### **Βαθμονομητής HPV χαμηλού κινδύνου**

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

### **Ορός ελέγχου ποιότητας HPV υψηλού κινδύνου**

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

### **Ορός ελέγχου ποιότητας HPV χαμηλού κινδύνου**

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


### **Αρνητικός βαθμονομητής**

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

### **Επιπλέον πληροφορίες**


Φύλλα δεδομένων ασφαλείας: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

## ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ

1. Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
2. Η τραχηλική βούρτσα δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε εγκύους.
3. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται δίπλα από το σύμβολο  στην ετικέτα της εξωτερικής συσκευασίας.
4. Η διεξαγωγή της δοκιμασίας εκτός των προβλεπόμενων ορίων χρόνου και θερμοκρασίας μπορεί να δώσει μη έγκυρα αποτελέσματα. Δοκιμασίες που δεν πραγματοποιούνται στα καθιερωμένα όρια χρόνου και θερμοκρασίας δεν είναι έγκυρες και πρέπει να επαναλαμβάνονται.
5. Η διαδικασία της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA, τα κριτήρια επαλήθευσης βαθμονόμησης της διαδικασίας, ο ορός ελέγχου ποιότητας και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δειγμάτων πρέπει να ακολουθούνται στενά για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων δοκιμασίας.
6. Είναι σημαντικό να μεταγγίζεται ο ακριβής όγκος του αντιδραστηρίου όπως ενδείκνυται 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.
7. Τα επιμέρους συστατικά του κιτ έχουν δοκιμαστεί ως ενιαία μονάδα. **Μην** τα ανταλλάσσετε με συστατικά από άλλες πηγές ή από διαφορετικές παρτίδες.
8. Τα νουκλειικά 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.**
9. Διασφαλίστε την πρόληψη της μόλυνσης του μικροπλακιδίου δέσμευσης και του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 (DR2) με εξωγενή αλκαλική φωσφατάση κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοκιμασίας. Στις ουσίες που πιθανόν να περιέχουν αλκαλική φωσφατάση περιλαμβάνονται το αντιδραστήριο ανίχνευσης 1, διάφορα βακτηρίδια, σίελος, τρίχες και έλαια του δέρματος. **Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να καλύπτεται το μικροπλακίδιο δέσμευσης μετά την έκπλυση και κατά το στάδιο της επώασης στο αντιδραστήριο ανίχνευσης 2, δεδομένου ότι η εξωγενής αλκαλική φωσφατάση μπορεί να αντιδράσει με το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 και να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.**
10. Προστατεύστε το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 από την παρατεταμένη έκθεση στο άμεσο φως. Χρησιμοποιήστε το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 αμέσως μετά τον υποπολλαπλασιασμό και αποφύγετε το άμεσο ηλιακό φως.
11. Απαιτείται αρχικό γέμισμα της επαναληπτικής πιπέτας πριν τη διανομή του αντιδραστηρίου και περιοδικός έλεγχος για τυχόν μεγάλες φυσαλίδες αέρα. Υπερβολικές ποσότητες από μεγάλες φυσαλίδες αέρα στο ρύγχος της επαναληπτικής πιπέτας μπορεί να προκαλέσουν ανακριβή διανομή και μπορούν να αποφευχθούν με γέμισμα της πιπέτας, διανομή όλου του υγρού και εκ νέου γέμισμα. Για λεπτομερέστερες οδηγίες χρήσης ανατρέξτε στα εγχειρίδια οδηγιών χρήσης της πιπέτας.
12. Η μετάγγιση με πολυκάναλη πιπέτα πρέπει να πραγματοποιείται με την τεχνική της ανάστροφης μετάγγισης (βλ. ενότητα *Ανίχνευση υβριδίου*) για τη διανομή των αντιδραστηρίων ανίχνευσης 1 και 2. Ελέγξτε το κάθε ρύγχος κάθε πολυκάναλης πιπέτας για σωστή εφαρμογή και πλήρωση.
13. Βεβαιωθείτε ότι κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου δέσμευσης έχει πλυθεί σχολαστικά όπως υποδεικνύεται στις οδηγίες χειροκίνητης έκπλυσης. Το ανεπαρκές πλύσιμο θα οδηγήσει σε αυξημένο υπόβαθρο και μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Υπολείμματα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στα πηγαδάκια μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μειωμένου σήματος ή περιορισμένη αναπαραγωγιμότητα.
14. Περιμένετε τουλάχιστον 60 λεπτά προκειμένου το Hybrid Capture System Microplate Heater I να σταθεροποιηθεί 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 λεπτομέρειες.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

1. Κατόπιν παραλαβής 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.
2. Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν μετά την ημερομηνία λήξης του που αναγράφεται δίπλα στο σύμβολο  στην ετικέτα της συσκευασίας ή την ημερομηνία λήξης των παρασκευασμένων αντιδραστηρίων (βλ. παρακάτω).
3. Όλα τα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση, εκτός από το αντιδραστήριο αποδιάταξης, τους ανιχνευτές HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου και το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.

Για τον έλεγχο των δειγμάτων για τυχόν παρουσία κάποιου από τους 18 τύπους HPV παρέχεται μια μέθοδος συνδυασμού των μειγμάτων ανιχνευτών (CPC). Για δοκιμασία με χρήση αυτής της επιλογής, πρέπει να προετοιμαστεί ένα μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών αναμιγνύοντας μαζί αραιωμένο μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου και αραιωμένο μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου πριν από την εκτέλεση της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA. Η μέθοδος δύο ανιχνευτών χρησιμοποιεί ξεχωριστά μείγματα ανιχνευτών HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Βλ. παρακάτω οδηγίες.

**Για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου, ανατρέξτε στο *Rapid Capture System User Manual* για την προετοιμασία του(ων) μείγματος(ων) ανιχνευτών HPV, του διαλύματος έκπλυσης, του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1, και του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2, καθώς αυτές οι οδηγίες είναι ειδικές για τη χρήση αυτού του συστήματος για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου.**

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ
Αντιδραστήριο αποδιάταξης	<p><b>Πρώτη φάση προετοιμασίας:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Προσθέστε 5 σταγόνες χρωματικού δείκτη στη φιάλη του αντιδραστηρίου αποδιάταξης και αναμίξτε πλήρως. Το αντιδραστήριο αποδιάταξης πρέπει να αποκτήσει ένα ομοιόμορφο σκούρο μοβ χρώμα.</li> <li>• Μετά την προετοιμασία του, το αντιδραστήριο αποδιάταξης διατηρείται σταθερό για τρεις μήνες σε θερμοκρασία 2-8°C. Επικολλήστε μια ετικέτα με τη νέα ημερομηνία λήξης του. Εάν ξεθωριάσει το χρώμα, προσθέστε 3 επιπλέον σταγόνες χρωματικού δείκτη και αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση.</li> </ul> <p><b>Προειδοποίηση:</b> Το αντιδραστήριο αποδιάταξης είναι διαβρωτικό. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου. Απαιτείται προσοχή κατά το χειρισμό.</p>
Μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου (παρασκευασμένο από ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου και αντιδραστήρια με αραιωτικά ανιχνευτών)	<p><b>Παρασκευάζετε κατά την επώαση αποδιάταξης του δείγματος:</b></p> <p><b>Σημαντικό: Σε ορισμένες περιπτώσεις ο ανιχνευτής παγιδεύεται στο καπάκι του φιαλιδίου.</b></p> <p><b>Σημείωση:</b> Βεβαιωθείτε ότι αποτρέπετε την επιμόλυνση με RNάσες των ανιχνευτών και του μείγματος ανιχνευτών. Χρησιμοποιήστε ρύγχη πιπέτας με φραγμό αερολύματος για την αναρρόφηση του ανιχνευτή. Το αραιωτικό ανιχνευτή είναι ιξώδες.</p> <p><b>Διασφαλίστε την πλήρη ανάμειξη κατά την προετοιμασία των ανιχνευτών HPV. Κατά τη διαδικασία του στροβιλισμού πρέπει να σχηματιστεί ένας εμφανής στρόβιλος στο υγρό. Η ατελής ανάμειξη μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο σήμα.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Φυγοκεντρίστε το φιαλίδιο του <b>ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου</b> για σύντομο χρονικό διάστημα για να φέρετε το υγρό στον πυθμένα του φιαλιδίου. Κτυπήστε ελαφρά για να το αναμίξετε.</li> <li>• Προσδιορίστε την απαιτούμενη ποσότητα μείγματος ανιχνευτών (25 μl/δοκιμασία). Συνιστάται η προετοιμασία επιπλέον μείγματος ανιχνευτών ώστε να καλυφθεί ο όγκος που μπορεί να χαθεί στα ρύγχη της πιπέτας ή στα τοιχώματα του φιαλιδίου. Ανατρέξτε στους παρακάτω προτεινόμενους όγκους. Ο ελάχιστος συνιστώμενος αριθμός σε πηγαδάκια για κάθε χρήση είναι 24. Εάν επιθυμείτε λιγότερα από 24 πηγαδάκια ανά δοκιμασία, ο συνολικός αριθμός των εξετάσεων ανά kit μπορεί να μειωθεί εξαιτίας των περιορισμένων όγκων των ανιχνευτών και των αραιωτικών ανιχνευτών.</li> <li>• Μεταφέρετε την απαιτούμενη ποσότητα αραιωτικού ανιχνευτή σε ένα νέο αναλώσιμο</li> </ul>



δοχείο. Ανάλογα με τον αριθμό των εξετάσεων, συνιστάται ένα σωληνάριο από πολυπροπυλένιο χωρητικότητας 5 ml ή 15 ml με στρογγυλό πυθμένα και κουμπωτό πώμα. Πραγματοποιήστε αραιώση 1:25 του ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου στο αραιωτικό ανιχνευτή για να προετοιμάσετε το μείγμα ανιχνευτών.

Αριθμός εξετάσεων/ταινίες	Όγκος αραιωτικού ανιχνευτή*	Όγκος ανιχνευτή*
48/6	2,0 ml	80,0 μl
24/3	1,0 ml	40,0 μl
Ανά πηγαδάκι	0,045 ml	1,8 μl

\*Αυτές οι τιμές περιλαμβάνουν τον συνιστώμενο επιπλέον όγκο.

- Μεταφέρετε με πιπέτα ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου στο αραιωτικό ανιχνευτή τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέτας επάνω στο εσωτερικό τοίχωμα του σωληναρίου ακριβώς πάνω από το μηνίσκο και αποβάλλοντας τα περιεχόμενα. **Μην βυθίζετε το ρύγχος στο αραιωτικό ανιχνευτή.**
- Στροβιλίστε για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα για να αναμίξετε πλήρως. **Πρέπει να δημιουργηθεί εμφανής στρόβιλος.** Επικολλήστε ετικέτα με την ένδειξη «Μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου» και φυλάξτε σε καθαρό και κλειστό το δοχείο μέχρι τη χρήση. **Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο μείγμα ανιχνευτών.**

**Μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου**

Ακολουθήστε τον ίδιο τρόπο προετοιμασίας του μείγματος ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου που περιγράφεται παραπάνω. Επικολλήστε ετικέτα με την ένδειξη «Μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου». **Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο μείγμα ανιχνευτών.**

**Μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών**

Παρασκευάστε ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου και μείγματα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου κατά τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Προσθέστε το περιεχόμενο του αραιωμένου μείγματος HPV χαμηλού κινδύνου στο σωληνάριο του αραιωμένου μείγματος ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου. Αναδεύετε καλά με στροβιλισμό για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα. Πρέπει να δημιουργηθεί εμφανής στρόβιλος. Επικολλήστε ετικέτα με την ένδειξη «Μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών». **Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο μείγμα ανιχνευτών.**

**Ρυθμιστικό  
διάλυμα έκπλυσης**

**Προετοιμασία κατά το στάδιο της έκπλυσης:**

Για το **Hybrid Capture System Automated Plate Washer**, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μπορεί να προετοιμαστεί όπως περιγράφεται παρακάτω και να φυλαχθεί σε καλυμμένο δοχείο ή να προετοιμάζεται 1 L κάθε φορά και να τοποθετείται στα δοχεία έκπλυσης του Automated Plate Washer. Ανατρέξτε στον παρακάτω πίνακα για τους όγκους ανάμειξης:

Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) για οδηγίες φροντίδας και συντήρησης.

**Προειδοποίηση:** Το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης είναι τοξικό κατά την κατάποση. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστατευτικά ματιών/προσώπου. Για να ελαχιστοποιήσετε την έκθεση στο συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, προσθέστε σε αυτό νερό κατά την προετοιμασία του.

<b>Ποσ. συμπυκν. ρυθμ. διαλύματος έκπλυσης</b>	<b>Ποσ. απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού</b>	<b>Τελ. όγκος ρυθμ. διαλύμ. έκπλυσης</b>
33,3 ml	966,7 ml	1L
66,6 ml	1.933,4 ml	2L
100 ml	2.900 ml	3L

**Σημείωση:** Είναι πολύ σημαντικό να αφήνετε την ισχύ του Automated Plate Washer ενεργοποιημένη κάθε στιγμή. Με τον τρόπο αυτό θα γίνεται ξέπλυμα συντήρησης μετά από οκτώ ώρες μη-χρήσης της μονάδας.

Πριν από κάθε δοκιμασία, βεβαιωθείτε ότι το δοχείο αποβλήτων του Automated Plate Washer είναι άδειο και το δοχείο ξεπλύματος είναι γεμάτο με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

**Για τη μέθοδο έκπλυσης μικροπλακιδίου με το χέρι:**

- Αναμίξτε καλά το συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Αραιώστε 100 ml συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 2,9 L απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού στη συσκευή έκπλυσης και αναμίξτε καλά (ο τελικός όγκος πρέπει να είναι 3 L).
- Σφραγίστε το δοχείο για να αποτρέψετε τη μόλυνση ή την εξάτμιση.

Μετά την προετοιμασία του, το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης διατηρείται σταθερό για τρεις μήνες σε θερμοκρασία 2-30°C. Επικολλήστε την κατάλληλη ετικέτα με τη νέα ημερομηνία λήξης του. Σε περίπτωση ψύξης του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, χρησιμοποιήστε το αφού σταθεροποιηθεί σε θερμοκρασία 20-25°C.

Συνιστάται η συσκευή έκπλυσης και οι σωληνώσεις να καθαρίζονται με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5% και να ξεπλένονται καλά με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό κάθε τρεις μήνες προκειμένου να αποφεύγονται πιθανές μολύνσεις από αλκαλική φωσφατάση, η οποία υπάρχει στα βακτηρίδια και τους υφομύκητες.

**ΟΓΚΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΕΤΟΙΜΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ****Αντιδραστήριο  
ανίχνευσης 1 και  
αντιδραστήριο  
ανίχνευσης 2****Αμέσως πριν από τη χρήση:**

Αναμίξτε το αντιδραστήριο πλήρως, μετρήστε τον κατάλληλο όγκο του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 ή του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 σε ένα καθαρό δοχείο αντιδραστηρίου ακολουθώντας τις οδηγίες που δίνονται παρακάτω. Για να αποφύγετε τη μόλυνση, αυτά τα αντιδραστήρια **ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ** να επιστραφούν στις αρχικές φιάλες: **Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο υλικό μετά τη χρήση.** Εάν δεν χρησιμοποιείται 8-κάναλη πιπέτα, μπορεί να υποκατασταθεί με μια κατάλληλη επαναληπτική πιπέτα. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να παρασκευαστούν υποπολλαπλάσια του αντιδραστηρίου σε σωληνάριο από πολυπροπυλένιο μεγέθους τέτοιου που να χωρά τον απαιτούμενο όγκο, όπως υποδεικνύεται παρακάτω.

<b>Αρ. δοκιμασιών/ταινιών</b>	<b>Ανίχνευση όγκου αντιδραστηρίου 1 ή 2 περιεχόμενα της φιάλης</b>
96/12	7,0 ml
72/9	5,0 ml
48/6	3,0 ml
24/3	0,125 ml
1 δοκιμασία	

## ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται και μεταφέρονται με χρήση της συσκευής συλλογής *digene* HC2 DNA (που αποτελείται από τραχηλική βούρτσα και *digene* Specimen Transport Medium) ή δείγματα που συλλέγονται με χρήση συσκευής συλλογής τύπου σαρώθρου ή συσκευής συλλογής συνδυασμού βούρτσας/σπάτουλας και τοποθετούνται σε διάλυμα PreservCyt ή τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται σε υγρό διατήρησης Sure Path είναι τα μόνα δείγματα που συνιστώνται για χρήση με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Δείγματα τα οποία έχουν ληφθεί με άλλα μέσα δειγματοληψίας ή έχουν μεταφερθεί με άλλα μέσα μεταφοράς δεν είναι κατάλληλα για τη δοκιμασία αυτή. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης αυτού του kit μετρήθηκαν μόνο με τα kit συλλογής που υποδεικνύονται. Τα τραχηλικά δείγματα πρέπει να συλλέγονται πριν την εφαρμογή οξείκου οξέος ή ιωδίου εάν πρόκειται να πραγματοποιηθεί κολποσκοπική εξέταση. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης της συσκευής συλλογής *digene* HC2 DNA για πρόσθετες διαδικασίες συλλογής και χειρισμού των δειγμάτων.

### ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ STM

Τα δείγματα σε STM διατηρούνται έως δύο εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου και μπορούν να αποσταλούν στο εργαστήριο χωρίς ψύξη. Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται σε μονωμένο δοχείο και να παραλαμβάνονται εντός δύο ημερών το αργότερο. Στο μικροβιολογικό εργαστήριο τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C εφόσον η δοκιμασία πρόκειται να πραγματοποιηθεί εντός μίας εβδομάδας. Εάν η δοκιμασία πρόκειται να διενεργηθεί αργότερα από μία εβδομάδα, φυλάξτε τα δείγματα στους -20°C για έως 3 μήνες (ανατρέξτε στις *Σημειώσεις* στην ενότητα *Τραχηλικές βιοψίες* πριν από την κατάψυξη). 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 των κυττάρων. Η συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή δειγμάτων από έγκυες γυναίκες.

### ΤΡΑΧΗΛΙΚΕΣ ΒΙΟΨΙΕΣ

Οι φρέσκες συλλεγμένες τραχηλικές βιοψίες διατομής 2-5 mm μπορούν επίσης να εξετάζονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Τα δείγματα βιοψίας πρέπει να τοποθετούνται αμέσως σε 1,0 ml STM και να φυλάσσονται κατεψυγμένα στους -20°C. Τα δείγματα βιοψίας μπορούν να αποστέλλονται στους 2-30°C για αποστολή στο εξεταστικό εργαστήριο εντός μίας ημέρας και να φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να υποβληθούν σε επεξεργασία. Βιοψίες με διάμετρο μικρότερη των 2 mm δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

**Σημειώσεις:** Για να αποφύγετε την απασφάλιση των σωληναρίων δειγμάτων που αποστέλλονται ή καταψύχονται:

- Καλύψτε τα πώματα με Parafilm πριν από την αποστολή σωληναρίων δειγμάτων που έχουν προηγουμένως καταψυχθεί. Τα δείγματα μπορούν να αποσταλούν κατεψυγμένα ή σε θερμοκρασία 20-25°C.
- Κατά την αφαίρεση των δειγμάτων από τον καταψύκτη για την εξέτασή τους, αντικαταστήστε αμέσως τα πώματά τους με βιδωτά πώματα για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων.

### ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT

Δείγματα που συλλέγονται με χρήση συσκευής συλλογής τύπου σαρώθρου ή συσκευής συλλογής συνδυασμού βούρτσας/σπάτουλας και τοποθετούνται σε διάλυμα PreservCyt για χρήση στη δημιουργία αντικειμενοφόρων δοκιμασίας ThinPrep® Pap μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται με το συνηθισμένο τρόπο, και οι αντικειμενοφόροι δοκιμασίας ThinPrep Pap πρέπει να προετοιμάζονται σύμφωνα με τις οδηγίες της Hologic.

**Σημείωση:** Πρέπει να παραμείνουν τουλάχιστον 4 ml διαλύματος PreservCyt για τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Δείγματα με λιγότερο από 4 ml αφού προετοιμαστεί το τεστ Pap μπορεί να

μην περιέχουν αρκετό υλικό και θα μπορούσαν να είναι ψευδώς αρνητικά στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA.

Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt μπορούν να διατηρηθούν για έως τρεις μήνες σε θερμοκρασίες μεταξύ 2°C και 30°C, μετά τη συλλογή και πριν την επεξεργασία για τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt δεν καταψύχονται. Για την επεξεργασία αυτών των δειγμάτων, ανατρέξτε στη Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων σε PreservCyt.

## **ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΥΓΡΟ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ SUREPATH**

**(ΜΟΝΟ για δοκιμασίες HPV DNA υψηλού κινδύνου)**

Η χειροκίνητη προετοιμασία δείγματος των δειγμάτων SurePath διενεργείται με χρήση του σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση που προκύπτει από την προετοιμασία των αντικειμενοφόρων δοκιμασίας SurePath Pap. Προετοιμάστε τις αντικειμενοφόρους SurePath Pap σύμφωνα με τις ισχύουσες οδηγίες για τον επεξεργαστή αντικειμενοφόρων BD PrepStain®.

Σημαντικό: Αμέσως μετά την προετοιμασία των αντικειμενοφόρων SurePath Pap, πρέπει να μεταφερθούν με πιπέτα 2,0 ml του υγρού διατήρησης SurePath μέσα στο σωληνάριο φυγοκέντρισης που περιέχει το υπολειπόμενο σφαιρίδιο κυττάρων. Αυτό διατηρεί την ακεραιότητα του σφαιριδίου κυττάρων μετά τη διαβάθμιση για την απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 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 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.

Τα δείγματα μπορεί να περιέχουν μολυσματικούς παράγοντες και πρέπει να τα μεταχειρίζεστε ανάλογα. Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA μπορεί να διενεργηθεί χειροκίνητα σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες χρήσης ή χρησιμοποιώντας το όργανο Rapid Capture System για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου.

## **ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΔΙΕΚΠΕΡΑΙΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΟΓΚΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RAPID CAPTURE SYSTEM**

Το Rapid Capture System είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα διανομής με πιπέτα και αραίωσης γενικής χρήσης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου. Το σύστημα αυτό μπορεί να χειριστεί μέχρι 352 δείγματα σε οκτώ ώρες, συμπεριλαμβανομένου ενός διαστήματος 3,5 ωρών κατά τη διάρκεια του οποίου δεν απαιτείται παρέμβαση του χρήστη· μπορούν να παραχθούν αποτελέσματα για 704 δείγματα σε 13 ώρες. Η αποδιάταξη των δειγμάτων τα οποία προετοιμάζονται για δοκιμασία εκτελείται ανεξάρτητα από το RCS, πριν από την τοποθέτηση των δειγμάτων 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 μεθόδους όσο και στις μεθόδους RCS. Τα βήματα διαδικασίας της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA εκτελούνται με την ίδια σειρά όπως και η διαδικασία χειροκίνητων εξετάσεων. Η εφαρμογή RCS επιτρέπει τη σταδιακή επεξεργασία έως 4 μικροπλακιδίων, με κάθε πλακίδιο να περιέχει δείγματα και τους απαιτούμενους βαθμονομητές δοκιμασίας και ορούς ελέγχου ποιότητας.

Κατά τη χρήση του Rapid Capture System, ανατρέξτε στο *Rapid Capture System User Manual* που παρέχεται μαζί με το όργανο, επιπροσθέτως στις παρούσες οδηγίες χρήσης, για τις απαραίτητες διαδικαστικές και περιγραφικές πληροφορίες.

### **ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ**

#### **Διάταξη**

1. Εάν χρησιμοποιείτε το Microplate Heater I, **περιμένετε τουλάχιστον 60 λεπτά για να σταθεροποιηθεί στους  $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$  από μια ψυχρή εκκίνηση**. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) για λεπτομέρειες.
2. Επιβεβαιώστε ότι η θερμοκρασία του υδατόλουτρου βρίσκεται στους  $65^{\circ}\text{C}$  και ότι υπάρχει αρκετό νερό για να καλύψει ολόκληρο τον όγκο των σωληναρίων δειγμάτων.
3. 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 έως 30 λεπτά.

**Σημείωση:** Προετοιμάστε τα δείγματα SurePath το διάλυμα PreservCyt πριν από την εξισορρόπηση τυχόν αποδιαταγμένων δειγμάτων και αντιδραστηρίων σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Χρησιμοποιήστε το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* για να δημιουργήσετε τη διάταξη των πλακιδίων της δοκιμασίας. Ανατρέξτε στο κατάλληλο εγχειρίδιο χρήστη για οδηγίες σχετικά με τη δημιουργία μιας διάταξης πλακιδίου.
5. Τοποθετήστε τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα για εξέταση σε στατώ δοκιμαστικών σωληναρίων με την ίδια σειρά με την οποία πρόκειται να εξεταστούν. **ΠΡΩΤΑ πρέπει να εξετάσετε τον αρνητικό βαθμονομητή, τον βαθμονομητή HPV χαμηλού κινδύνου και τον βαθμονομητή HPV υψηλού κινδύνου.** Αρνητικός βαθμονομητής (NC), βαθμονομητής χαμηλού κινδύνου HPV (LRC) ή βαθμονομητής υψηλού κινδύνου HPV (HRC), ορός ελέγχου ποιότητας χαμηλού κινδύνου (QC1-LR), ορός ελέγχου ποιότητας υψηλού κινδύνου (QC2-HR) και δείγματα πρέπει να εκτελούνται σε διάταξη στηλών με 8 πηγαδάκια μικροπλακιδίων. Ανατρέξτε στο *Παράδειγμα διάταξης* παρακάτω.

Παράδειγμα διάταξης για διεξαγωγή με 24 πηγαδάκια μικροπλακιδίων:			
Σειρά	Στήλη		
	1	2	3
A	NC	Δείγμα 1	Δείγμα 9
B	NC	Δείγμα 2	Δείγμα 10
C	NC	Δείγμα 3	Δείγμα 11
D	LRC ή HRC	Δείγμα 4	Δείγμα 12
E	LRC ή HRC	Δείγμα 5	Δείγμα 13
F	LRC ή HRC	Δείγμα 6	Δείγμα 14
G	QC1-LR	Δείγμα 7	Δείγμα 15
H	QC2-HR	Δείγμα 8	Δείγμα 16

6. Εάν χρησιμοποιείτε τη μέθοδο μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών (CPC), τα NC, LRC και HRC εξετάζονται εις τριπλούν με το μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών στο ίδιο μικροπλακίδιο. Χρησιμοποιήστε τα πηγαδάκια A1, B1 και C1 για το NC και τα πηγαδάκια D1, E1, F1, G1, H1 και A2 για τα LRC και HRC αντίστοιχα. Χρησιμοποιήστε τα πηγαδάκια B2 και C2 για τους ορούς ελέγχου ποιότητας QC1-LR και QC2-HR αντίστοιχα και τα δείγματα που ξεκινούν από D2. **Η διαδικασία CPC δεν έχει επικυρωθεί για χρήση με το Rapid Capture System.**
7. Για τη μέθοδο δύο ανιχνευτών εξετάστε το μείγμα ανιχνευτών χαμηλού κινδύνου HPV στην αριστερή πλευρά του μικροπλακιδίου και το μείγμα ανιχνευτών υψηλού κινδύνου HPV στη δεξιά πλευρά του μικροπλακιδίου.

ΣΕ ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ, εξετάστε τον αρνητικό βαθμονομητή (NC) και τον βαθμονομητή χαμηλού κινδύνου (LRC) εις τριπλούν με το μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου. Κατόπιν εξετάστε τους ορούς ελέγχου ποιότητας (QC1-LR και QC2-HR) και τα δείγματα μεμονωμένα, καθώς επίσης και με το μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου. Τοποθετήστε τα παράγωγα των NC στις θέσεις A1, B1, C1, τα παράγωγα LRC στις θέσεις D1, E1, F1, το QC1-LR στη θέση G1, το QC2-HR στη θέση H1 και τα δείγματα ξεκινώντας από τη θέση A2.

ΣΤΗ ΣΥΝΕΧΕΙΑ, εξετάστε τον NC και τον βαθμονομητή υψηλού κινδύνου (HRC) εις τριπλούν με το μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου. Κατόπιν εξετάστε τα δείγματα QC1-LR και QC2-HR μεμονωμένα καθώς επίσης και με το μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου. Τοποθετήστε τα παράγωγα NC στις θέσεις A7, B7, C7, τα παράγωγα HRC στις θέσεις D7, E7, F7, το QC1-LR στη θέση G7, το QC2-HR στη θέση H7 και τα δείγματα ξεκινώντας από τη θέση A8. Δείτε το παραπάνω παράδειγμα διάταξης.

Ανατρέξτε στο εφαρμοζόμενο εγχειρίδιο χρήστη για τη σωστή διάταξη βαθμονομητών/ ορών ελέγχου ποιότητας/ δειγμάτων στο λογισμικό.

8. Διαφορετικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο ξεχωριστά μικροπλακίδια για ορούς ελέγχου, βαθμονομητές και δείγματα που εξετάζονται με ανιχνευτές HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Τα NC και LRC εξετάζονται εις τριπλούν και τα QC1-LR και QC2-HR εξετάζονται μεμονωμένα με μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου σε ένα μικροπλακίδιο, ενώ τα NC και HRC εξετάζονται εις τριπλούν και τα QC1-LR και QC2-HR εξετάζονται μεμονωμένα με μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου σε ένα δεύτερο μικροπλακίδιο. Χρησιμοποιήστε τα πηγαδάκια A1, B1 και C1 για το NC και τα πηγαδάκια D1, E1 και F1 για τα LRC ή HRC αντίστοιχα. Χρησιμοποιήστε τα πηγαδάκια G1 και H1 για τους ορούς ελέγχου ποιότητας QC1-LR και QC2-HR αντίστοιχα.
9. Τα δείγματα μπορούν να εξεταστούν μεμονωμένα με το μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών χρησιμοποιώντας τη Μέθοδο CPC ή μεμονωμένα με μείγμα ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου και μεμονωμένα με μείγμα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου εφόσον χρησιμοποιηθεί η μέθοδος δύο ανιχνευτών.

## ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

### Σημειώσεις:

- **Προειδοποίηση:** Το αντιδραστήριο αποδιάταξης είναι διαβρωτικό. Να είστε προσεκτικοί και να φοράτε γάντια χωρίς-πούδρα κατά το χειρισμό.
- **Σημαντικό:** Ορισμένα τραχηλικά δείγματα πιθανόν να περιέχουν αίμα ή άλλο βιολογικό υλικό το οποίο ενδεχομένως να συγκαλύψει τις χρωματικές αλλαγές μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου αποδιάταξης. Δείγματα τα οποία παρουσιάζουν σκούρο χρώμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου αποδιάταξης πιθανόν να μην εμφανίσουν τη σωστή χρωματική αλλαγή σε αυτή τη φάση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αποτυχία εμφάνισης των σωστών χρωματικών αλλαγών δεν θα επηρεάσει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Η σωστή ανάμειξη μπορεί να εξακριβωθεί παρατηρώντας τις χρωματικές αλλαγές των βαθμονομητών και των ορών ελέγχου ποιότητας.
- Κατά το στάδιο της αποδιάταξης και του υβριδισμού, βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού στο υδατόλουτρο είναι αρκετά υψηλή ώστε να βυθίζεται πλήρης ο όγκος που περιέχεται στο σωληνάριο δειγμάτων.
- Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα μπορούν να προετοιμαστούν μέχρι και το βήμα αποδιάταξης και να φυλαχθούν στους 2-8°C κατά τη διάρκεια μίας νύχτας ή στους -20°C για έως 3 μήνες. Επιτρέπονται το πολύ 3 κύκλοι ψύξης/τήξης με μέγιστη διάρκεια 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου για κάθε κύκλο τήξης. Αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση.
- Μετά την αποδιάταξη και επώαση, τα δείγματα δεν θεωρούνται πλέον μολυσματικά.<sup>26</sup> Ωστόσο, το εργαστηριακό προσωπικό θα πρέπει να συνεχίζει να τηρεί τις εθνικές/τοπικές προφυλάξεις.
- Μην αφαιρείτε το δειγματολήπτη πριν από την αποδιάταξη.
- Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, είναι σημαντικό όλα τα υλικά των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου ποιότητας και των δειγμάτων STM να έρθουν σε επαφή με το αντιδραστήριο αποδιάταξης. Η ανάμειξη μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου αποδιάταξης είναι πολύ σημαντικό βήμα: **Βεβαιωθείτε ότι το Multi-Specimen Tube Vortexer 2 είναι ρυθμισμένο στο 100 (μέγιστη ταχύτητα) και παρατηρείται εμφανής στροβιλισμός του υγρού κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, έτσι ώστε το υγρό να ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου. Αν ο στροβιλισμός γίνεται με το χέρι, βεβαιωθείτε ότι κάθε βαθμονομητής, ορός ελέγχου και δείγμα αναμιγνύονται μεμονωμένα, στροβιλίζοντας το καθένα για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα, έτσι ώστε το υγρό να ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου αναστρέφοντάς το μία φορά.**

### Διαδικασία προετοιμασίας βαθμονομητών, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM

1. Αφαιρέστε και απορρίψτε τα πώματα από τα σωληνάρια που περιέχουν τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα σε STM.

**Σημείωση:** Τα πώματα που αφαιρούνται από τα σωληνάρια των δειγμάτων θεωρούνται δυνητικώς λοιμώδη. Να τα απορρίπτεται σύμφωνα με τους εθνικούς/τοπικούς κανονισμούς.

2. Μεταφέρετε το αντιδραστήριο αποδιάταξης με χρωματικό δείκτη σε κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας ή δείγμα σε STM χρησιμοποιώντας μια επαναληπτική ή ρυθμιζόμενη πιπέτα. Φροντίστε να μην αγγίξετε τα τοιχώματα του σωληναρίου ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση των δειγμάτων. Ο απαιτούμενος όγκος αντιδραστηρίου αποδιάταξης πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος. Ο ακριβής όγκος για κάθε τύπο βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας και δείγματος παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα.

**Αραιώστε το υπολειπόμενο αντιδραστήριο αποδιάταξης σε μια φιάλη πριν την απόρριψη σύμφωνα με τις εθνικές/τοπικές εργαστηριακές διαδικασίες.**

Βαθμονομητής, ορός ελέγχου ποιότητας ή δείγμα	Απαιτούμενοι όγκοι αντιδραστηρίου αποδιάταξης
Αρνητικός βαθμονομητής	1.000 μl
Βαθμονομητής HPV χαμηλού ή υψηλού κινδύνου	500 μl
Οροί ελέγχου ποιότητας χαμηλού ή υψηλού κινδύνου	500 μl



3. Αναμίξτε τα δείγματα εφαρμόζοντας μία από τις δύο παρακάτω μεθόδους.

#### Μέθοδος Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

**Σημείωση:** Δείγματα συσκευής συλλογής *digene* HC2 DNA που έχουν αναμειχθεί με χρήση του MST Vortexer 2 **πρέπει** να υβριδίζονται με χρήση της μεθόδου μικροπλακιδίου υβριδισμού και Microplate Heater I.

- Καλύψτε τα σωληνάρια βαθμονομητή, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM 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 δύο πλευρικά κλιπ. Κόψτε τη μεμβράνη με τον κόφτη.
- Τοποθετήστε το στατώ στο Multi-Specimen Tube Vortexer 2 και ασφαλίστε το στατώ με το σφιγκτήρα. Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση ταχύτητας είναι στο 100 (μέγιστη ταχύτητα) και στρέψτε το διακόπτη τροφοδοσίας του vortexer στη θέση ON (ενεργοποίηση). Στροβιλίστε τα σωληνάρια για 10 δευτερόλεπτα.

#### Μέθοδος στροβιλισμού μεμονωμένων σωληναρίων με το χέρι

- Επαναπωματίστε τα σωληνάρια βαθμονομητή, ορών ελέγχου ποιότητας και δειγμάτων STM με καθαρά βιδωτά πώματα σωληναρίων συλλογής δειγμάτων.
- Αναμίξτε πλήρως κάθε σωληνάριο στροβιλίζοντας ξεχωριστά, σε υψηλή ταχύτητα, για 5 δευτερόλεπτα.
- Αναστρέψτε κάθε σωληνάριο δείγματος μία φορά για να πλυθεί το εσωτερικό του σωληναρίου, το καπάκι και το χείλος.
- Επιστρέψτε το σωληνάριο στο στατώ.

Ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο στροβιλισμού, **πρέπει να παρατηρείται εμφανής στροβιλισμός του υγρού στο εσωτερικό του κάθε σωληναρίου κατά τη διάρκεια της ανάμειξης, έτσι ώστε το υγρό να ξεπλύνει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου.** Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας καθώς και τα δείγματα πρέπει να αποκτήσουν μοβ χρώμα.

4. Επώαστε τα σωληνάρια στο στατώ σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  για  $45 \pm 5$  λεπτά (βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας και δείγματα τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να εξεταστούν άμεσα ή να αποθηκευτούν όπως περιγράφεται στις παραπάνω σημειώσεις). Κατά τη διάρκεια της επώασης παρασκευάστε το μείγμα ή τα μείγματα ανιχνευτών HPV. Ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων*.

#### **Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt**

##### **Σημειώσεις:**

- Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης του kit μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 για πλήρεις λεπτομέρειες.
- Η επεξεργασία ενός υποπολλαπλασίου 4 ml του διαλύματος PreservCyt παράγει υλικό που επαρκεί για 2 δοκιμασίες, όταν η διεξαγωγή γίνεται με το χέρι. Ο ελάχιστος όγκος που μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία είναι 4 ml.
- Ετοιμάστε τα δείγματα του διαλύματος PreservCyt σε δέσμες των 36 ή λιγότερων· σε αντίθετη περίπτωση, τα σφαιρίδια μπορεί να αποσπαστούν κατά τη μετάγγιση του υπερκείμενου υγρού. Αυτό είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού σφαιριδίου στο στάδιο της μετάγγισης. Αν ετοιμάζετε επιπλέον φιαλίδια με διάλυμα PreservCyt, μην ξεκινάτε την προετοιμασία τους πριν την ολοκλήρωση της προετοιμασίας της πρώτης δέσμης.

## Προετοιμασία αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιήστε είτε το αντιδραστήριο αποδιάταξης (DNR) που παρέχεται με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA (ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων*) είτε το DNR που παρέχεται με το κιτ μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2. Για την προετοιμασία του DNR που παρέχεται με το κιτ μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2, προσθέστε 3 σταγόνες χρωματικού δείκτη στη φιάλη του DNR και αναμίξτε καλά. Το διάλυμα πρέπει να αποκτήσκει ένα ομοιόμορφο σκούρο μοβ χρώμα. Για τον προσδιορισμό των απαιτήσεων όγκου, χρησιμοποιήστε τον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1**

### **Απαιτήσεις όγκου: Προετοιμασία αντιδραστηρίου**

<b>Αριθμός δοκιμασιών</b>	<b>Όγκος διαλύματος PreservCyt</b>	<b>Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος μετατροπής</b>
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2, ένα κωνικό σωληνάριο Sarstedt των 10 ml, ή ένα κωνικό σωληνάριο μάρκας VWR ή Corning των 15 ml με τον κατάλληλο αριθμό αναγνώρισης δείγματος.
2. Χειρισμός ενός δείγματος τη φορά:
  - a. Ανακινήστε δυνατά κάθε φιαλίδιο με διάλυμα PreservCyt μέχρι τα κύτταρα να εμφανίζονται ομοιογενώς κατανεμημένα.
  - b. Επειδή τα κύτταρα κατακάθονται πολύ γρήγορα, μεταφέρετε με πιπέτα αμέσως τον κατάλληλο όγκο δείγματος PreservCyt στο σωληνάριο με την ανάλογη ετικέτα. Διανείμετε το διάλυμα PreservCyt στον πυθμένα του κωνικού σωληναρίου ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση κυτταρικού υλικού στο εσωτερικό του σωληναρίου.
3. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μετατροπής δειγμάτων σε κάθε σωληνάριο (ανατρέξτε στον Πίνακα 1).
4. Επανατοποθετήστε το πώμα και ανακινήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου χρησιμοποιώντας ένα μείκτη ισχυρής ανάδευσης με προσαρτημένο κύπελλο.

**Σημείωση:** Η διαδικασία MST Vortexer 2 δεν έχει επικυρωθεί για τον στροβιλισμό δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt με ρυθμιστικό διάλυμα μετατροπής δείγματος πριν από τη φυγοκέντρωση και συνεπώς δεν πρέπει να εφαρμόζεται σε αυτό το στάδιο.
5. Φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια σε στροφέα ταλαντευόμενου κάδου στα  $2.900 \pm 150 \times g$  για  $15 \pm 2$  λεπτά.

6. Κατά τη φυγοκέντριση, παρασκευάστε το μείγμα του μέσου μεταφοράς δείγματος/αντιδραστηρίου αποδιάταξης (STM/DNR) σε αναλογία 2:1, σύμφωνα με τον Πίνακα 2.

**Σημείωση: Το μείγμα STM/DNR πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο κάθε ημέρα διεξαγωγής δοκιμασίας.**

- a. Για τον προσδιορισμό του συνολικού όγκου του απαιτούμενου μείγματος STM/DNR, χρησιμοποιήστε τον αρχικό όγκο του δείγματος σε διάλυμα PreservCyt ως οδηγό και κατόπιν πολλαπλασιάστε τον όγκο «ανά σωληνάριο» STM και DNR επί τον αριθμό των δειγμάτων προς επεξεργασία (ανατρέξτε στον Πίνακα 2).

**Πίνακας 2**  
**Απαιτήσεις όγκου: STM/DNR**

Αριθμός δοκιμασιών	Όγκος διαλύματος PreservCyt	Όγκος STM ανά σωληνάριο για το τελικό μείγμα STM/DNR*	Όγκος DNR ανά σωληνάριο για το τελικό μείγμα STM/DNR*	Μείγμα STM/DNR που προστίθεται στο σωληνάριο
1-2	4 ml	120 μl	60 μl	150 μl
3	6 ml	170 μl	85 μl	225 μl
4	8 ml	220 μl	110 μl	300 μl
5	10 ml	270 μl	135 μl	375 μl
6	12 ml	320 μl	160 μl	450 μl

\* Οι όγκοι που παρατίθενται σε αυτές τις στήλες δεν πρέπει να προστίθενται απευθείας στο σωληνάριο δείγματος.

- b. Αναμίξτε το διάλυμα πλήρως με στροβιλισμό.
7. Αφαιρέστε τα σωληνάκια από τη συσκευή φυγοκέντρισης ένα προς ένα και τοποθετήστε τα σε στατώ ή στατώ μετατροπής. Ένα ροζ/πορτοκαλί σφαιρίδιο θα πρέπει να είναι παρόν στον πυθμένα του κάθε σωληναρίου.

**Σημείωση:** Δείγματα στα οποία δεν υπάρχει εμφανές σφαιρίδιο μετά τη φυγοκέντριση δεν ενδείκνυται για τη δοκιμασία και πρέπει να απορρίπτονται.

8. Χειρισμός μεμονωμένων σωληναρίων:
- Αφαιρέστε το πώμα και τοποθετήστε το επάνω σε ένα καθαρό χαρτομάντιλο χωρίς χνούδι.
  - Αδειάστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό.
  - Διατηρήστε το σωληνάριο σε ανεστραμμένη θέση, στυπώστε το προσεκτικά (χτυπώντας περίπου 6 φορές) σε απορροφητικά χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι μέχρι να μην στάζει υγρό από το σωληνάριο. Χρησιμοποιείτε μια καθαρή πλευρά του χαρτομάντιλου κάθε φορά. **Μην** αφήσετε το σφαιρίδιο κυττάρων να ολισθήσει προς τα κάτω στο σωληνάριο κατά τη στύπωση.
- Σημειώσεις:**
- Μην στυπώνετε δύο φορές στο ίδιο σημείο του απορροφητικού χαρτομάντιλου χωρίς χνούδι.
  - Είναι σημαντικό να αφαιρεθεί η μέγιστη ποσότητα διαλύματος PreservCyt με το στύπωμα. Ωστόσο, είναι φυσιολογικό να υπάρχουν υπολείμματα διαλύματος PreservCyt μετά το στύπωμα.
- d. Τοποθετήστε το σωληνάριο σε στατώ ή στο Στατώ Μετατροπής.

## ΣΤΡΟΒΙΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

### Διαδικασία στροβιλισμού με το χέρι

1. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο μείγματος STM/DNR σε κάθε σφαιρίδιο (δείτε τον Πίνακα 2). Επανατοποθετήστε το πώμα και εναιωρήστε κάθε σφαιρίδιο μεμονωμένα στροβιλίζοντας κάθε σωληνάριο για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Αν η εναιώρηση κάποιου σφαιριδίου είναι δύσκολη, στροβιλίστε για επιπλέον 10-30 δευτερόλεπτα ή έως ότου το σφαιρίδιο αποδεσμευτεί από τη βάση του σωληναρίου. Σε περίπτωση που κάποιο σφαιρίδιο παραμείνει αδιάλυτο μετά τον πρόσθετο στροβιλισμό (μέγιστης διάρκειας 2 λεπτών), σημειώστε την ταυτότητα του δείγματος και προχωρήστε στο επόμενο βήμα.
2. Τοποθετήστε τα σωληνάκια σε στατώ.
3. Τοποθετήστε το στατώ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  για  $15 \pm 2$  λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού επαρκεί για να καλύψει όλο το υγρό στα σωληνάκια.
4. Απομακρύνετε το στατώ με τα δείγματα από το υδατόλουτρο και στροβιλίστε τα δείγματα μεμονωμένα για 15-30 δευτερόλεπτα.  
**Σημείωση:** Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σφαιρίδια έχουν εναιωρηθεί πλήρως σε αυτό το στάδιο. Δείγματα τα οποία εξακολουθούν να περιέχουν ορατά σφαιρίδια δεν ενδείκνυνται για τη δοκιμασία και πρέπει να απορριφθούν.
5. Επαναφέρετε το στατώ στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  και συνεχίστε την αποδιάταξη για άλλα  $30 \pm 3$  λεπτά.
6. Προχωρήστε στο βήμα *υβριδισμού* ή δείτε το *προαιρετικό σημείο διακοπής* για τη φύλαξη και τη μεταχείριση των αποδιαταγμένων δειγμάτων.

### Διαδικασία Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

#### Σημειώσεις:

- Η διαδικασία Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 έχει επικυρωθεί για την επεξεργασία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt ύστερα από φυγοκέντριση και μετάγγιση του υπερκείμενου υγρού.
  - Μόνο το MST Vortexer 2 είναι ειδικά σχεδιασμένο για την επεξεργασία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt.
  - Το στατώ μετατροπής και το καπάκι είναι ειδικά σχεδιασμένα για να συγκρατούν τα σωληνάκια μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 (κωνικά σωληνάκια μάρκας VWR ή Corning των 15 ml). Ο χρήστης πρέπει να χρησιμοποιεί μόνο έναν τύπο σωληναρίων στο Στατώ Μετατροπής κάθε φορά. Άλλες μάρκες δεν έχουν επικυρωθεί για χρήση.
  - Απαιτείται αυστηρή τήρηση των προκαθορισμένων χρόνων στροβιλισμού για το στατώ μετατροπής και το καπάκι.
  - Το στατώ μετατροπής και το καπάκι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το στροβιλισμό βαθμονομητών και ορών ελέγχου ποιότητας του kit *digene* HC2 DNA. Το ύψος των σωληναρίων STM είναι τέτοιο ώστε να εμποδίζεται ο επαρκής στροβιλισμός τους με το στατώ μετατροπής και το καπάκι.
1. Αφού στυπώσετε κάθε κωνικό σωληνάριο των 15 ml με την κατάλληλη ετικέτα, τοποθετήστε τα
  2. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο μείγματος STM/DNR σε κάθε σφαιρίδιο (Πίνακας 2).
  3. Καλύψτε τα κωνικά σωληνάκια των 15 ml με μεμβράνη σφραγίσματος σωληναρίων DuraSeal, τραβώντας τη μεμβράνη επάνω από τα σωληνάκια στο στατώ.
  4. Τοποθετήστε το καπάκι του στατώ επάνω από τα σωληνάκια που έχουν καλυφθεί με τη μεμβράνη και ασφαλίστε το καπάκι με τους δύο πλευρικούς σφιγκτήρες. Έχοντας ασφαλίσει το καπάκι, κόψτε τη μεμβράνη με τον κόφτη.
  5. Μετακινήστε την κόκκινη λαβή προς τα επάνω, ώστε να βρίσκεται σε οριζόντια θέση.

6. Τοποθετήστε το στατώ μετατροπής και το καπάκι στο MST Vortexer 2 κατά τρόπο ώστε η μεγαλύτερη γωνία του στατώ μετατροπής να βρίσκεται στη δεξιά μπροστινή γωνία. Τοποθετήστε το στατώ και το καπάκι στην πλατφόρμα του MST Vortexer 2, κατά τρόπο ώστε να εφαρμόζει με ασφάλεια ανάμεσα στους οδηγούς. Ασφαλίστε το στατώ πιέζοντας την κόκκινη λαβή προς τα κάτω στην κάθετη θέση. Με την κίνηση αυτή το στατώ θα κλειδώσει.
7. Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση ταχύτητας είναι στο 100 (μέγιστη ταχύτητα) και ο διακόπτης εναλλαγής παλμογεννήτριας βρίσκεται στη θέση OFF (απενεργοποίηση).
8. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση ON. **Στροβιλίστε τα σωληνάρια για 30 δευτερόλεπτα.**
9. Στρέψτε το διακόπτη ισχύος του Vortexer στη θέση OFF.
10. Αφαιρέστε το στατώ μετατροπής και το καπάκι από το MST Vortexer 2 τραβώντας την κόκκινη λαβή προς τα επάνω.
11. Τοποθετήστε το στατώ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  για  $15 \pm 2$  λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού καλύπτει πλήρως όλο το υγρό σε όλα τα σωληνάρια.
12. Μετά την επώαση διάρκειας 15 λεπτών, αφαιρέστε το στατώ με τα δείγματα από το υδατόλουτρο.
13. Για να αποφύγετε τυχόν παφλασμό, στεγνώστε το στατώ από το περιττό νερό πριν το τοποθετήσετε στο MST Vortexer 2.
14. Αφαιρέστε το στατώ μετατροπής και το καπάκι από το MST Vortexer 2 όπως περιγράφεται στο βήμα 6.
15. Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση ταχύτητας είναι στο 100 και στρέψτε το διακόπτη τροφοδοσίας του Vortexer στη θέση ON. **Στροβιλίστε τα σωληνάρια για 1 λεπτό.**
16. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας στη θέση OFF.  
**Σημείωση:** Η διαδικασία MST Vortexer 2 τυποποιεί την ταχύτητα, τους χρόνους και τη διαδικασία μίξης, εξαλείφοντας την ανάγκη οπτικού ελέγχου των κυτταρικών σφαιριδίων, ο οποίος απαιτείται κατά την εφαρμογή της διαδικασίας μη-αυτόματου στροβιλισμού.
17. Επαναφέρετε το στατώ στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  και συνεχίστε την αποδιάταξη για  $30 \pm 3$  λεπτά.
18. Αφαιρέστε το στατώ από το υδατόλουτρο, στεγνώστε το και ασφαλίστε το στο vortexer.
19. Στρέψτε το διακόπτη ισχύος του Vortexer στη θέση ON. **Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα.**
20. Στρέψτε το διακόπτη ισχύος του Vortexer στη θέση OFF. Αφαιρέστε το στατώ.
21. Αφαιρέστε αμέσως το καπάκι του στατώ και τη μεμβράνη σφραγίσματος σωληναρίων DuraSeal από τα δείγματα.
22. Προχωρήστε στο βήμα *υβριδισμού* ή δείτε το *προαιρετικό σημείο διακοπής* για τη φύλαξη και τη μεταχείριση των αποδιαταγμένων δειγμάτων.

#### **Διαδικασία προετοιμασίας δείγματος SurePath (MONO για την δοκιμασία HPV DNA υψηλού κινδύνου)**

Μετά την κυτταρολογική επεξεργασία, προχωρήστε όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Διασφαλίστε ότι το παρατηρούμενο υγρό ισούται με 2,8 ml.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Εάν το υπολειπόμενο σφαιρίδιο κυτάρων φαίνεται να περιέχει λιγότερο από 1 ml υγρού, είναι πιθανό ότι δεν προστέθηκε υγρό διατήρησης SurePath μετά την κυτταρολογική εξέταση και ότι το δείγμα ΔΕΝ είναι κατάλληλο για δοκιμασία HPV DNA υψηλού κινδύνου.

2. Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα έχουν σταθεροποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Φυγοκεντρίστε το δείγμα σε στροφέα ταλαντευόμενου κάδου στα  $800 \pm 15 \times g$  για  $10 \pm 1$  λεπτά.

4. Αφαιρέστε τα σωληνάρια από τη φυγόκεντρο.
5. Αμέσως μετά τη φυγόκεντρωση, μεταγγίστε προσεκτικά το υπερκείμενο και συττώστε κάθε σωληνάριο με ήπιο τρόπο (~3 φορές) σε απορροφητικό χαρτομάντιλο για την απομάκρυνση της περίσσειας του υγρού. Σε κάθε σωληνάριο παρατηρήστε το σφαιρίδιο. **Μην αφήσετε τα σφαιρίδια κυττάρων να ολισθήσουν προς τα κάτω στο σωληνάριο κατά τη σύτπωση.**
6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στο στατώ.
7. Προσθέστε 200 μl STM σε κάθε σφαιρίδιο χρησιμοποιώντας επαναληπτική ή ρυθμιζόμενη πιπέτα.  
**Σημείωση:** Τα σωληνάρια μπορούν να αναμιχθούν χωρίς πώματα.
8. Εναιωρήστε κάθε σφαιρίδιο αναδεύοντας ισχυρά κάθε σωληνάριο ξεχωριστά επί 15 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα. Αν η εναιώρηση κάποιου σφαιριδίου είναι δύσκολη, αναδεύστε ισχυρά για επιπλέον 5 έως 30 δευτερόλεπτα ή έως ότου το σφαιρίδιο αποδεσμευτεί από τη βάση του σωληναρίου και να φανεί να αρχίσει να διαλύεται.
9. Χρησιμοποιώντας μια επαναληπτική ή ρυθμιζόμενη πιπέτα, μεταφέρετε σε κάθε δείγμα 100 μl παρασκευασμένου αντιδραστηρίου αποδιάταξης (με χρωματικό δείκτη).  
**ΠΡΟΣΟΧΗ: Φροντίστε να μην αγγίξετε τα τοιχώματα του σωληναρίου ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση των δειγμάτων.**  
Σε περίπτωση απόρριψης του υπόλοιπου αντιδραστηρίου αποδιάταξης, τηρήστε τους ισχύοντες τοπικούς, πολιτειακούς και ομοσπονδιακούς κανονισμούς για την απόρριψη των διαβρωτικών ουσιών.
10. Αναμίξτε καλά κάθε σωληνάριο, στροβιλίζοντάς το μεμονωμένα σε μέγιστη ταχύτητα και για 5 δευτερόλεπτα.  
**Σημείωση:** Τα σωληνάρια μπορούν να αναμιχθούν χωρίς πώματα.  
Επισημάνετε ένα κωνικό σωληνάριο των 15-ml με την κατάλληλη ταυτοποίηση για το δείγμα και τον τύπο (για παράδειγμα «SP» για τύπο δείγματος SurePath) και τοποθετήστε την στο στατώ.  
**Σημείωση:** Εάν χρησιμοποιείται το Rapid Capture System για ημι-αυτοματοποιημένη επεξεργασία της δοκιμασίας, πρέπει να χρησιμοποιηθούν κωνικά σωληνάρια μάρκας VWR ή Corning των 15 ml για τη σωστή τοποθέτηση στο στατώ μετατροπής *digene* (ασημί rack).
11. Μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο του σωληναρίου σε ένα κωνικό σωληνάριο των 15 ml με βιδωτό καπάκι χρησιμοποιώντας μια αναλώσιμη πιπέτα μεταφοράς των 7-ml με τυπικό ρύγχος ή ισοδύναμη<sup>1</sup>.
12. Τοποθετήστε το πώμα στα κωνικά σωληνάρια των 15 ml.
13. Επώαστε σε υδατόλουτρο 65 ± 2°C για 90 ± 5 λεπτά.  
**ΠΡΟΣΟΧΗ: Αυτός ο χρόνος επώασης είναι μεγαλύτερος από τον απαιτούμενο για άλλους εγκεκριμένους τύπους δειγμάτων.**
14. Εάν η εξέταση HPV πρόκειται να ολοκληρωθεί την ίδια ημέρα, αποδιατάξτε τους βαθμονομητές της δοκιμασίας *digene* HC2 DNA σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες χρήσης.
15. Αφαιρέστε το στατώ των δειγμάτων από το υδατόλουτρο.

#### Προαιρετικό σημείο διακοπής

Μετά την αποδιάταξη, τα δείγματα STM και τα τροποποιημένα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt και SurePath μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 2 - 8°C για διάστημα μίας ημέρας ή σε θερμοκρασία -20°C για μέγιστο διάστημα 3 μηνών. Σε περίπτωση ημερήσιας ψύξης, τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν στο Στατώ Μετατροπής, αφού τοποθετήσετε καθαρή μεμβράνη DuraSeal και καθαρό καπάκι στατώ. Πριν από τη αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C, πρέπει να αφαιρεθεί το καπάκι και η μεμβράνη DuraSeal και να τοποθετηθούν πώματα στα σωληνάρια. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα

<sup>1</sup> Για τις εξετάσεις επαλήθευσης της QIAGEN χρησιμοποιήθηκαν κωνικά σωληνάρια των 15 ml της εταιρείας VWR

πρέπει να σταθεροποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25°C) και να υποβληθούν σε πλήρη στροβιλισμό πριν προχωρήσετε στο βήμα υβριδισμού.

**Σημείωση:** Μη φυλάσσετε ή αποστέλλετε αποδιαταγμένα δείγματα σε ξηρό πάγο.

Επιτρέπονται το πολύ 3 κύκλοι ψύξης/τήξης με μέγιστη διάρκεια 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου για κάθε κύκλο τήξης.

## **ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ: ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ (CPC) ΚΑΙ ΔΥΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ**

### **Σημειώσεις:**

- Τα μείγματα ανιχνευτών HPV είναι κολλώδη. Βεβαιωθείτε ότι το μείγμα ανιχνευτών έχει αναμιχθεί πλήρως και ότι η απαιτούμενη ποσότητα έχει διανεμηθεί πλήρως μέσα σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου. Ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων*.
- Σε περίπτωση όπου το δείγμα το οποίο υπέστη αποδιάταξη έχει αποθηκευτεί σε θερμοκρασία -20°C, περιμένετε ώσπου το δείγμα να φτάσει σε θερμοκρασία τήξης 20-25°C και στροβιλίστε το επαρκώς πριν προχωρήσετε στον υβριδισμό.
- Προθερμάνετε το Microplate Heater I σε θερμοκρασία  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  για τουλάχιστον 60 λεπτά πριν από τη χρήση. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) για περαιτέρω οδηγίες όπως απαιτείται.

### **Μέθοδος υβριδισμού με χρήση του πλακιδίου υβριδισμού και του Microplate Heater I**

**Σημείωση:** Τα δείγματα που συλλέγονται με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA σε STM και υποβάλλονται σε επεξεργασία με χρήση της μεθόδου MST Vortexer 2 μπορούν να υβριδιστούν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Microplate Heater I **μόνο**.

1. Πάρτε ένα μικροπλακίδιο υβριδισμού και επικολλήστε σε αυτό μια ετικέτα.
2. Μετά την επώαση, αφαιρέστε τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα από το υδατόλουτρο. Εάν χρησιμοποιείται το Multi-Specimen Tube Vortexer 2, στροβιλίστε ολόκληρο το στατώ των δειγμάτων STM για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ρύθμιση ταχύτητας. Για τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt, στροβιλίστε ολόκληρο το στατώ μετατροπής για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Διαφορετικά, στροβιλίστε κάθε σωληνάριο ξεχωριστά για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.
3. Μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας ή δείγμα στον **πυθμένα** ενός κενού πηγαδιού μικροπλακιδίου υβριδισμού ακολουθώντας τη διάταξη πλακιδίου που δημιουργήθηκε σύμφωνα με την ενότητα *Διάταξη*. Αποφύγετε την επαφή με τα τοιχώματα των πηγαδιών και περιορίστε το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα. Σε κάθε μεταφορά να χρησιμοποιείτε ένα καθαρό και μεγάλο μεγέθους ρύγχος πιπέτας προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου ποιότητας ή των δειγμάτων. Μην αφαιρείτε το δειγματολήπτη από το σωληνάριο μεταφοράς δείγματος. Δείγματα τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να σφραγιστούν με βιδωτά πώματα για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων και να αποθηκευτούν μαζί με τους δειγματολήπτες που παραμένουν στα σωληνάρια. Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να καλυφθούν με τα αρχικά τους πώματα.

**Σημείωση:** Είναι πιθανό να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα εάν τα υποπολλαπλάσια των δειγμάτων δεν μεταφερθούν προσεκτικά. Κατά τη μεταφορά των δειγμάτων, μην αγγίζετε το εσωτερικό του σωληναρίου με το ρύγχος της πιπέτας κατά την αναρρόφηση του υποπολλαπλασίου των 75 μl.

4. Μετά τη μεταφορά του τελευταίου δείγματος, καλύψτε το πλακίδιο με ένα καπάκι πλακιδίου και **επώαστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού για 10 λεπτά στους 20-25°C**.

5. Υποπολλαπλασιάστε το παρασκευασμένο και καλά στροβιλισμένο μείγμα ανιχνευτών σε ένα αναλώσιμο δοχείο αποθήκευσης αντιδραστηρίων. Μεταφέρετε προσεκτικά 25 μl του μείγματος ανιχνευτών σε κάθε πηγαδάκι το οποίο περιέχει βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα, χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα και νέα ρύγχη για κάθε σειρά. Διανείμετε τον όγκο του ανιχνευτή σε κάθε πηγαδάκι υβριδισμού, αποφεύγοντας τον ανάδρομο παφλασμό. Αποφύγετε την επαφή με τα τοιχώματα του πηγαδιού. Τοποθετήστε το κάλυμμα του πλακιδίου επάνω στο μικροπλακίδιο για όλη τη διάρκεια επώασης της αποδιάταξης.
6. Καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού με ένα κάλυμμα πλακιδίου και ανακινήστε με χρήση του Rotary Shaker I του Hybrid Capture System στη θέση  $1.100 \pm 100$  rpm για  $3 \pm 2$  λεπτά. *Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα πρέπει να γίνουν κίτρινα μετά την ανακίνηση.* Πηγαδάκια τα οποία διατηρούν το μοβ χρώμα πιθανόν να μην έχουν δεχτεί την κατάλληλη ποσότητα μείγματος ανιχνευτών. Προσθέστε επιπλέον 25 μl του μείγματος ανιχνευτών στα δείγματα που παραμένουν μοβ και ανακινήστε ξανά. Εάν τα πηγαδάκια παραμένουν μοβ αφού ακολουθήσετε αυτήν τη διαδικασία, επαναλάβετε την εξέταση των δειγμάτων.

#### Σημειώσεις:

- Μετά την ανακίνηση, τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt πρέπει να αποκτήσουν ροζ χρώμα αντί κίτρινου.
  - Κατά την τοποθέτηση του μικροπλακιδίου υβριδισμού στο Microplate Heater I, διασφαλίστε ότι δεν προκαλείτε πιτσίλισμα.
7. Πραγματοποιήστε επώαση του μικροπλακιδίου υβριδισμού σε ένα Microplate Heater I που έχει προθερμανθεί και σταθεροποιηθεί στους  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  για  $60 \pm 5$  λεπτά.

### Μέθοδος υβριδισμού με χρήση μικροσωληναρίων και υδατόλουτρου

#### Σημειώσεις:

- Η επεξεργασία των δειγμάτων που συλλέγονται με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA σε STM με χρήση της μεθόδου MST Vortexer 2 για την ανάμειξη και της μεθόδου υδατόλουτρου για τον υβριδισμό **δεν έχει επικυρωθεί**. Τα δείγματα που συλλέγονται με τη συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA σε STM και υποβάλλονται σε επεξεργασία με χρήση της μεθόδου MST Vortexer 2 μπορούν να υβριδιστούν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Microplate Heater I **μόνο**.
- Εάν το αποδιαταγμένο δείγμα έχει φυλαχθεί στους  $-20^\circ\text{C}$ , αφήστε το δείγμα να αποψυχθεί στους  $20-25^\circ\text{C}$ , και στροβιλίστε πλήρως το δείγμα πριν την επεξεργασία με υβριδισμό.

1. Επιστημάνετε και τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό καθαρών μικροσωληναρίων υβριδισμού μέσα στο στατώ μικροσωληναρίων.
2. Μετά την επώαση, αφαιρέστε τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα από το υδατόλουτρο. Στροβιλίστε κάθε σωληνάριο ξεχωριστά για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα αμέσως πριν την αφαίρεση των υποπολλαπλασίων.
3. Μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου ποιότητας ή δείγμα στον **πυθμένα** ενός κενού μικροσωληναρίου υβριδισμού ακολουθώντας τη διάταξη πλακιδίου που δημιουργήθηκε σύμφωνα με την ενότητα Διάταξη. Αποφύγετε την επαφή με τα τοιχώματα των μικροσωληναρίων και περιορίστε το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα. Σε κάθε μεταφορά να χρησιμοποιείτε ένα καθαρό και μεγάλο μεγέθους ρύγχος πιπέτας προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου ποιότητας ή των δειγμάτων. Δεν είναι απαραίτητο να αφαιρέσετε το δειγματολήπτη από το σωληνάριο μεταφοράς δείγματος. Δείγματα τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να σφραγιστούν με βιδωτά πώματα για σωληνάρια συλλογής δειγμάτων και να αποθηκευτούν μαζί με τους δειγματολήπτες που παραμένουν στα σωληνάρια.

**Σημείωση:** Είναι πιθανό να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα εάν τα υποπολλαπλάσια των δειγμάτων δεν μεταφερθούν προσεκτικά. Κατά τη μεταφορά των δειγμάτων, μην αγγίζετε το



εσωτερικό του σωληναρίου με το ρύγχος της πιπέτας κατά την αναρρόφηση του υποπολλαπλασίου των 75 μl.

4. Αφού μεταφέρετε το τελευταίο δείγμα, **επωάστε τα μικροσωληνάρια υβριδισμού για 10 λεπτά στους 20-25°C**.
5. Υποπολλαπλασιάστε το παρασκευασμένο και καλά στροβιλισμένο μείγμα ανιχνευτών σε ένα αναλώσιμο δοχείο αποθήκευσης αντιδραστηρίων. Μεταφέρετε προσεκτικά 25 μl του μείγματος ανιχνευτών σε κάθε μικροσωληνάριο που περιέχει βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας και δείγματα, χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα και νέα ρύγχη για κάθε σειρά. Διανείμετε τον όγκο του ανιχνευτή σε κάθε μικροσωληνάριο υβριδισμού, αποφεύγοντας τον ανάδρομο παφλασμό. Αποφύγετε την επαφή με τα τοιχώματα των σωληναρίων. Επιθεωρήστε το στατώ από το κάτω μέρος για να διασφαλίσετε ότι όλα τα σωληνάρια έχουν λάβει την κατάλληλη ποσότητα μείγματος ανιχνευτών.
6. Καλύψτε τα μικροσωληνάρια με ένα κάλυμμα μικροπλακιδίου . Στο πάνω μέρος του στατώ τοποθετήστε το κάλυμμα του στατώ. Ανακινήστε το στατώ των μικροσωληναρίων με το Rotary Shaker I στη θέση  $1.100 \pm 100$  rpm για  $3 \pm 2$  λεπτά. *Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου ποιότητας και τα δείγματα πρέπει να αποκτούν κίτρινο χρώμα μετά την ανάδευση.* Σωληνάρια τα οποία παραμένουν μοβ πιθανόν να μην έχουν δεχτεί την κατάλληλη ποσότητα μείγματος ανιχνευτών. Προσθέστε επιπλέον 25 μl του μείγματος ανιχνευτών στα δείγματα που παραμένουν μοβ και ανακινήστε ξανά. Εάν τα σωληνάρια εξακολουθούν να έχουν μοβ χρώμα μετά τη διαδικασία αυτή, τα δείγματα πρέπει να εξεταστούν εκ νέου.

**Σημείωση:** Μετά την ανακίνηση, τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt πρέπει να αποκτήσουν ροζ χρώμα αντί κίτρινου.

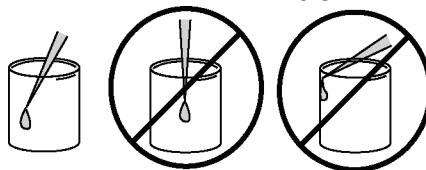
7. Επωάστε σε υδατόλουτρο  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  για  $60 \pm 5$  λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού στο υδατόλουτρο επαρκεί για να καλύψει ολόκληρο τον όγκο του μείγματος υβριδισμού. Το στατώ μικροσωληναρίων θα επιπλέει στο υδατόλουτρο.

**Σημείωση:** Δημιουργήστε ένα αρχείο διάταξης πλακιδίων χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* εάν αυτό δεν ολοκληρώθηκε νωρίτερα.

## ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΔΙΟΥ

1. Αφαιρέστε όλα τα περιττά πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης από το πλαίσιο του πλακιδίου. Επανατοποθετήστε τα αχρησιμοποίητα πηγαδάκια μικροπλακιδίων στο αρχικό σακουλάκι και ξανασφραγίστε το. Με ένα μαρκαδόρο αριθμήστε κάθε στήλη 1, 2, 3. . . . Επικολλήστε την κατάλληλη ετικέτα στο μικροπλακίδιο. Τα δείγματα θα προστεθούν στα πηγαδάκια σύμφωνα με το παράδειγμα στην ενότητα Διάταξη.
2. Αφαιρέστε προσεκτικά το μικροπλακίδιο υβριδισμού που περιέχει βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα από το Microplate Heater I. Αφαιρέστε αμέσως το καπάκι του πλακιδίου και τοποθετήστε το επάνω σε καθαρή επιφάνεια. Διαφορετικά, αφαιρέστε το στατώ των μικροσωληναρίων από το υδατόλουτρο. Αφαιρέστε αμέσως το καπάκι του στατώ και τραβήξτε αργά το κάλυμμα μικροπλακιδίου προς τα επάνω, απομακρύνοντάς το από το στατώ.
3. Μεταφέρετε το συνολικό περιεχόμενο (κατά προσέγγιση 100 μl) των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου ποιότητας και των δειγμάτων από τα πηγαδάκια ή τα μικροσωληνάρια του μικροπλακιδίου υβριδισμού στον πυθμένα του αντίστοιχου πηγαδιού μικροπλακιδίου δέσμευσης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα. Χρησιμοποιήστε νέα ρύγχη πιπέτας στην 8-κάναλη πιπέτα για κάθε στήλη που μεταφέρεται και αφήστε κάθε ρύγχος πιπέτας να στραγγίσει καλά 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 (ανατρέξτε στο *Διάγραμμα 1*).

### ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: ΣΩΣΤΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΕ ΠΙΠΕΤΑ



ΣΩΣΤΟ

Μην τοποθετείτε την πιπέτα σε κατακόρυφη θέση. Αποφύγετε τον ανάδρομο παφλασμό.

Μην αφήνετε το άκρο να αγγίζει την πλευρά του πηγαδιού.

4. Καλύψτε το μικροπλακίδιο δέσμευσης με το καπάκι ή κάλυμμα του μικροπλακιδίου και ανακινήστε στο Rotary Shaker I στη θέση  $1.100 \pm 100$  rpm, σε θερμοκρασία  $20-25^{\circ}\text{C}$  και για  $60 \pm 5$  λεπτά.
5. Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και ελέγξτε τα δοχεία ξεπλύματος και αποβλήτων του Automated Plate Washer κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης. Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων.
6. Όταν το βήμα δέσμευσης ολοκληρωθεί, αφαιρέστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης από το Rotary Shaker I και αφαιρέστε προσεκτικά το καπάκι μικροπλακιδίου ή το σφραγιστικό πλακιδίου. Αφαιρέστε το υγρό που περιέχεται στα πηγαδάκια, απορρίπτοντάς το σε νιπτήρα· αναστρέψτε πλήρως το πλακίδιο επάνω από το νιπτήρα και ανακινήστε δυνατά με κίνηση προς τα κάτω, προσέχοντας ώστε να μη δημιουργηθεί ανάδρομος παφλασμός από μετάγγιση πολύ κοντά στη βάση του νιπτήρα. **Μην αναστρέψετε ξανά το πλακίδιο**· 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 και ότι το επάνω μέρος του πλακιδίου είναι στεγνό.

### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ

#### Σημειώσεις:

- Εκτελέστε προσθήκες στο πλακίδιο με κατεύθυνση από αριστερά προς τα δεξιά χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα.
  - Συνιστάται η εφαρμογή της τεχνικής ανάδρομης αναρρόφησης για καλύτερη συνοχή στη διανομή του αντιδραστηρίου. Με την τεχνική αυτή, τα ρύγχη της πιπέτας αρχικά υπερπληρούνται με χρήση του δεύτερου στοπ ελέγχου αναρρόφησης/διανομής της πιπέτας (έμβολο). Βλ. παρακάτω διαδικασία. Καθαρίστε τα ρύγχη στο αναλώσιμο δοχείο αποθήκευσης αντιδραστηρίων ώστε να αφαιρέσετε την περιττή ποσότητα αντιδραστηρίου πριν τη διανομή του στο πλακίδιο.
  - Εάν θέλετε, μπορείτε να σταθεροποιήσετε την πιπέτα τοποθετώντας το κέντρο του ρύγχους της πιπέτας στο επάνω άκρο των πηγαδιών των μικροπλακιδίων. Προσέχετε ώστε να μην αγγίξετε τα τοιχώματα των πηγαδιών μικροπλακιδίων διότι πιθανόν να προκύψει επιμόλυνση των δειγμάτων. Ανατρέξτε στο Διάγραμμα 1 παραπάνω.
1. Διανείμετε υποπολλαπλάσιο του κατάλληλου όγκου του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 σε ένα αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίου (ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων* για οδηγίες). Μεταφέρετε προσεκτικά 75 μl αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμευσης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα και την τεχνική ανάδρομης αναρρόφησης.

#### Διαδικασία ανάδρομης αναρρόφησης:

- α) Προσαρτήστε ρύγχη σε μια 8-κάναλη πιπέτα· βεβαιωθείτε ότι όλα τα ρύγχη είναι τοποθετημένα σταθερά.
- β) Ωθήστε το έμβολο της πιπέτας πέρα από το πρώτο στοπ στο δεύτερο στοπ.
- γ) Εμβυθίστε τα ρύγχη μέσα στο διάλυμα αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1.
- δ) Απελευθερώστε το έμβολο αργά και αφήστε το διάλυμα να γεμίσει τα ρύγχη.

- ε) Διανείμετε διάλυμα στα πηγαδάκια μικροπλακιδίου (75 μl) πιέζοντας το έμβολο προς το πρώτο στοπ. Μην απελευθερώσετε το έμβολο μέχρι τα ρύγχη της πιπέτας να έχουν εμβυθιστεί στο αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.
  - φ) Γεμίστε ξανά τα ρύγχη και επαναλάβετε μέχρι να γεμίσουν όλα τα πηγαδάκια. Γεμίστε τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου από τα αριστερά προς τα δεξιά. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα πηγαδάκια έχουν γεμίσει παρατηρώντας την ένταση του ροζ χρώματος. Σε όλα τα πηγαδάκια θα πρέπει να παρατηρείται παρόμοια ένταση χρώματος.
2. Καλύψτε τα πλακίδια με καπάκι πλακιδίων ή καθαρή μεμβράνη Parafilm (ή αντίστοιχη) και επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 30-45 λεπτά.

## ΕΚΠΛΥΣΗ

Πλύνετε το μικροπλακίδιο δέσμησης εφαρμόζοντας μία από τις δύο παρακάτω μεθόδους.

### Μέθοδος Automated Plate Washer

**Σημείωση:** Διατηρείτε πάντα το Automated Plate Washer **ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΟ**. Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο ξεπλύματος είναι γεμάτο και το δοχείο συλλογής αποβλήτων είναι άδειο. Το Automated Plate Washer θα πραγματοποιεί τακτικό μηχανικό ξέπλυμα για τον καθαρισμό του συστήματος. Ανατρέξτε στο *Automated Plate Washer User Manual* για περαιτέρω οδηγίες όπως απαιτείται.

### ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΧΡΗΣΗ:

- Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο έκπλυσης είναι γεμάτο τουλάχιστον μέχρι τη σήμανση 1 L με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Εάν όχι, παρασκευάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων.
- 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 του ίδιου πριν από κάθε έκπλυση και θα ξεπλένεται μετά από κάθε έκπλυση.

1. Αφαιρέστε το καπάκι πλακιδίου και τοποθετήστε το πλακίδιο στην πλατφόρμα του Automated Plate Washer.
2. Βεβαιωθείτε ότι η ισχύς είναι ενεργοποιημένη, και ότι στην οθόνη εμφανίζεται η ένδειξη «DIGENE WASH READY» (έκπλυση Digene έτοιμη) ή «P1».

**Σημείωση:** Εάν χρησιμοποιείται μόνο ένα τμήμα της ταινίας των πηγαδιών δέσμησης, πρέπει να τοποθετηθούν κενά πηγαδάκια μικροπλακιδίων στο πλακίδιο δέσμησης ώστε να συμπληρωθεί η στήλη πριν την έκπλυση.

3. Επιλέξτε τον αριθμό των ταινιών προς έκπλυση πατώντας το πλήκτρο «ROWS» (σειρές) και κατόπιν «+» ή «-» για να προσαρμόσετε τον αριθμό. Πατήστε το πλήκτρο «ROWS» για επιστροφή στο «DIGENE WASH READY» ή «P1».
4. Πατήστε «START/STOP» (έναρξη/διακοπή) για να ξεκινήσει η λειτουργία.
5. Η συσκευή θα πραγματοποιήσει έξι 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 πλακίδιο. Όταν το Automated Plate Washer ολοκληρώσει την έκπλυση, στην οθόνη θα εμφανιστεί η ένδειξη «DIGENE WASH READY» ή «P1».
6. Αφαιρέστε το μικροπλακίδιο από τη συσκευή μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος. Το πλακίδιο πρέπει να εμφανιστεί λευκό χωρίς να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων.

### Μέθοδος χειροκίνητης έκπλυσης

1. Αφαιρέστε το αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 από τα πηγαδάκια τοποθετώντας καθαρά μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι επάνω στο πλακίδιο και αναστρέφοντάς το προσεκτικά. Πριν αναστρέψετε, βεβαιωθείτε ότι το χαρτί έρχεται σε επαφή με ολόκληρη την επιφάνεια του πλακιδίου. Αφήστε το πλακίδιο να στραγγίξει για 1-2 λεπτά.

Στυπώστε καλά σε καθαρά μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή σε αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι. Απορρίψτε προσεκτικά τα χρησιμοποιημένα χαρτομάντιλα προκειμένου να αποφύγετε τη μόλυνση με αλκαλική φωσφατάση σε μετέπειτα στάδια.

- Χρησιμοποιώντας τη συσκευή έκπλυσης, πλύνετε το πλακίδιο 6 φορές με το χέρι. Κάθε πηγαδάκι πρέπει να ξεπλένεται προκαλώντας εκχείλιση ώστε να απομακρυνθεί το αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 από τα χείλη των πηγαδιών. Η διαδικασία έκπλυσης ξεκινά με το πηγαδάκι A1 και συνεχίζεται με ελικοειδή κατεύθυνση προς τα δεξιά και προς τα κάτω. Αφού έχουν γεμίσει όλα τα πηγαδάκια, αδειάστε το υγρό στο νιπτήρα με δυνατή κίνηση προς τα κάτω. Η δεύτερη έκπλυση ξεκινά από το πηγαδάκι H12 και συνεχίζεται με ελικοειδή κατεύθυνση προς τα αριστερά και προς τα επάνω. Η ακολουθία των 2 πλύσεων επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές ώστε να καταλήξετε στις 6 συνολικά πλύσεις ανά πηγαδάκι.
- Μετά την έκπλυση στυπώστε το πλακίδιο αναστρέφοντάς το σε καθαρά μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή σε αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι και χτυπώντας το σταθερά 3-4 φορές. Αντικαταστήστε τα χαρτομάντιλα και στυπώστε ξανά. Αφήστε το πλακίδιο να στραγγίξει σε ανάστροφη θέση για 5 λεπτά. Στυπώστε το πλακίδιο άλλη μία φορά.
- Το πλακίδιο πρέπει να εμφανίζεται λευκό και να μην υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων.

## ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

### ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

- Χρησιμοποιήστε ένα νέο ζευγάρι γάντια για το χειρισμό του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2.
  - Διανείμετε **μόνο** την κλασματική ποσότητα του αντιδραστήριου που απαιτείται για την εκτέλεση της δοκιμασίας στο αναλώσιμο δοχείο αντιδραστήριου για να αποφύγετε τη μόλυνση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2. Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία αντιδραστηρίων. **Μην επιστρέψετε το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 στην αρχική φιάλη. Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο υλικό μετά τη χρήση.**
  - Η προσθήκη του αντιδραστήριου 2 πρέπει να γίνεται χωρίς διακοπή. Ο χρόνος επώασης όλων των πηγαδιών πρέπει να συμπίπτει όσο το δυνατόν περισσότερο.
  - Φροντίστε να μην αγγίζετε τις πλευρές του πηγαδιού μικροπλακιδίου δέσμευσης και να μην πιπιλίζετε αντιδραστήριο πίσω στα ρύγχη, καθώς θα μπορούσε να συμβεί διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων (ανατρέξτε στο Διάγραμμα 1).
- Μεταφέρετε προσεκτικά 75 μl αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμευσης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα κατά τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Όλα τα πηγαδάκια μικροπλακιδίων πρέπει να αποκτήσουν ένα κίτρινο χρώμα. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα πηγαδάκια έχουν γεμίσει παρατηρώντας την ένταση του χρώματος. Σε όλα τα πηγαδάκια θα πρέπει να παρατηρείται παρόμοια ένταση χρώματος.
  - Καλύψτε τα μικροπλακίδια με ένα καπάκι πλακιδίων ή με μεμβράνη Parafilm (ή αντίστοιχη), και επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.
  - Διαβάστε το μικροπλακίδιο στο όργανο DML μετά από 15 λεπτά επώασης (και όχι αργότερα από 30 λεπτά επώασης).
  - Το ειδικό για τη δοκιμασία πρωτόκολλο λογισμικού θα επιτρέψει την καταχώρηση των συναφών πληροφοριών της δοκιμασίας απευθείας στο λογισμικό.
  - Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο γεμάτο μικροπλακίδιο, αφαιρέστε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίων που χρησιμοποιήθηκαν από τη βάση μικροπλακιδίων, ξεπλύνετε καλά τη βάση με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, στεγνώστε και φυλάξτε την για επόμενη δοκιμασία.

## ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Επαλήθευση της βαθμονόμησης της δοκιμασίας εκτελείται για να διασφαλιστεί ότι τα αντιδραστήρια και τα παρεχόμενα υλικά βαθμονομητών και ορών ελέγχου ποιότητας λειτουργούν σωστά, επιτρέποντας τον ακριβή προσδιορισμό της τιμής διακοπής της δοκιμασίας. Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA απαιτεί βαθμονόμηση με κάθε δοκιμασία, συνεπώς, είναι απαραίτητο να επαληθεύεται κάθε δοκιμασία χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα κριτήρια. Αυτή η διαδικασία επαλήθευσης δεν υποκαθιστά τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας. Τα πρωτόκολλα δοκιμασίας του λογισμικού ανάλυσης δοκιμασίας *digene* επαληθεύουν αυτόματα τα παρακάτω κριτήρια.

1. **Αρνητικός βαθμονομητής**  
Ο αρνητικός βαθμονομητής πρέπει να εξετάζεται εις τριπλούν σε κάθε προσδιορισμό δοκιμασίας. Η μέση τιμή του αρνητικού βαθμονομητή πρέπει να είναι  $\geq 10$  και  $\leq 250$  RLU's προκειμένου να συνεχιστεί η διαδικασία. Τα αποτελέσματα του αρνητικού βαθμονομητή πρέπει να εμφανίζουν συντελεστή απόκλισης (%CV)  $\leq 25\%$ . Εάν ο συντελεστής απόκλισης (%CV) είναι  $>25$ , απορρίψτε την τιμή με μια τιμή RLU που να αποκλίνει κατά το μέγιστο από τη μέση τιμή και υπολογίστε εκ νέου τη μέση τιμή χρησιμοποιώντας τις δύο τιμές που υπολείπονται. Εάν η διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής και καθεμίας από τις δύο τιμές είναι  $\leq 25\%$ , προχωρήστε στο βήμα 2. Διαφορετικά, η επαλήθευση της βαθμονόμησης 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.
2. **Βαθμονομητές**  
Ο(οι) βαθμονομητής(ές) πρέπει να εξετάζεται(ονται) εις τριπλούν σε κάθε δοκιμασία. Για CPC, και οι δύο βαθμονομητές πρέπει να εξετάζονται εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα του βαθμονομητή πρέπει να εμφανίζουν συντελεστή απόκλισης (%CV)  $\leq 15\%$ . Για CPC, ο συντελεστής %CV των συνδυασμένων LRC, HRC και LRC-HRC πρέπει να εμφανίζει μια τιμή %CV  $\leq 15\%$ . Εάν ο συντελεστής %CV είναι  $>15$ , απορρίψτε την τιμή του βαθμονομητή με μια τιμή RLU που να αποκλίνει κατά το μέγιστο από τη μέση τιμή και υπολογίστε εκ νέου τη μέση τιμή χρησιμοποιώντας τις τιμές βαθμονομητών που απομένουν. Μόνο 1 παράγωγο LRC και 1 παράγωγο HRC μπορούν να διαγραφούν. Εάν η τιμή %CV των βαθμονομητών είναι  $\leq 15\%$ , προχωρήστε στο βήμα 3. Διαφορετικά, η επαλήθευση της βαθμονόμησης 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.

Η επαλήθευση της βαθμονόμησης της δοκιμασίας που περιγράφεται παραπάνω για τους βαθμονομητές εκτελείται αυτόματα από το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* και εκτυπώνεται στην αναφορά ανάλυσης δεδομένων. **Τα πρωτόκολλα ανάλυσης δοκιμασίας *digene* για HPV επαληθεύουν αυτόματα ότι η τιμή %CV των βαθμονομητών HPV χαμηλού κινδύνου και υψηλού κινδύνου είναι  $\leq 15\%$ .** Ωστόσο, οι εκδόσεις 1.0.2 και 1.0.3 του λογισμικού ανάλυσης δοκιμασίας *digene* ΔEN ακυρώνουν τη δοκιμασία εκτός εάν η τιμή %CV είναι  $>25\%$  για τους βαθμονομητές. Συνεπώς, ο χρήστης πρέπει να επαληθεύσει χειροκίνητα ότι η τιμή %CV που υπολογίζεται από το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας *digene* είναι  $\leq 15\%$  και να συνεχίσει όπως υποδεικνύεται για την Κατάσταση 1 στον πίνακα παρακάτω. Εάν ο συντελεστής απόκλισης των αναπαραγόμενων βαθμονομητών κυμαίνεται μεταξύ 15 και 25, ανατρέξτε στις οδηγίες της Περίπτωσης 2 ή 3 στον παρακάτω πίνακα και προβείτε στην αντίστοιχη «Ενέργεια χρήστη».

Περίπτωση	Αναφορά %CV για τα παράγωγα των LRC ή/και HRC	Ενέργεια που εκτελείται από το λογισμικό ανάλυσης δοκιμασίας <i>digene</i>	Ενέργεια χρήστη
1	≤ 15%	Αναφορά δοκιμασίας ως «έγκυρης»	Τα αποτελέσματα μπορούν να ανακοινωθούν· δεν απαιτείται καμία άλλη ενέργεια.
2	Μεταξύ 15% και 25%	Καμία αφαίρεση τιμών εκτός των ορίων και αναφορά δοκιμασίας ως «έγκυρης»	Αφαιρέστε την τιμή RLU του βαθμονομητή με την μεγαλύτερη απόκλιση από τη μέση τιμή. Υπολογίστε εκ νέου τον συντελεστή απόκλισης του βαθμονομητή με τις τιμές που υπολείπονται. Εάν ο συντελεστής απόκλισης των υπολειπόμενων τιμών RLU είναι > 15%, η δοκιμασία είναι άκυρη. Το αποτέλεσμα δεν πρέπει να ανακοινωθεί. Εάν ο συντελεστής %CV των υπόλοιπων τιμών RLU είναι ≤ 15%, υπολογίστε εκ νέου την τιμή διακοπής της δοκιμασίας, και στη συνέχεια υπολογίστε εκ νέου την αναλογία RLU/τιμή διακοπής κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας αυτήν την τιμή διακοπής. Αυτές οι νέες τιμές μπορούν να ανακοινωθούν.
3	Μεταξύ 15% και 25%	Μία αφαιρούμενη τιμή εκτός ορίων για κάθε βαθμονομητή και αναφορά δοκιμασίας ως «έγκυρης»	Η δοκιμασία είναι άκυρη. Τα αποτελέσματα δεν πρέπει να ανακοινωθούν. Η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί.
4	> 25%	Μία αφαιρούμενη τιμή εκτός ορίων και αναφορά δοκιμασίας ως «άκυρης»	Η δοκιμασία είναι άκυρη. Τα αποτελέσματα δεν πρέπει να ανακοινωθούν. Η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί.

Για να υπολογίσει ο χρήστης μόνος του το συντελεστή απόκλισης (%CV) όπως απαιτείται στην περίπτωση 2 παραπάνω, πρέπει να διαιρέσει τη σταθερή απόκλιση (STDEV) (n-1) των υπολειπόμενων αναπαραγόμενων τιμών RLU με τη μέση τιμή των υπολειπόμενων αναπαραγόμενων τιμών RLU (LRC ή HRC ή και τα δύο) και να πολλαπλασιάσει το αποτέλεσμα επί 100.

Για τον υπολογισμό του %CV με χρήση του Microsoft® Excel® (παρέχεται με την προηγούμενη έκδοση του λογισμικού ανάλυσης δοκιμασίας *digene*), ο χρήστης μπορεί να υπολογίσει τη σταθερή απόκλιση των παραγώγων του βαθμονομητή χρησιμοποιώντας τον τύπο *STDEV* και να προσδιορίσει τη μέση τιμή RLU του βαθμονομητή χρησιμοποιώντας τον τύπο *AVERAGE*. Μετά τον υπολογισμό των δύο αυτών τιμών, διαιρείτε την τιμή *STDEV* δια της τιμής *AVERAGE* και πολλαπλασιάζετε το αποτέλεσμα επί 100 ώστε να καταλήξετε στο συντελεστή απόκλισης (%CV).

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

**Εάν έχετε απορίες σχετικά με τον υπολογισμό των συντελεστών απόκλισης %CV, τον εκ νέου υπολογισμό της τιμής διακοπής της δοκιμασίας ή τον εκ νέου υπολογισμό της αναλογίας RLU/τιμή διακοπής των δειγμάτων, παρακαλούμε επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της QIAGEN.**

Για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγιμότητας του βαθμονομητή και την εκτίμηση της συχνότητας στην οποία μπορεί να απαιτούνται χειροκίνητοι εκ νέου υπολογισμοί, συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα από τρεις κλινικές αξιολογήσεις περιλαμβάνοντας 152 εκτελέσεις δοκιμασίας που πραγματοποιήθηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μέσος συντελεστής απόκλισης (%CV) σε αυτούς τους 152 κύκλους δοκιμασιών ήταν 8,1. Δεδομένων των παραγώγων του βαθμονομητή ανά κύκλο δοκιμασίας, μια αναπαραγωγιμότητα του βαθμονομητή της τάξης του >15%CV παρατηρήθηκε μόνο σε 17 από τους 152 κύκλους (δηλ. σε ποσοστό 11,2%), εκ των οποίων οι 10 είχαν συντελεστή απόκλισης (%CV) μεταξύ 15 και 25 (Περίπτωση 2). Από τους 17 κύκλους δοκιμασιών με συντελεστή απόκλισης %CV >15, αφαιρέθηκε μόνο μία εκτός ορίων τιμή και έγινε εκ νέου υπολογισμός του συντελεστή απόκλισης (%CV). Σύμφωνα με την Ενέργεια χρήστη στην Περίπτωση 2, μόνο ένας συντελεστής απόκλισης του κύκλου δοκιμασίας παρέμεινε >15, ακυρώνοντας έτσι τη δοκιμασία. Οι συντελεστές απόκλισης (%CV) των υπολειπόμενων 151 κύκλων δοκιμασιών υπολογίστηκαν σε μια μέση τιμή 6,0.

3. Τα αποτελέσματα της μέσης τιμής του βαθμονομητή (LRC ή HRC) και της μέσης τιμής του αρνητικού βαθμονομητή (NC) χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της αναλογίας LRC/NC ή HRC/NC για κάθε ανιχνευτή. Προηγούμενες εκδόσεις (1.0.2 και 1.0.3) των πρωτοκόλλων του λογισμικού ανάλυσης δοκιμασίας *digene* δεν υπολογίζουν σωστά τα αποδεκτά εύρη. Οι αναλογίες αυτές πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια προκειμένου να επαληθευτεί η δοκιμασία του βαθμονομητή ώστε να μπορούν να ερμηνευτούν τα αποτελέσματα των δειγμάτων:

<b>ΜΕΘΟΔΟΣ CPC</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΥΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ</b>
<b>Επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας</b> <b>Αποδεκτά εύρη</b>	<b>Επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας</b> <b>Αποδεκτά εύρη</b>
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (πλευρά LR)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (πλευρά HR)
$2,0 \leq (LRC \text{ και } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Υπολογίστε τις κατάλληλες αναλογίες  $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$  ή  $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$  για καθένα από τα σετ ανιχνευτών. Εάν οι αναλογίες είναι  $\geq 2,0$  και  $\leq 15$ , προχωρήστε στο επόμενο βήμα. Εάν οποιοσδήποτε αναλογίες είναι  $< 2,0$  ή  $> 15$ , **η δοκιμασία είναι άκυρη για το συγκεκριμένο ανιχνευτή και πρέπει να επαναληφθεί**. Επαναλάβετε όλα τα δείγματα ασθενών του συγκεκριμένου κύκλου δοκιμασίας.  
**Σημείωση:** Αποδεκτά εύρη τιμών για τον αρνητικό βαθμονομητή και τους θετικούς βαθμονομητές έχουν καθοριστεί μόνο για ένα όργανο DML.

## ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Από τη στιγμή που μια δοκιμασία αποβεί έγκυρη σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια, οι τιμές διακοπής για τον προσδιορισμό των θετικών δειγμάτων έχουν ως εξής:

1) Μέθοδος μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών:  $\frac{(\text{παράγωγα LRC} + \text{παράγωγα HRC})}{\# \text{ των παραγώγων}}$

2) Μέθοδος δύο ανιχνευτών: Τιμή διακοπής ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου =  $LRC\bar{x}$   
Τιμή διακοπής ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου =  $HRC\bar{x}$

Παράδειγμα υπολογισμών τιμής διακοπής					
για:		Ανιχνευτής HPV χαμηλού ή υψηλού κινδύνου Μέθοδος δύο ανιχνευτών	Ανιχνευτής HPV χαμηλού κινδύνου Μέθοδος CPC	Ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου Μέθοδος CPC	Συνδυασμένος ανιχνευτής HPV Μέθοδος CPC
	Τιμές NC RLU	Τιμές RLU LRC ή HRC	Τιμές RLU LRC	Τιμές RLU HRC	Τιμές RLU LRC και HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
<b>Μέση Τιμή RLU</b>	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$LRC\bar{x}/NC\bar{x}$	Δεν εφαρμόζεται	3,31	3,54	3,00	3,32

Η μέση τιμή RLU του θετικού βαθμονομητή καθορίζει την τιμή διακοπής της δοκιμασίας. Συνεπώς, η θετική τιμή διακοπής είναι  $(LRC\bar{x}) = 318$ .

\* Η μέση %CV και των 6 επαναλήψεων ήταν 16,8. Μια επανάληψη με τιμή 235 διαγράφηκε ως κείμενη εκτός περιοχής εμπιστοσύνης. Η % CV των υπολειπόμενων επαναλήψεων ήταν 13,0 με μέση τιμή 318,8. Η αρχική %CV του HRC ήταν 11,5.

Όλες οι τιμές RLU των δειγμάτων πρέπει να μετατρέπονται σε μια αναλογία προς την κατάλληλη τιμή διακοπής. Για παράδειγμα, όλες οι δοκιμασίες οι οποίες εξετάζονται με ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου θα πρέπει να εκφράζονται ως RLU/τιμή διακοπής χαμηλού κινδύνου του δείγματος. Το ίδιο μπορεί να γίνει και με δείγματα τα οποία εξετάζονται με ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου ή με τον ανιχνευτή CPC.

**Σημειώσεις:** Οι τιμές RLU/CO και τα θετικά/αρνητικά αποτελέσματα για όλα τα δείγματα αναφέρονται στην *Αναφορά ανάλυσης δεδομένων* του οργάνου DML.

Για την εφαρμογή Rapid Capture System, το πρωτόκολλο λογισμικού RCS HPV έχει προγραμματιστεί κατά τρόπο ώστε να εφαρμόζεται ένας συντελεστής προσαρμογής βαθμονόμησης (Calibration Adjustment Factor, CAF) της τάξης του 0,8 στη μέση τιμή RLU των έγκυρων παραγώγων θετικού βαθμονομητή. Αυτός ο συντελεστής CAF είναι αναγκαίος προκειμένου τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας να παραμένουν ισοδύναμα με τη διαδικασία δοκιμασίας με το χέρι. Η τροποποίηση αυτή ισχύει μόνο για τις δοκιμασίες που πραγματοποιούνται με χρήση της εφαρμογής Rapid Capture System. Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να επιλέγεται το σωστό πρωτόκολλο λογισμικού το οποίο θα χρησιμοποιείται με μια συγκεκριμένη μέθοδο εξέτασης προκειμένου να λαμβάνονται ακριβή αποτελέσματα. Όλες οι τιμές RLU των δειγμάτων πρέπει να



μετατρέπονται σε έναν λόγο προς την αντίστοιχη τιμή διακοπής (CO). Για παράδειγμα, όλες οι δοκιμασίες πρέπει να εκφράζονται ως η αναλογία τιμών RLU/CO του δείγματος.

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Δείγματα ελέγχου ποιότητας παρέχονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Συμβουλευθείτε το κατάλληλο εγχειρίδιο χρήστη για οδηγίες σχετικά με το πώς να εισάγετε τους αριθμούς παρτίδας και τις ημερομηνίες λήξης των ορών ελέγχου ποιότητας. Αυτοί οι έλεγχοι ποιότητας πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε κύκλο δοκιμασίας και η τιμή RLU/CO κάθε ορού ελέγχου ποιότητας πρέπει να βρίσκεται εντός των παρακάτω επιτρεπτών ορίων ώστε η δοκιμασία να θεωρηθεί έγκυρη. **Εάν οι έλεγχοι ποιότητας δεν εμπίπτουν στα όρια αυτά, η δοκιμασία είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.** Κατά συνέπεια, δεν πρέπει να ανακοινωθεί κανένα αποτέλεσμα ενός άκυρου κύκλου δοκιμασίας.

Έλεγχος ποιότητας	Τύπος HPV	Αναμενόμενο αποτέλεσμα (RLU/τιμή διακοπής) Ανιχνευτής HPV χαμηλού κινδύνου			
		Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Μέση τιμή	%CV
QC1-LR	Χαμηλού κινδύνου (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Υψηλού κινδύνου (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Έλεγχος ποιότητας	Τύπος HPV	Αναμενόμενο αποτέλεσμα (RLU/τιμή διακοπής) Ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου			
		Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Μέση τιμή	%CV
QC1-LR	Χαμηλού κινδύνου (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Υψηλού κινδύνου (HPV 16)	2	8	5,0	25

Έλεγχος ποιότητας	Τύπος HPV	Αναμενόμενο αποτέλεσμα (RLU/τιμή διακοπής) Ελάχιστη τιμή			
		Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Μέση τιμή	%CV
QC1-LR	Χαμηλού κινδύνου (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Υψηλού κινδύνου (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Τα υλικά για τον έλεγχο ποιότητας τα οποία παρέχονται με το κιτ είναι κλωνοποιημένοι στόχοι HPV DNA και δεν προέρχονται από μη μεταλλαγμένο τύπο HPV. Αυτός είναι ο ίδιος τύπος υλικού που χρησιμοποιείται για τους βαθμονομητές που παρέχονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA.
2. Αυτό το υλικό ελέγχου ποιότητας δεν χρησιμεύει ως κατάλληλο υλικό ελέγχου ποιότητας για την επεξεργασία του διαλύματος PreservCyt ή του υγρού διατήρησης SurePath.
3. Οι οροί ελέγχου ποιότητας που παρέχονται με το συγκεκριμένο κιτ δοκιμασίας πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας. Πρόσθετοι οροί ελέγχου ποιότητας

μπορούν να εξεταστούν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ή απαιτήσεις των τοπικών ή/και εθνικών κανονισμών ή πιστοποιημένων οργανισμών.

## ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

**Σημείωση:** Η τιμή διακοπής της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA της τάξης του 1 pg/ml ισοδυναμεί με 100.000 αντίγραφα HPV/ml ή 5.000 αντίγραφα HPV ανά δοκιμασία.

1. Δείγματα STM με αναλογίες RLU/τιμή διακοπής  $\geq 1,0$  **με ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου μόνο** θεωρούνται «θετικά» για 1 ή περισσότερους τύπους HPV 6, 11, 42, 43 ή 44.
2. Δείγματα STM με αναλογίες RLU/τιμή διακοπής  $\geq 1,0$  **με ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου μόνο** θεωρούνται «θετικά» για 1 ή περισσότερους τύπους HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68.
3. Κατά την εξέταση δειγμάτων PreservCyt, εάν η αναλογία RLU/CO ενός δείγματος είναι  $\geq 1,0$  και  $< 2,5$ , η QIAGEN συνιστά την επανάληψη της εξέτασης του δείγματος. Εάν το αρχικό αποτέλεσμα της επαναληπτικής εξέτασης είναι θετικό ( $\geq 1,0$  RLU/CO), το δείγμα μπορεί να αναφερθεί ως θετικό και δεν χρειάζεται να ολοκληρωθεί περαιτέρω επαναληπτική εξέταση. Ωστόσο, εάν το πρώτο αποτέλεσμα της επαναληπτικής εξέτασης είναι αρνητικό ( $< 1,0$ ), τότε απαιτείται να ολοκληρωθεί μια δεύτερη επαναληπτική εξέταση (τρίτο αποτέλεσμα) για να παραχθεί ένα τελικό αποτέλεσμα. Το αποτέλεσμα της δεύτερης επανεξέτασης είναι εκείνο το οποίο θεωρείται οριστικό και πρέπει να ανακοινωθεί.
4. Εάν η αναλογία RLU/τιμή διακοπής ενός δείγματος πλησιάζει αλλά είναι μικρότερη του 1,0 και υπάρχει υποψία λοίμωξης με HPV υψηλού κινδύνου, προβείτε σε εναλλακτικές μεθόδους εξέτασης ή/και επανάληψη του δείγματος.
5. Δείγματα STM με αναλογίες RLU/τιμή διακοπής  $\geq 1,0$  τόσο για ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου όσο και για ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου θεωρούνται «θετικά» για 1 ή περισσότερους τύπους HPV από κάθε ομάδα ανιχνευτών.
6. Δείγματα STM με αναλογίες RLU/τιμή διακοπής  $\geq 1,0$  με το μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών θεωρούνται θετικά για 1 ή περισσότερους τύπους HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68.
7. Δείγματα με αναλογία RLU/τιμής διακοπής  $< 1,0$  για το μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών ή για ανιχνευτές HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου θεωρούνται «αρνητικά» ή «χωρίς ανίχνευση HPV DNA» ως προς τους 18 εξεταζόμενους τύπους HPV. Οι αλληλουχίες HPV DNA είτε απουσιάζουν είτε τα επίπεδα του HPV DNA βρίσκονται κάτω του ορίου ανίχνευσης της δοκιμασίας.

**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΔΕΙΞΗ HPV ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΑΙ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ****Κλινικός έλεγχος ασθενών με αποτέλεσμα 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 εξέταση HPV DNA σε επιλεγμένη ομάδα γυναικών με οριακά αποτελέσματα εξέτασης κολπικού επιχρίσματος) πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1996 υπό την επίβλεψη του ερευνητικού ιδρύματος Kaiser Foundation Research Institute και της ιατρικής ομάδας Kaiser Permanente Medical Group. Ελήφθησαν τραχηλικά δείγματα για εξετάσεις κολπικού επιχρίσματος ρουτίνας και για τη δοκιμασία *digene* HC2 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)<sup>40</sup>. Οι γυναίκες (15 ετών και άνω) οι οποίες κατόπιν εξέτασης κολπικού επιχρίσματος παρουσίασαν ASC-US (άτυπα κύτταρα απροσδιορίστου σημασίας) παραπέμφθηκαν σε κολποσκόπηση και βιοψία. Τα κολποσκοπικά κατευθυνόμενα ιστολογικά δείγματα εξετάστηκαν από παθολογοανατόμους και στη συνέχεια έγινε μια πρώτη διάγνωση. Κάθε ιστολογικό δείγμα επανεξετάστηκε από ανεξάρτητο παθολογοανατόμο και για τις ασυμφωνίες μεταξύ αρχικής και ανεξάρτητης εξέτασης αποφάνθηκε ένας τρίτος παθολογοανατόμος.

Εξέταση HPV DNA πραγματοποιήθηκε στο αρχικό δείγμα και χρησιμοποιήθηκε μόνο ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου. Η εξέταση HPV DNA διενεργήθηκε με ένα πρωτότυπο της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA που περιείχε ανιχνευτές για 11 από τους 13 τύπους HPV που περιλαμβάνονται στον ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου, αλλά δεν περιείχε ανιχνευτές για HPV τύπου 59 και 68. Αυτή η διαφορά δεν αναμενόταν να οδηγήσει σε σημαντική διαφοροποίηση στα προφίλ απόδοσης μεταξύ των δύο δοκιμασιών.

Διαθέσιμα ήταν τα αποτελέσματα εξέτασης HPV 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 HPV DNA για τα μέσα STM και PreservCyt, η απόδοση παρουσιάζεται μόνο για το διάλυμα PreservCyt.

Ο Πίνακας 3 δείχνει ότι μεταξύ εκείνων που παρουσίασαν κολπικό επίχρισμα με παραπομπή λόγω ASC-US, η αρνητική προγνωστική αξία της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA για παρουσία HSIL ή υψηλότερης νόσου στην κολποσκόπηση είναι 99%.

**Πίνακας 3**  
**Σύγκριση της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA έναντι συναινετικής ιστολογίας**  
**Παραπομπή πληθυσμού ASC-US**  
**Μελέτη Kaiser, δείγματα σε διάλυμα PreservCyt**

	HSIL ή μεγαλύτερο κατά την κολποσκόπηση			Σύνολο
		+	-	
HPV υψηλού κινδύνου	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Σύνολο	71	814	885

Ευαισθησία [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)  
95% CI = 84,3 έως 97,7

Ειδικότητα [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)  
95% CI = 57,7 έως 64,4

Επιπολασμός νόσου = 8,0% (71/885)

Θετική προγνωστική αξία δοκιμασίας = 17,2% (66/383)

Αρνητική προγνωστική αξία δοκιμασίας = 99,0% (497/502)

Ο Πίνακας 4 παρουσιάζει τις θεωρητικά θετικές και αρνητικές διαγνωστικές αξίες με βάση τους εκάστοτε επιπολασμούς ενός αρχικού ASC-US το οποίο αποβαίνει HSIL ή μεγαλύτερο σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου.

**Πίνακας 4**  
**Θεωρητικά θετική και αρνητική προγνωστική αξία**  
**Ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου**  
**Αποτελέσματα κολπικού επιχρίσματος ASC-US**

Θεωρητικός επιπολασμός για HSIL	Αρχικό αποτέλεσμα ASC-US κολπικού επιχρίσματος	
	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

Ο Πίνακας 5 απεικονίζει τη διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων ηλικιακών ομάδων που συμμετείχαν στη μελέτη:

**Πίνακας 5**  
**Στοιχεία μελέτης Kaiser**  
**Απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA έναντι συναινετικής ιστολογίας**  
**Αποτελέσματα (HSIL)**  
**Χαρακτηριστικά κατά ηλικία**

	Ηλικία <30	Ηλικία 30-39	Ηλικία >39
<b>n</b>	287	233	365
<b>Επιπολασμός της νόσου (%)</b>	12,2	11,2	2,7
<b>Ευαισθησία (%)</b>	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95% διάστημα αξιοπιστίας	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
<b>Ειδικότητα (%)</b>	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95% διάστημα αξιοπιστίας	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
<b>Αρνητική προγνωστική αξία (%)</b>	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
<b>Θετική προγνωστική αξία (%)</b>	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

**Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα για τον προσδιορισμό του κινδύνου σε νόσο 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 διάφορα 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 μελέτης αποτελούνταν από γυναίκες στις οποίες είχε διαγνωστεί LSIL ή HSIL κατόπιν εξέτασης κολπικού επιχρίσματος και οι οποίες παραπέμφθηκαν σε συμπληρωματική κολποσκόπηση. Σε σύνολο 702 ασθενών, οι 327 παρουσίασαν αποτελέσματα κολπικού επιχρίσματος μεγαλύτερα από ASC-US και επαρκείς διαθέσιμες πληροφορίες· από αυτές, οι 96 παρουσίασαν τελικό στάδιο νόσου HSIL ή μεγαλύτερο. 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 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 (ανατρέξτε στον Πίνακα 6). Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA διεξήχθη σε 3 μεγάλα μητροπολιτικά ιατρικά κέντρα ανεξάρτητα από τους τόπους συλλογής των δειγμάτων κατά την κολποσκόπηση. Η κυτταρολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε σε παθολογικό εργαστήριο 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 της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA για τα μέσα STM και PreservCyt, η απόδοση παρουσιάζεται μόνο για το PreservCyt.

Δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά στα αποτελέσματα ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου μεταξύ δειγμάτων σε STM και δειγμάτων σε PreservCyt. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου στο συγκεκριμένο δείγμα πληθυσμού:

**Πίνακας 6**  
**Αλγόριθμος σταδίου της νόσου ασθενούς**

Αποτέλεσμα κυτταρολογικής εξέτασης	Αποτέλεσμα ιστολογικής εξέτασης	Στάδιο νόσου
ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ ή Δεν πραγματοποιήθηκε*	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
LSIL	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	LSIL
HSIL	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	HSIL
Καρκίνος	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	HSIL+
ΑΡΝΗΤΙΚΟ	LSIL	LSIL
LSIL	Δεν πραγματοποιήθηκε*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Καρκίνος	LSIL	LSIL
ΑΡΝΗΤΙΚΟ	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Δεν πραγματοποιήθηκε*	HSIL
Καρκίνος	HSIL	HSIL
ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Καρκίνος	HSIL+
LSIL	Καρκίνος	HSIL+
HSIL	Καρκίνος	HSIL+
Καρκίνος	Δεν πραγματοποιήθηκε*	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.

Οι Πίνακες 7 και 8 αντιπροσωπεύουν την απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA που προσδιορίστηκε με χρήση 327 δειγμάτων PreservCyt, 96 από τα οποία συλλέχθηκαν από γυναίκες που διαγνώστηκαν με νόσο του τραχήλου υψηλού βαθμού. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας όλες τις ασθενείς της μελέτης με παραπομπή λόγω μη φυσιολογικών αποτελεσμάτων κολπικού επιχρίσματος. Οι συγκρίσεις παρουσιάζονται για δείγματα PreservCyt που εξετάστηκαν με ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου.

**Πίνακας 7**  
**Αποτελέσματα του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου**

Αποτέλεσμα εξέτασης κολπικού επιχρίσματος	Τελικό στάδιο νόσου						Σύνολο
	HSIL		LSIL		Αρνητικό		
	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	
Αποτελέσματα HPV υψηλού κινδύνου							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
<b>Σύνολο</b>	<b>89</b>	<b>7</b>	<b>107</b>	<b>47</b>	<b>33</b>	<b>44</b>	<b>327</b>
	<b>96</b>		<b>154</b>		<b>77</b>		

Ο Πίνακας 8 δείχνει ότι η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA με χρήση του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου 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. Η δοκιμασία κατέδειξε επίσης αρνητική προγνωστική αξία σχεδόν 93% σε αυτόν τον πληθυσμό.

**Πίνακας 8**  
**Χαρακτηριστικά απόδοσης**  
**Δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA σε ασθενείς που παραπέμφθηκαν**  
**Κολπικό επίχρισμα LSIL ή υψηλότερο και τελική κατάσταση της νόσου HSIL**

Αποτέλεσμα ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου	Κολπικό επίχρισμα LSIL ή HSIL → Νόσος HSIL			Σύνολο
		+	-	
	+	89	140	
-	7	91	<b>98</b>	
<b>Σύνολο</b>	<b>96</b>	<b>231</b>	<b>327</b>	

Ευαισθησία  $[TP/(TP+FN)] = 92,7\% (89/96)$

95% CI = 85,6 έως 97,0

Ειδικότητα  $[TN/(TN+FP)] = 39,4\% (91/231)$

95% CI = 33,1 έως 46,0

Επιπολασμός νόσου για LSIL έως τελικό HSIL = 21,4%

Επιπολασμός νόσου για HSIL έως τελικό 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 HPV DNA φαίνεται κάπως χαμηλή, μια αυστηρή συσχέτιση μεταξύ της απουσίας νεοπλασίας και ενός αρνητικού αποτελέσματος HPV δεν αναμένεται. Το HPV DNA μπορεί να υπάρχει σε γυναίκες στις οποίες η νόσος δεν έχει προχωρήσει σε υψηλό βαθμό. Στην πραγματικότητα, όταν πραγματοποιήθηκε δοκιμασία HPV αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (δοκιμασία με ερευνητική χρήση μόνο) σε δείγματα με θετικά αποτελέσματα HPV και των οποίων η αντίστοιχη κατάσταση νόσου ήταν χαμηλότερη από νεοπλασία χαμηλού βαθμού, σχεδόν 75% ήταν θετικά.

Ο Πίνακας 9 υποδεικνύει τις θεωρητικά θετικές και αρνητικές διαγνωστικές αξίες του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου για αρχικά LSIL ή HSIL τα οποία κατόπιν κολποσκόπησης αποδεικνύονται HSIL ή πιο σοβαρές νόσοι.



**Πίνακας 9**  
**Θεωρητικά θετική και αρνητική προγνωστική αξία**  
**Ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου**  
**Αρχικό αποτέλεσμα LSIL ή HSIL εξέτασης κολπικού επιχρίσματος**

Θεωρητικός επιπολασμός για HSIL	Αρχικό αποτέλεσμα LSIL ή HSIL εξέτασης κολπικού επιχρίσματος	
	Θετικό αποτέλεσμα δοκιμασίας	Αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας
	Προγνωστική αξία	Προγνωστική αξία
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

**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΔΕΙΞΗ HPV ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΟΥ ΣΕ ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΟ ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ**

**Κλινική απόδοση κατά τον προσυμπτωματικό έλεγχο ασθενών με φυσιολογικά αποτελέσματα εξέτασης κολπικού επιχρίσματος ως βοήθημα για την εκτίμηση του κινδύνου και τη διαχείριση ασθενών**

Παρακάτω περιγράφονται τα αποτελέσματα οκτώ ανεξάρτητων κλινικών μελετών οι οποίες πραγματοποιήθηκαν από οκτώ διακεκριμένα ιατρικά, ακαδημαϊκά και κυβερνητικά ιδρύματα σε κέντρα των Ηνωμένων Πολιτειών και άλλων χωρών. Οι μελέτες χρησιμοποίησαν τις καθιερωμένες μεθόδους Pap (Παπανικολάου) που ήταν σε χρήση στις χώρες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η μελέτη. Σε όλες εκτός από δύο περιπτώσεις εφαρμόστηκε το σύστημα αξιολόγησης Bethesda για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του τεστ Pap. Επιπλέον, νόσος του τραχήλου υψηλού βαθμού διαγνώστηκε 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 30-35 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. Όπως υποδεικνύει ο πίνακας, 2 από τις 8 μελέτες πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, 2 στην Ευρώπη, 2 στη Λατινική Αμερική, 1 στην Αφρική και 1 στην Ασία.

Συνοψίζεται η απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA που παρατηρήθηκε από έξι συγχρονικές μελέτες, στους Πίνακες 10 και 11, για γυναίκες ηλικίας 30 ετών και άνω και οι οποίες διαγνώστηκαν με ιστολογικά επιβεβαιωμένη νεοπλασία του τραχήλου υψηλού βαθμού (η οποία ορίζεται ως CIN3 ή πιο σοβαρή).

**Πίνακας 10**  
**Εκτιμήσεις απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA**  
**Ευαισθησία και ειδικότητα**

Πληθυσμός	n	Ευαισθησία (%)			Ειδικότητα (%)		
		PAP μόνο	HPV μόνο	HPV + PAP	PAP μόνο	HPV μόνο	HPV + PAP
Δυτική Ευρώπη 1	7.592	51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7.453/7.565)	96,2 (275/7565)	95,1 (7.193/7.565)
		95% CI	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2- 98,8	95,7-96,6
Λατινική Αμερική 1	6.115	58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5.962/6.038)	93,9 (5.669/6.038)	93,4 (5.637/6.038)
		95% CI	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5
Λατινική Αμερική 2 <sup>†</sup>	6.176	77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5.745/6.108)	94,0 (5.742/6.108)	89,9 (5.490/6.108)
		95% CI	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6
Αφρική	2.925	84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2.436/2.818)	80,0 (2.253/2.818)	76,4 (2.152/2.818)
		95% CI	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4
Ασία	1.936	97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1.445/1.894)	83,0 (1.572/1.894)	68,0 (1.287/1.894)
		95% CI	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0
Η.Π.Α. 1	1040	50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1.013/1.038)	96,2 (999/1.038)	95,5 (991/1.038)
		95% CI	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3

<sup>†</sup> Δεδομένα HC2 όπου είναι διαθέσιμα, αλλιώς χρησιμοποιούνται δεδομένα HCS: συνδυασμένα δεδομένα.

**Πίνακας 11**  
**Εκτιμήσεις απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA**  
**Θετική και αρνητική προγνωστική αξία**

Πληθυσμός	n	Επιπολασμός(%)	Θετική προγνωστική αξία (%)			Αρνητική προγνωστική αξία (%)		
			PAP μόνο	HPV μόνο	HPV + PAP	PAP μόνο	HPV μόνο	HPV + PAP
Δυτική Ευρώπη 1	7.592	0,36 (27/7.592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7.453/7.466)	99,99 (7.275/7.276)	100,0 (7.193/7.193)
		95% CI	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0
Λατινική Αμερική 1	6.115	1,26 (77/6.115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5.962/5.994)	99,93 (5.669/5.673)	99,96 (5.637/5.639)
		95% CI	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98
Λατινική Αμερική 2 <sup>†</sup>	6.176	1,10 (68/6.176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5.745/5.760)	99,88 (5.742/5.749)	99,93 (5.490/5.494)
		95% CI	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95
Αφρική	2.925	3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2.436/2.453)	99,51 (2.253/2.264)	99,63 (2.152/2.160)
		95% CI	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76
Ασία	1.936	2,17 (42/1.936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1.445/1.446)	100,0 (1.572/1.572)	100,0 (1.287/1.287)
		95% CI	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0
Η.Π.Α. 1	1040	0,19 (2/1.040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		95% CI	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0

<sup>†</sup> Δεδομένα HC2 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 Pap μόνο. Όπως η ευαισθησία, έτσι και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) του HPV ξεπερνά εκείνη του τεστ Pap μόνο και σε όλες τις περιπτώσεις αγγίζει το 100%. Αυτή η τιμή NPV υποδηλώνει την μεγάλη πιθανότητα απουσίας τραχηλικής νόσου υψηλού βαθμού ή καρκίνου σε γυναίκες με φυσιολογικές κυτταρολογικές εξετάσεις και χωρίς λοίμωξη HPV.

Αν και η ειδικότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA είναι χαμηλότερη από εκείνη του τεστ Pap 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.<sup>27,28</sup>

Παρόλο που ο επιπολασμός της υψηλού βαθμού νόσου δεν παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των μελετών που καθόρισαν την απόδοση, ο επιπολασμός της λοίμωξης HPV σε έναν πληθυσμό μπορεί να επηρεάσει την απόδοση και τυπικά διαφέρει κατά πληθυσμό ασθενών. Επιπλέον, ο επιπολασμός της μόλυνσης με HPV έχει καταδειχθεί ότι μειώνεται δραματικά με την ηλικία.<sup>28, 30-37, 41</sup> Οι θετικές προγνωστικές τιμές μειώνονται όταν εξετάζονται πληθυσμοί με χαμηλό επιπολασμό ή άτομα με μικρό κίνδυνο μόλυνσης.

Πραγματοποιήθηκαν διαχρονικές αναλύσεις με χρήση των αποτελεσμάτων από δύο μελέτες· η μία πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες από το National Cancer Institute (Εθνικό Ινστιτούτο για τον Καρκίνο, NCI) 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 διαμήκεις αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να αποδειχθεί κατά πόσο ασθενείς με αρνητικό τεστ Pap/ αρνητικό HPV διατρέχουν χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης τραχηλικής νόσου σε σχέση με γυναίκες κατά παράδοση οριζόμενες ως χαμηλού κινδύνου των οποίων το στάδιο HPV είναι άγνωστο και σε σχέση με ασθενείς με αρνητικό τεστ Pap/ θετικό HPV.

Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων απεικονίζονται στους Πίνακες 12 και 13 παρακάτω.

**Πίνακας 12**  
**Περίληψη αποτελεσμάτων: Μελέτες του NCI και Γαλλίας**  
**Σχετικός κίνδυνος νόσου υψηλού βαθμού**

Ερευνητική ομάδα	Ηλικία	Ταξινόμηση χαμηλού κινδύνου	n	Περιπτώσεις CIN 3+	Αναλογία (ανά 100 έτη ασθενών)	Σχετικός κίνδυνος (95% CI)
NCI	30 και άνω	Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Pap*	9.429	19	0,048	1,000
	Όλες	Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Pap*	13.392	44	0,082	1,000
Γαλλία	30 και άνω	Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Pap*	2.026	4	0,099	1,000
	Όλες	Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Διαδοχικά φυσιολογικά Pap*	2.650	7	0,136	1,000

\*Τρία φυσιολογικά Pap ετησίως σε διάστημα περίπου 2 ετών

**Πίνακας 13**  
**Περίληψη αποτελεσμάτων: Μελέτες του NCI και Γαλλίας**  
**Αναλογίες νόσου κατά στάδιο HPV με γνωστές τιμές**

Ερευνητική ομάδα	Ηλικία	Γνωστή τιμή σταδίου	n	Περιπτώσεις CIN 3+	Αναλογία (ανά 100 έτη ασθενών)	Σχετικός κίνδυνος (95% CI)
NCI	30 και άνω	Pap φυσιολογικό, HPV θετικό	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)

	Όλες	Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	12.054	28	0,043	1,00
		Pap φυσιολογικό, HPV θετικό	2.561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	17.594	48	0,056	1,00
Γαλλία	30 και άνω	Pap φυσιολογικό, HPV θετικό	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	1.696	3	0,084	1,00
	Όλες	Pap φυσιολογικό, HPV θετικό	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap φυσιολογικό, HPV αρνητικό	2.180	3	0,066	1,00

Η κλινική χρησιμότητα του αποτελέσματος του τεστ HPV διαφαίνεται επιπλέον από τον αυξημένο κίνδυνο τραχηλικής νόσου σε γυναίκες με θετικό HPV σε σχέση με γυναίκες με αρνητικό HPV.

### ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Ένα μη κλινικό σετ κλωνοποιημένων πλασμιδίων DNA HPV εξετάστηκε προκειμένου να καθοριστεί κατά πόσο καθένας από τους 18 τύπους HPV είναι ανιχνεύσιμος από τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA και προκειμένου να προσδιοριστεί η αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας για καθέναν από τους τύπους HPV. Κάθε συμπύκνωμα στόχος HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml και 0,2 pg/ml) από καθέναν από τους 18 τύπους HPV DNA (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68) εκτελέστηκε εις τριπλούν με ανιχνευτή HPV χαμηλού ή υψηλού κινδύνου, κατά περίπτωση. Το μέσο σήμα σε RLU για κάθε συγκέντρωση του εκάστοτε τύπου HPV υπολογίστηκε και συγκρίθηκε με το θετικό βαθμονομητή για την κατάλληλη πλευρά της δοκιμασίας.

Το ανιχνεύσιμο όριο κάθε τύπου HPV σε STM απεικονίζεται στον Πίνακα 14. Τα ανιχνεύσιμα όρια κυμαίνονται μεταξύ 0,62 pg/ml και 1,39 pg/ml ανάλογα με τον υπό εξέταση τύπο HPV. Όλοι οι τύποι HPV ήταν ανιχνεύσιμοι σε επίπεδο 1,09 pg στόχου HPV DNA ανά 1 ml δείγματος σε STM. Το μέσο ανιχνεύσιμο όριο όλων των 18 τύπων HPV DNA ήταν 1,09 pg/ml με σταθερή απόκλιση της τάξης του 0,05 .

**Πίνακας 14**  
**Σύνοψη των ανιχνεύσιμων ορίων ευαισθησίας της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA για κάθε τύπο HPV DNA σε STM**

Τύπος HPV DNA	Ανιχνεύσιμο HPV DNA Συγκέντρωση (pg/ml)	Τυπική απόκλιση	95% Διάστημα αξιοπιστίας
6	1,33	0,03	1,22-1,46
11	1,13	0,05	1,00-1,29
16	1,09	0,06	0,94-1,29
18	1,05	0,05	0,88-1,29
31	1,01	0,05	0,91-1,15
33	1,35	0,02	1,26-1,45
35	1,11	0,05	0,95-1,31
39	1,39	0,09	1,16-1,71
42	1,20	0,05	1,02-1,44
43	0,85	0,03	0,86-1,07
44	1,17	0,04	1,02-1,36
45	1,14	0,04	0,99-1,35
51	0,78	0,10	0,70-0,88
52	1,37	0,06	1,21-1,58
56	0,62	0,04	0,58-0,67
58	0,82	0,04	0,73-0,94

59	1,10	0,06	1,00-1,21
68	1,19	0,04	1,03-1,39
<b>Μέση τιμή (όλοι οι τύποι)</b>	<b>1,09</b>	<b>0,05</b>	<b>0,97-1,27</b>

### ΑΠΟΔΟΣΗ ΜΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ (CPC)

Το ίδιο μη κλινικό σετ κλωνοποιημένων πλασμιδίων DNA HPV που περιγράφεται παραπάνω εξετάστηκε για να προσδιοριστεί η αναλυτική ευαισθησία καθενός από τους 18 τύπους HPV στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA ακολουθούμενο από το πρωτόκολλο μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών (CPC) όπως περιγράφεται σε αυτό το ένθετο. Η αναλυτική ευαισθησία του πρωτοκόλλου CPC κυμάνθηκε μεταξύ 0,58 pg/ml και 1,39 pg/ml και όλοι οι τύποι HPV ήταν ανιχνεύσιμοι σε επίπεδο 0,95 pg/ml στόχου HPV DNA target ανά 1 ml δείγματος. Το μέσο ανιχνεύσιμο όριο όλων των 18 τύπων HPV ήταν 0,95 pg/ml με σταθερή απόκλιση της τάξης του 0,07. Αυτή η ευαισθησία είναι ισοδύναμη με την αναλυτική ευαισθησία που απαιτείται για τη μέθοδο δύο ανιχνευτών της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA.

### ΙΣΟΔΥΝΑΜΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ STM ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ PRESERVCYT

Η ισοδυναμία μεταξύ δειγμάτων STM και διαλύματος PreservCyt εξετάστηκε για ίση ανάκτηση HPV 18 DNA από περίπου  $10^6$  θετικά κύτταρα HeLa τα οποία περιείχαν ενσωματωμένα γονιδιώματα HPV 18 που εισήχθησαν σε STM και σε δεξαμενή αρνητικών κυττάρων σε διάλυμα PreservCyt. Κάθε τύπος δείγματος υποβλήθηκε σε επεξεργασία σύμφωνα με τις αντίστοιχες διαδικασίες επεξεργασίας/αποδιάταξης που περιγράφονται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης και εξετάστηκε με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA χρησιμοποιώντας ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάκτηση του HPV 18 DNA από ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος είναι ισοδύναμη για τα δύο μέσα και ότι η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος PreservCyt δεν επηρεάζει την αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA.

### ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ SUREPATH ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ STM ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

Εντός των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, διεξήχθη μια κλινική αξιολόγηση δύο φάσεων στην οποία συμμετείχαν 6 κέντρα συλλογής και 3 τόποι για τις δοκιμασίες. Επιλέξιμοι για εγγραφή σύμφωνα με τα προκαθορισμένα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού ήταν οι ασθενείς που επισκέπτονταν κάποια κλινική STD, μαιευτική/γυναικολογική κλινική, κλινική κολποσκόπησης, νοσοκομείο ή κέντρο οικογενειακού προγραμματισμού. Στη φάση σκοπιμότητας, που σκοπό είχε να καθορίσει μια κατάλληλη τιμή διακοπής δοκιμασίας *digene* HC2 High-Risk HPV DNA για χρήση με δείγματα SurePath, εντάχθηκαν περίπου 400 ασθενείς. Η φάση κλινικής επικύρωσης, στην οποία εντάχθηκαν περίπου 1.500 ασθενείς για την επικύρωση της επιλεγμένης τιμής διακοπής δοκιμασίας, ξεκίνησε μετά από μια ενδιάμεση ανάλυση της σκοπιμότητας και κατέδειξε ότι μια τιμή διακοπής δοκιμασίας 1,0 RLU/CO χρησιμοποιώντας δείγματα SurePath έδωσε αποδεκτή συμφωνία με τα αποτελέσματα δειγμάτων STM.

Και στις δύο φάσεις αξιολόγησης προέκυψαν ζεύγη τραχηλικών δειγμάτων SurePath και STM από τις γυναίκες που συναίνεσαν να συμμετάσχουν. Το δείγμα SurePath στάλθηκε στη συνέχεια στο κυτταρολογικό εργαστήριο και προετοιμασία αντικειμενοφόρου. Μετά την κυτταρολογική προετοιμασία, το υπόλοιπο δείγμα SurePath και το αντίστοιχο δείγμα STM εξετάστηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 High-Risk HPV DNA χρησιμοποιώντας τιμή διακοπής δοκιμασίας 1,0 RLU/CO.

Στον πίνακα 15 δίνεται η συσχέτιση των αποτελεσμάτων SurePath και των αντίστοιχων ζευγαριών δειγμάτων STM που αποκτήθηκαν από το σύνολο του εγγεγραμμένου πληθυσμού και τα οποία παρατηρήθηκαν στα τελικά αποτελέσματα και επιλέχθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων.

**Πίνακας 15**  
**Συμφωνία αποτελεσμάτων SurePath με STM**  
**(όλες οι ηλικίες και κυτταρολογική ταξινόμηση)**  
**(n = 1.490)**

Θετική συμφωνία % 95% CI (n/N)		Αρνητική συμφωνία % 95% CI (n/N)	
Όλα θετικά	Υποομάδα υψηλού θετικού (RLU/CO ≥ 2,5)	Όλα αρνητικά	Υποομάδα χαμηλού αρνητικού RLU/CO (<0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1.011/1.061)	96,0 94,6, 97,1 (1.002/1.044)

Αυτά τα αποτελέσματα προβλέπουν ότι η σχετική ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμασίας με χρήση δειγμάτων SurePath συσχετίζονται σε υψηλό βαθμό με εκείνες που λαμβάνονται με χρήση του τύπου δειγμάτων STM όπως φαίνεται από το χαμηλότερο όριο του 95% διαστήματος αξιοπιστίας τόσο για θετική όσο και για αρνητική συμφωνία.

### ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

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

Τρία εξωτερικά εργαστήρια πραγματοποίησαν τις εξετάσεις με την ίδια παρτίδα κιτ δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA σε 3 διαφορετικές ημέρες με ένα σετ ταυτόσημης αναπαραγωγιμότητας. Το σετ αναπαραγωγιμότητας περιλάμβανε τα ακόλουθα δείγματα: 12 κλινικά δοχεία δειγμάτων σε STM τα οποία είχαν υποστεί αποδιάταξη, 3 κλινικά δοχεία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt τα οποία δεν είχαν υποστεί αποδιάταξη, αρνητικό βαθμονομητή και θετικούς βαθμονομητές χαμηλού και υψηλού κινδύνου σε συγκεντρώσεις των 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml και 10 pg/ml. Όλα τα στοιχεία του σχεδίου εξετάστηκαν κάθε ημέρα εις τριπλούν με χρήση των μεθόδων ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου και CPC. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον Πίνακα 16.

**Πίνακας 16**  
**Σύνοψη συνολικών στατιστικών για**  
**πολυκεντρική αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA**

Στατιστικό μέτρο	ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ HPV ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	Μείγμα συνδυασμού ανιχνευτών (CPC)	Συνδυασμένα αποτελέσματα του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου και CPC <sup>a</sup>
Αναλογία των αναμενόμενων θετικών με παρατηρούμενο θετικό αποτέλεσμα	100% (99,0-100,0)	99,8% (98,92-100,0)	99,9% (99,38-100,0)
Αναλογία των αναμενόμενων αρνητικών με παρατηρούμενο αρνητικό αποτέλεσμα	99,0% (97,49-99,73)	98,9% (96,79-99,77)	99,0% (97,88-99,58)

Συμφωνία	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (99,0-99,78)
Κάππα	0,990	0,989	0,990

<sup>α</sup>Οι αριθμοί στις παρενθέσεις υποδεικνύουν 95% διαστήματα αξιοπιστίας. Τα συνολικά στοιχεία αποτελούν συνδυασμό όλων των κύκλων δοκιμασιών σε όλους τους τόπους διεξαγωγής τους.

Αυτό υποδεικνύει ότι η αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA με κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν σε STM είναι πολύ ικανοποιητική.

**ΣΧΕΔΙΟ ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**

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 τους ανιχνευτές HPV που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Όλοι οι μικροοργανισμοί εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις  $1 \times 10^5$  και  $1 \times 10^7$  οργανισμών ανά ml. Τα DNA από τα οποία αφαιρέθηκαν ιοί και πλασμίδια εξετάστηκαν σε συμπύκνωμα των 4 ng/ml.

Παρακάτω βλέπετε έναν κατάλογο των εξεταζομένων βακτηριδίων. Όλα τα βακτήρια έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA.

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

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

Παρακάτω βλέπετε έναν κατάλογο του εξεταζόμενου DNA ιών ή πλάσματος ή του εξεταζόμενου ανθρώπινου ορού:

Αδενοϊός 2	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 1
Κυτταρομεγαλοϊός	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 2
Ιός Epstein-Barr	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 3
Ορός θετικός για επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας Β	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 4
Απλός έρπης I	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 5
Απλός έρπης II	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 8
Ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV, RT DNA)	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 13
Ιός του πιθήκου τύπου 40 (SV40)	Ιός των ανθρωπίνων θηλωμάτων τύπου 30 pBR322

Οι μόνοι ιοί ή πλασμίδια που έδειξαν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA ήταν ο HPV τύπου 13 και το πλασμίδιο pBR322. Το HPV 13 DNA αντέδρασε μόνο με ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου. Ο HPV 13 ανιχνεύεται συνήθως σε βλάβες των χειλέων σε ορισμένες εθνοτικές ομάδες, αλλά δεν έχει ανιχνευθεί στην ουρογεννητική οδό.<sup>29</sup> Συνεπώς, η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ του HPV 13 και της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA με ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου δεν αναμένεται να προκαλέσει κλινικώς συγχυτικό αποτέλεσμα για πρωκτογεννητικά δείγματα. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του pBR322 και της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA χαμηλού κινδύνου και ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου δεν αναμένεται διότι είναι δύσκολο να απομακρυνθεί όλο το pBR322 DNA-φορέας κατά την απομόνωση του ένθετου HPV. 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. Ωστόσο, 298 κλινικά δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά με τη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA χαμηλού κινδύνου και με ανιχνευτές HPV υψηλού κινδύνου κατέδειξαν ότι κανένα θετικό αποτέλεσμα δεν οφειλόταν στο pBR322 όταν εξετάστηκαν με έναν ανιχνευτή pBR322. Συνεπώς, η πιθανότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA εξαιτίας ομόλογων αλληλουχιών pBR322 σε κλινικά δείγματα εμφανίζεται μικρή.

### **ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ**

Καθένας από τους 18 τύπους HPV εξετάστηκε με ανιχνευτές HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου σε συγκεντρώσεις των 4 ng/ml HPV DNA. Όλοι οι στόχοι HPV αναμένονταν να αποβούν θετικοί με την κατάλληλη ομάδα ανιχνευτών, ενώ κανένα από τα δείγματα δεν αναμενόταν να αποβεί θετικό με την αντίθετη ομάδα ανιχνευτών. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι υπάρχει μικρό ποσοστό διασταυρούμενου υβριδισμού μεταξύ HPV τύπου 6 και 42 (τύποι HPV χαμηλού κινδύνου) και της ομάδας ανιχνευτών υψηλού κινδύνου (ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου). Δείγματα με υψηλά επίπεδα (4 ng/ml ή υψηλότερα) HPV 6 ή HPV 42 DNA πιθανόν να είναι θετικά και με τις δύο ομάδες ανιχνευτών. Η κλινική σημασία αυτής της διαπίστωσης είναι ότι οι ασθενείς με επίπεδο HPV 6 ή HPV 42 DNA της τάξης του 4 ng/ml και άνω, πιθανόν να παραπεμφθούν σε κολποσκόπηση.

Επιπλέον, ο ανιχνευτής HPV υψηλού κινδύνου έχει καταδειχθεί ότι παρουσιάζει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με τους τύπους HPV 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<sup>38</sup>. Ασθενείς των οποίων τα δείγματα περιέχουν υψηλά επίπεδα HPV DNA αυτών των τύπων πιθανόν να παραπεμφθούν εσφαλμένα σε κολποσκόπηση. 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.<sup>39</sup> 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.

### **ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ STM**

Η επίδραση του αίματος και άλλων δυνητικώς παρεμβατικών προσδιορισμένων ή μη προσδιορισμένων ουσιών εκτιμήθηκε στη δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA. Ολικό αίμα, καταιονισμός, αντι-μυκητιακές κρέμες και αντισυλληπτική γέλη (παράγοντες οι οποίοι συχνά εντοπίζονται σε τραχηλικά δείγματα) προστέθηκαν σε STM-αρνητικά και 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 θετική τιμή διακοπής της δοκιμασίας (1 pg/ml) εφόσον υπήρξαν υψηλά επίπεδα αντιμυκητιακής κρέμας ή αντισυλληπτικής γέλης. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά απίθανο ένα κλινικό δείγμα να αποτελείται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από αυτές τις ουσίες, δεδομένου ότι ο τράχηλος κατά κανόνα καθαρίζεται πριν από τη λήψη κολπικού επιχρίσματος και για την εξέταση HPV.

### **ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVACYT**

Η επίδραση του αίματος και άλλων δυνητικώς παρεμβατικών προσδιορισμένων ή μη προσδιορισμένων ουσιών οι οποίες πιθανόν να υπάρχουν σε κλινικά δείγματα σε διάλυμα PreservCyt εκτιμήθηκε στη δοκιμασία *digene* HC2 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 σε διάλυμα PreservCyt σε συγκεντρώσεις οι οποίες μπορεί να εντοπιστούν σε τραχηλικά δείγματα. Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με κανέναν 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 HPV DNA.

## ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ *digene* HC2 HPV DNA ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ STM

Η αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA με κλινικά δείγματα που συλλέγονται σε STM προσδιορίστηκε σε μια μελέτη με χρήση 20 κλινικών δεξαμενών (10 θετικών και 10 αρνητικών) που προετοιμάστηκαν συνδυάζοντας προηγουμένως αποδιαταγμένα και εξετασμένα δείγματα συλλεγμένα με τραχηλική βούρτσα σε STM. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε αντίγραφα των 4, κάθε μέρα για 5 ημέρες, για ένα σύνολο 20 αντιγράφων ανά δείγμα. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών. Μέσες τιμές, σταθερή απόκλιση και 95% διάστημα αξιοπιστίας ως προς τη μέση τιμή (CI) υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα εντός της ημέρας και για διάστημα 5 ημερών και απεικονίζονται στον Πίνακα 17.

**Πίνακας 17**  
**Μέση τιμή RLU/CO με διαστήματα αξιοπιστίας και ποσοστό θετικού αποτελέσματος (Φθίνουσα ταξινόμηση κατά μέση τιμή RLU/CO)**

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

Για τα 5 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO της τάξης του 20% ή μεγαλύτερη άνω της τιμής διακοπής (αρ. 1-5), 100 στα 100 παράγωγα (100,0%) ήταν θετικά. Για τα 5 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO έως 20% άνω ή κάτω της τιμής διακοπής της δοκιμασίας (αρ. 6-10), 60 στα 100 (60%) παράγωγα ήταν θετικά και 40 στα 100 (40%) ήταν αρνητικά. Για τα 10 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO άνω του 20% χαμηλότερα της τιμής διακοπής της δοκιμασίας, 200 στα 200 παράγωγα (100%) ήταν αρνητικά.

Κατά συνέπεια, δείγματα με μέση τιμή RLU/CO τουλάχιστον 20% άνω της τιμής διακοπής της δοκιμασίας ήταν θετικά σε ποσοστό 100%, ενώ δείγματα με μέση τιμή RLU/CO τουλάχιστον 20% κάτω της τιμής διακοπής ήταν αρνητικά σε ποσοστό 100%, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα δείγματα που απέχουν τουλάχιστον 20% από την τιμή διακοπής αναμένεται να παράγουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα τα οποία βρίσκονται κοντά στην τιμή διακοπής απέδωσαν κατά προσέγγιση ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι τα δείγματα STM δίνουν αναπαραγωγίμα αποτελέσματα με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA.

## ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ *digene* HC2 HPV DNA ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVACYT

Η αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA με κλινικά δείγματα που συλλέγονται σε διάλυμα PreservCyt προσδιορίστηκε σε μια μελέτη με χρήση 24 εικονικών δειγμάτων σε συγκέντρωση που κάλυπτε ένα εύρος συγκεντρώσεων HPV DNA. Τα δείγματα αποτελούνταν από διάλυμα PreservCyt και λευκά αιμοσφαίρια, με και χωρίς βακτήρια που περιείχαν πλασμιδίο HPV 16.

Τα δείγματα εξετάστηκαν σε παράγωγα των 4 σε καθεμία από σύνολο 5 ημερών και με σύνολο 20 παραγώγων ανά δείγμα. Κάθε μέρα από τις 5 ημέρες της μελέτης, υποβλήθηκε σε επεξεργασία και εξετάστηκε ένα υποπολλαπλάσιο 8 ml από κάθε δείγμα σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του κιτ μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 με χρήση του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου μόνο. Μέσες τιμές, σταθερές αποκλίσεις και 95% διαστήματα αξιοπιστίας (CI) υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα σε καθεμία από τις 5 ημέρες και για κάθε παράγωγο. Η μέση τιμή RLU/CO, το διάστημα αξιοπιστίας ως προς τη μέση τιμή και το ποσοστό των θετικών παραγώγων απεικονίζονται στον Πίνακα 18 για κάθε δείγμα και κατά φθίνουσα σειρά με βάση τη μέση τιμή RLU/CO.

**Πίνακας 18**  
**Μέση τιμή RLU/CO με διαστήματα αξιοπιστίας και ποσοστό θετικού αποτελέσματος**  
**(Φθίνουσα ταξινόμηση κατά μέση τιμή RLU/CO)**

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

Για τα 6 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO τουλάχιστον 20% άνω της τιμής διακοπής (αρ. 1-6), 114 στα 120 παράγωγα (95,0%) ήταν θετικά. Για τα 7 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO έως 20% άνω ή κάτω της τιμής διακοπής της δοκιμασίας (αρ. 7-13), 88 στα 139 (63,3%) παράγωγα ήταν θετικά και 51 στα 139 (36,7%) ήταν αρνητικά. Για τα 4 δείγματα με τιμή έως 10% άνω ή κάτω της τιμής διακοπής (αρ. 10-13), 41 στα 79 (51,9%) των παραγώγων ήταν θετικά και 38 (48,1%) ήταν αρνητικά. Για τα 11 δείγματα με μέση τιμή RLU/CO άνω του 20% χαμηλότερα της τιμής διακοπής της δοκιμασίας, 220 στα 220 παράγωγα (100%) ήταν αρνητικά.

Κατά συνέπεια, δείγματα με μέση τιμή RLU/CO τουλάχιστον 20% άνω της τιμής διακοπής της δοκιμασίας ήταν θετικά σε ποσοστό 95%, ενώ δείγματα με μέση τιμή RLU/CO τουλάχιστον 20% κάτω της τιμής διακοπής ήταν αρνητικά σε ποσοστό 100%, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα δείγματα που απέχουν τουλάχιστον 20% από την τιμή διακοπής αναμένεται να παράγουν συνεπή αποτελέσματα. Δείγματα τα οποία βρίσκονται κοντά στην τιμή διακοπής απέδωσαν κατά προσέγγιση ίσους αριθμούς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt δίνουν αναπαραγωγίμα αποτελέσματα με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA.

#### **ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ *digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΓΡΟ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ SUREPATH**

Οι αξιολογήσεις της αναπαραγωγιμότητας διεξήχθησαν για να χαρακτηρίσουν την ικανότητα των 3 διαφορετικών εργαστηρίων να αποκτήσουν το ίδιο διαγνωστικό αποτέλεσμα σε διαφορετικές ημέρες με διαφορετικούς κύκλους από μια πανομοιότυπη ομάδα δειγμάτων γνωστής θετικής/αρνητικής HPV κατάστασης κατά τη χρήση της τιμής διακοπής της δοκιμασίας 1,0 RLU/CO. Το σχέδιο των δειγμάτων για την αναπαραγωγιμότητα απαρτιζόταν από 5 HPV θετικά δείγματα, 2 δείγματα με συγκεντρώσεις του HPV DNA πλησίον της τιμής διακοπής της δοκιμασίας και 5 αρνητικά HPV δείγματα.

Τα μέλη του σχεδίου παρασκευάστηκαν συνδυάζοντας μοναδικά δείγματα ασθενών SurePath τα οποία είχαν γνωστή αρνητική ή θετική HPV κατάσταση έτσι ώστε να αποκτήσουν τις επιθυμητές επιδιωκόμενες τιμές RLU/CO. Κάθε μέλος του σχεδίου εξετάστηκε εις διπλούν, δύο φορές κάθε ημέρα για μια περίοδο πέντε ημερών για κάθε ένα από τα τρία εργαστήρια που συμμετείχαν.

**Πίνακας 19**  
**Μελέτη αναπαραγωγιμότητας δειγμάτων SurePath**  
**Ποιοτικά αποτελέσματα με βάση το μέλος του σχεδίου**

<b>Μέλος σχεδίου</b>	<b>Μέση RLU/CO</b>	<b>Αναμενόμενο αποτέλεσμα</b>	<b>HPV θετικό n (%)</b>	<b>HPV αρνητικό n (%)</b>
1	0,20	αρνητικό	0 (0)	60 (100)
2	0,21	αρνητικό	0 (0)	60 (100)
3	0,22	αρνητικό	0 (0)	60 (100)
4	0,28	αρνητικό	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	αρνητικό	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	αρνητικό	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	θετικό	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	θετικό	60 (100)	0 (0)
9	25,65	θετικό	60 (100)	0 (0)
10	81,52	θετικό	60 (100)	0 (0)
11	154,18	θετικό	60 (100)	0 (0)
12	765,29	θετικό	60 (100)	0 (0)

#### **ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ SUREPATH ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RAPID CAPTURE SYSTEM ΓΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων του δείγματος SurePath όταν χρησιμοποιείται το Rapid Capture System για την επεξεργασία της δοκιμασίας, συγκρίνεται με τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά τη χρήση της χειροκίνητης επεξεργασίας της δοκιμασίας. Πραγματοποιήθηκαν δύο συγκριτικές εξετάσεις με διαφορετικά υποπολλαπλάσια του ίδιου επεξεργασμένου δείγματος.

**Πίνακας 20**  
**Συμφωνία αποτελέσματος μεταξύ δειγμάτων SurePath με το RCS**  
**(RCS έναντι χειροκίνητης δοκιμασίας)**

<b>Θετική συμφωνία % 95% CI (n/N)</b>		<b>Αρνητική συμφωνία % 95% CI (n/N)</b>	
<b>Όλα θετικά</b>	<b>Υποομάδα υψηλού θετικού (RLU/CO ≥ 2,5)</b>	<b>Όλα αρνητικά</b>	<b>Υποομάδα χαμηλού αρνητικού RLU/CO (&lt;0,80)</b>
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1.057/1.079 96,9, 98,7	98,7 1.050/1.064 97,8, 99,28

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*

**Ανατρέξτε στο *Rapid Capture System User Manual* για πρόσθετους περιορισμούς της διαδικασίας ειδικά όσον αφορά τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος για εξετάσεις διεκπεραιωτικής ικανότητας δειγμάτων υψηλού όγκου.**

- Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA για τους τύπους του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και 68 δεν συνιστάται για την εκτίμηση πιθανολογούμενης σεξουαλικής κακοποίησης.
- Ο επιπολασμός της λοίμωξης από 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 δεν αποκλείει την πιθανότητα λοίμωξης με τον ιό HPV δεδομένου ότι τα πολύ χαμηλά επίπεδα λοίμωξης ή τυχόν λάθος κατά τη δειγματοληψία πιθανόν να παράγουν ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.
- Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA διακρίνει μεταξύ 2 ομάδων τύπων HPV: HPV 6/11/42/43/44 και 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Δεν ταξινομεί τους τύπους ιών εντός των ομάδων αυτών.
- Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο με τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται με χρήση της συσκευής συλλογής *digene* HC2 DNA, ή με βιοψίες που συλλέγονται σε STM, ή τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται με χρήση συσκευής συλλογής τύπου σαρώθρου ή συνδυασμού βούρτσας/σπάτουλας και τοποθετούνται σε διάλυμα PreservCyt, ή τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται σε υγρό διατήρησης SurePath. Τα δείγματα βιοψίας μπορούν να εξετάζονται μόνο εάν τοποθετούνται αμέσως σε STM και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να εξεταστούν.
- Η συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για τη συλλογή δειγμάτων από έγκυες γυναίκες.
- Η λοίμωξη με τον ιό HPV δεν συνιστά σαφή ένδειξη παρουσίας τραχηλικής νόσου υψηλού βαθμού και δεν συνεπάγεται την ανάπτυξη καρκίνου ή νόσου υψηλού βαθμού.
- Υφίσταται ένα μικρό ποσοστό διασταυρούμενου υβριδισμού μεταξύ HPV των τύπων 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8, και MM9, και του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου. Ασθενείς με δείγματα τα οποία περιέχουν υψηλά επίπεδα HPV αυτών των τύπων πιθανόν να παραπεμφθούν εσφαλμένα σε κολποσκόπηση<sup>38</sup>.
- Η δοκιμασία *digene* HC2 HPV DNA έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση τύπων HPV χαμηλού κινδύνου και 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 επίπεδα 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 HPV DNA. Η QIAGEN κατάφερε να επιβεβαιώσει την ανίχνευση αυτών των τύπων HPV μόνο σε έναν περιορισμένο αριθμό κλινικών δειγμάτων. Εξαιτίας του επιπολασμού αυτών των τύπων στον ευρύτερο πληθυσμό (κατά Bosch et. Al<sup>36</sup>.), τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA για 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 που προορίζεται για εξέταση HPV, υπάρχει πιθανότητα παραγωγής ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, εφόσον τα δείγματα αυτά περιέχουν επίπεδα HPV DNA με τιμές RLU/CO που αγγίζουν την τιμή διακοπής της δοκιμασίας.

- Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του ανιχνευτή της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA 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.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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



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

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

## ΟΔΗΓΟΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Παρατήρηση	Πιθανές αιτίες	Διαλύματα
<p><b>Παρατηρείται εσφαλμένη ή καμία χρωματική αλλαγή κατά την αποδιάταξη.</b></p>	<p>Ακατάλληλη προετοιμασία του αντιδραστήριου αποδιάταξης, ή</p> <p>δεν προστέθηκε αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p>Το δείγμα περιέχει αίμα ή άλλες ουσίες που συγκαλύπτουν την χρωματική αλλαγή.</p> <p>Το pH του δείγματος πιθανόν να είναι εξαιρετικά όξινο.</p>	<p>Βεβαιωθείτε ότι το αντιδραστήριο αποδιάταξης περιέχει το χρωματικό δείκτη και έχει σκούρο μοβ χρώμα.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι έχει προστεθεί αντιδραστήριο αποδιάταξης στο δείγμα μετρώντας τον όγκο του δείγματος (ο οποίος πρέπει να ανέρχεται σε 1,5 ml). Εάν ο όγκος υποδεικνύει ότι δεν έχει προστεθεί αντιδραστήριο αποδιάταξης, κάντε την ανάλογη προσθήκη, αναμίξτε και προχωρήστε με τη δοκιμασία, εφόσον παρατηρείται η κατάλληλη χρωματική αλλαγή.</p> <p>Η ακριβής χρωματική αλλαγή που περιγράφεται δεν αναμένεται με αυτούς τους τύπους δειγμάτων· τα αποτελέσματα της δοκιμασίας <i>digene</i> HC2 HPV DNA δεν θα πρέπει να επηρεάζονται δυσμενώς.</p> <p>Εάν δεν ισχύει καμία από τις προηγούμενες αιτίες, το δείγμα πιθανόν να είναι εξαιρετικά όξινο και η αναμενόμενη χρωματική αλλαγή δεν θα εμφανιστεί. Συλλέξτε ένα νέο δείγμα πριν από την εφαρμογή οξικού οξέος στον τράχηλο, καθώς το ακατάλληλο pH του δείγματος θα επηρεάσει δυσμενώς τα αποτελέσματα της δοκιμασίας.</p>
<p><b>Οι έλεγχοι ποιότητας παράγουν εσφαλμένα αποτελέσματα</b></p>	<p>Επιλογή λάθος πρωτοκόλλου λογισμικού για τη δοκιμασία (λ.χ. χρήση του πρωτοκόλλου CPC για τη μέθοδο δύο ανιχνευτών)</p> <p>Αντίστροφη τοποθέτηση των QC1-LR και QC2-HR</p> <p>Αντίστροφη τοποθέτηση των LRC και QC1-LR ή /και των HRC και QC1-HR.</p>	<p>Εάν το λογισμικό είναι ακατάλληλο για την εκτελούμενη δοκιμασία, το πλακίδιο πρέπει να διαβαστεί ξανά εντός 30 λεπτών από την προσθήκη του αντιδραστήριου ανίχνευσης, με το σωστό πρωτόκολλο.</p> <p>Επανεξετάστε τα δείγματα.</p> <p>Επανεξετάστε τα δείγματα.</p>
<p><b>Παρατηρείται λάθος χρωματική αλλαγή κατά τον υβριδισμό.</b></p>	<p>Ανεπαρκής ανάμειξη του μείγματος ανιχνευτών με τους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου ή/και τα δείγματα που έχουν υποβληθεί σε αποδιάταξη, ή δεν προστέθηκε μείγμα ανιχνευτών, ή προστέθηκε εσφαλμένος όγκος αντιδραστήριου.</p> <p>Το δείγμα περιέχει αίμα ή άλλες ουσίες που συγκαλύπτουν την χρωματική αλλαγή.</p> <p>Το δείγμα περιείχε &lt;1000 μl STM.</p>	<p>Ανακινήστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού ή το στατώ μικροσωληναρίων για άλλα 2 λεπτά. Εάν υπάρχουν πηγαδάκια τα οποία παραμένουν μοβ, προσθέστε επιπλέον 25 μl του κατάλληλου Μείγματος Ανιχνευτών και αναμίξτε καλά. Εάν, μετά την προσθήκη του ανιχνευτή και την εκ νέου ανάδευση, δεν εμφανιστεί η κατάλληλη χρωματική αλλαγή και εφόσον το δείγμα δεν περιείχε αίμα ή άλλες ουσίες, επανεξετάστε το δείγμα.</p> <p>Η ακριβής χρωματική αλλαγή που περιγράφεται δεν αναμένεται με αυτούς τους τύπους δειγμάτων· τα αποτελέσματα της δοκιμασίας <i>digene</i> HC2 HPV DNA δεν θα πρέπει να επηρεάζονται δυσμενώς.</p> <p>Ελέγξτε τον όγκο του αρχικού δείγματος. Ο όγκος πρέπει να ανέρχεται σε 1350 μl ±20 μl (μετά την αφαίρεση των 75 μl για τους ανιχνευτές HPV χαμηλού και υψηλού κινδύνου). Εάν ο όγκος είναι &lt;1350 μl, το αρχικό δείγμα περιείχε &lt;1000 μl STM. Προβείτε σε λήψη νέου δείγματος.</p>

Παρατήρηση	Πιθανές αιτίες	Διαλύματα
<p><b>Η δοκιμασία δεν πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης. Δεν παρατηρείται κανένα σήμα στο βαθμονομητή, στους ορούς ελέγχου ποιότητας ή στα δείγματα.</b></p>	<p>Δεν έχει προστεθεί ανιχνευτής στο αραιωτικό ανιχνευτή.</p> <p>Ο ανιχνευτής έχει μολυνθεί με ριβονουκλεάση κατά την προετοιμασία του.</p> <p>Ανεπαρκής ανάμειξη του ανιχνευτή με το αραιωτικό ανιχνευτή.</p> <p>Ανεπαρκής ανάμειξη του αραιωμένου ανιχνευτή και του δείγματος που έχει υποβληθεί σε αποδιάταξη.</p> <p>Λάθος χρόνος ή θερμοκρασία κατά το στάδιο του υβριδισμού.</p> <p>Ανεπαρκής ανάμειξη κατά το στάδιο της δέσμευσης.</p> <p>Λάθος τοποθέτηση των σωληναρίων ανιχνευτών/μειγμάτων ανιχνευτών/υβριδισμού.</p> <p>Δεν προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα αντιδραστήριου ανίχνευσης 1 ή δεν έγινε επώαση με την προκαθορισμένη διάρκεια.</p> <p>Δεν προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 ή δεν έγινε επώαση με την προκαθορισμένη διάρκεια.</p> <p>Δυσλειτουργία λουμινόμετρου ή λάθος προγραμματισμός.</p>	<p><b>Διαλύματα</b></p> <p>Προετοιμάστε τα μείγματα ανιχνευτών όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης. Επικολλήστε προσεκτικά ετικέτες στα σωληνάκια.</p> <p>Χρησιμοποιήστε ρύγχη μικροπιπέτας με φραγμό αερολύματος κατά τη μετάγγιση του ανιχνευτή και φοράτε γάντια. Χρησιμοποιείτε μόνο καθαρά, καινούρια, αναλώσιμα δοχεία αντιδραστηρίων.</p> <p>Μετά την προσθήκη του ανιχνευτή στο αραιωτικό ανιχνευτή, αναμίξτε πολύ καλά με στροβιλισμό σε μεγάλη ταχύτητα και για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα. Πρέπει να δημιουργηθεί εμφανής στρόβιλος.</p> <p>Μετά την προσθήκη του μείγματος ανιχνευτών και του δείγματος σε πηγαδάκι μικροπλακιδίου υβριδισμού ή μικροσωληνάριο, ανακινήστε με το Rotary Shaker I στη ρύθμιση 1.100 ±100 rpm για 3 ±2 λεπτά. Βεβαιωθείτε για τις χρωματικές αλλαγές από μοβ σε κίτρινο σε κάθε σωληνάριο/πηγαδάκι μικροπλακιδίου.</p> <p>Υβριδοποιήστε για 60 ±5 λεπτά σε θερμοκρασία 65 ±2°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.</p> <p>Ανακινήστε στο Rotary Shaker I για 60 ±5 λεπτά στους 20-25°C όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης. Επαληθεύστε την ταχύτητα του Rotary Shaker I με βαθμονόμηση όπως περιγράφεται στην ενότητα Βαθμονόμηση ταχύτητας της συσκευής ανακίνησης του εγχειριδίου χρήστη του Rotary Shaker I (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>).</p> <p>Παρασκευάστε τα μείγματα ανιχνευτών προσεκτικά και επικολλήστε στα σωληνάριά τους τις ανάλογες ετικέτες. Προσέχετε ώστε να προσθέτετε τους σωστούς ανιχνευτές στα σωστά σωληνάκια υβριδισμού. Επικολλήστε ετικέτες στα σωληνάκια μειγμάτων ανιχνευτών, στα σωληνάκια υβριδισμού ή/και στα στατώ, ώστε να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο λάθος τοποθέτησης.</p> <p>Μεταφέρετε 75 μl του αντιδραστήριου ανίχνευσης 1 σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα. Επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 15 έως 30 λεπτά.</p> <p>Μεταφέρετε 75 μl του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέτα. Επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 15 έως 30 λεπτά.</p> <p>Ανατρέξτε στο κατάλληλο εγχειρίδιο χρήστη για περαιτέρω οδηγίες ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της QIAGEN.</p>

Παρατήρηση	Πιθανές αιτίες	Διαλύματα
<p><b>Αυξημένες τιμές RLU στο βαθμονομητή, στους ορούς ελέγχου ποιότητας ή/και στα δείγματα (≥200 RLU σε πολλά ή όλα τα πηγαδάκια). Η δοκιμασία πιθανόν να μην πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.</b></p>	<p>Δεν προστέθηκε αντιδραστήριο αποδιάταξης· ή προστέθηκε λανθασμένος όγκος αντιδραστήριου· ή ανεπαρκής ανάμιξη του αντιδραστήριου αποδιάταξης με τα δείγματα ή τους βαθμονομητές.</p> <p>Διαρροή φωτός στο λουμινόμετρο. Η θύρα δεν σφραγίστηκε. Η ασφάλεια της θύρας έχει σπάσει.</p> <p>Μόλυνση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 ή των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης με αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 ή με εξωγενή αλκαλική φωσφατάση.</p> <p>Μολυσμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.</p> <p>Μολυσμένο Automated Plate Washer.</p> <p>Ανεπαρκής έκπλυση των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης μετά την επώαση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 1.</p> <p>Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων με αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.</p> <p>Κηλίδες διαλύματος υβριδισμού στην ίδια επιφάνεια των μαντηλιών τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχων χαρτομάντιλων χωρίς χνούδι.</p> <p>Χρήση ακατάλληλων στυπόχαρτων.</p>	<p>Βεβαιωθείτε ότι η επαναληπτική πιπέτα μεταγγίζει με ακρίβεια πριν την προσθήκη του αντιδραστήριου αποδιάταξης. Οι βαθμονομημένες πιπέτες είναι εξαιρετικά σημαντικές. Προσθέστε το μισό όγκο αντιδραστήριου αποδιάταξης σε κάθε σωληνάριο και αναμίξτε καλά. Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου. Βαθμονομητές, οροί ελέγχου ποιότητας και δείγματα πρέπει να αποκτήσουν ένα μοβ χρώμα μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου αποδιάταξης.</p> <p>Ελέγξτε τις ενδείξεις στο λουμινόμετρο διαβάζοντας ένα κενό μικροπλακίδιο. Μια τιμή μεγαλύτερη των 50 RLU υποδεικνύει ότι υπάρχει διαρροή φωτός. Ανατρέξτε στο κατάλληλο εγχειρίδιο χρήστη για περαιτέρω οδηγίες ή επικοινωνήστε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της QIAGEN.</p> <p>Ανατρέξτε στον Έλεγχο μόλυνσης στην παρούσα ενότητα της Αντιμετώπισης προβλημάτων χρήσης.</p> <p>Ανατρέξτε στον Έλεγχο μόλυνσης στην παρούσα ενότητα της Αντιμετώπισης προβλημάτων χρήσης.</p> <p>Ανατρέξτε στον Έλεγχο μόλυνσης στην παρούσα ενότητα της Αντιμετώπισης προβλημάτων χρήσης.</p> <p>Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια κάθε φορά ή χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer. Δεν πρέπει να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια μετά την έκπλυση. Ανατρέξτε στο <i>Automated Plate Washer User Manual</i> για οδηγίες σχετικά με τους ελέγχους για μόλυνση ή δυσλειτουργίες.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλες οι επιφάνειες εργασίας είναι καθαρές και στεγνές. Απαιτείται προσοχή κατά τη χρήση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 1. Αποφεύγετε τα αερολύματα.</p> <p>Μην στυπώνετε σε χρησιμοποιημένα μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι.</p> <p>Για την απορρόφηση χρησιμοποιήστε μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι.</p>

Παρατήρηση	Πιθανές αιτίες	Διαλύματα
<p><b>Χαμηλές αναλογίες PC/NC ή μεγάλος αριθμός θετικών δειγμάτων με αναλογίες &lt;2,0 (&gt;20%). Η δοκιμασία πιθανόν να μην πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.</b></p>	<p>Ακατάλληλη προετοιμασία δείγματος.</p> <p>Ανεπαρκής ανάμιξη του ανιχνευτή ή προσθήκη ανεπαρκούς ποσότητας ανιχνευτή στις δοκιμασίες.</p> <p>Προσθήκη ανεπαρκούς όγκου αραιωμένου ανιχνευτή σε κάθε μικροσωληνάριο υβριδισμού.</p> <p>Απώλεια ενέργειας του αντιδραστήριου ανίχνευσης 1.</p> <p>Ανεπαρκής δέσμευση.</p> <p>Ανεπαρκής έκπλυση.</p> <p>Μολυσμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.</p>	<p>Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο αντιδραστήριου αποδιάταξης και αναμίξτε καλά με στροβιλισμό. Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου. Για δείγματα σε διάλυμα PresenCyt, βεβαιωθείτε ότι έχει ολοκληρωθεί η κατάλληλη ανάμιξη και επαναναίωση του σφαιριδίου κυττάρων πριν την επώαση αποδιάταξης. Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης του kit μετατροπής δειγμάτων <i>digene</i> HC2 για λεπτομέρειες του πρωτοκόλλου. Θα πρέπει να είναι ορατή μια διακριτή χρωματική αλλαγή από διαυγές σε σκούρο μοβ. Επωάστε για <math>45 \pm 5</math> λεπτά στους <math>65 \pm 2^\circ\text{C}</math>.</p> <p>Παρασκευάστε τα μείγματα ανιχνευτών κατά τον τρόπο που περιγράφεται. Αναμίξτε πλήρως με στροβιλισμό, για να διασφαλίσετε ότι παράγεται εμφανής στρόβιλος. Τα μείγματα ανιχνευτών πρέπει να προστίθενται στα σωληνάρια με πιπέτα θετικής εκτόπισης ή πολυκάναλη πιπέτα προκειμένου να διασφαλιστεί η ακριβής μεταγγιση.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι η 8-κάναλη πιπέτα μεταγγίζει με ακρίβεια πριν την προσθήκη του μείγματος ανιχνευτών στο μικροπλακίδιο ή μικροσωληνάρια υβριδισμού. Προσθέστε 25 μl μείγματος ανιχνευτών σε κάθε πηγαδάκι μικροπλακιδίου ή μικροσωληνάριο που περιέχει βαθμονομητές, ορούς ελέγχου ποιότητας ή κλινικά δείγματα που έχουν υποστεί αποδιάταξη. Βεβαιωθείτε ότι η 8-κάναλη πιπέτα μεταγγίζει με ακρίβεια πριν την προσθήκη του μείγματος ανιχνευτών στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου υβριδισμού. Μετά την προσθήκη και καλή ανάμιξη του μείγματος ανιχνευτών πρέπει να παρουσιαστεί χρωματική αλλαγή από σκούρο μοβ σε κίτρινο. Τα δείγματα σε διάλυμα PresenCyt πρέπει να αποκτήσουν ροζ αντί για κίτρινο χρώμα.</p> <p>Φυλάξτε το αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 σε θερμοκρασία <math>2-8^\circ\text{C}</math>. Χρησιμοποιήστε το πριν από την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα εξωτερικής συσκευασίας του kit.</p> <p>Η διαδικασία της δέσμευσης πρέπει να εφαρμόζεται με χρήση του Rotary Shaker I στη θέση <math>1.100 \pm 100</math> rpm. Επικυρώστε την ταχύτητα της συσκευής ανακίνησης με βαθμονόμηση.</p> <p>Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια κάθε φορά ή χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer.</p> <p>Ανατρέξτε στον Έλεγχο μόλυνσης στην παρούσα ενότητα της Αντιμετώπισης προβλημάτων χρήσης.</p>
<p><b>Ακολουθίες θετικών δειγμάτων με τιμές RLU κατά προσέγγιση πανομοιότυπες.</b></p>	<p>Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης κατά το χειρισμό της δοκιμασίας.</p> <p>Μόλυνση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2.</p> <p>Δυσλειτουργία του Automated Plate Washer.</p>	<p>Καλύψτε το μικροπλακίδιο δέσμευσης σε όλα τα στάδια επώασης. Αποφύγετε την έκθεση των σωληναρίων στη μόλυνση από αερολύματα κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας. Φοράτε γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας κατά τη διάρκεια των χειρισμών.</p> <p>Προσέχετε ώστε να μη μολύνετε το απόθεμα του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 κατά τη μεταγγισή του στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης. Αποφύγετε τη μόλυνση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 με αερολύματα από το αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 ή από σκόνη του εργαστηρίου κ.λπ.</p> <p>Ανατρέξτε στο τμήμα Έλεγχος μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης προβλημάτων ή στο <i>Automated Plate Washer User Manual</i> για οδηγίες σχετικά με τους ελέγχους για μόλυνση ή δυσλειτουργίες.</p>
<p><b>Μεγάλες αποκλίσεις %CV μεταξύ των παραγόμενων αποτελεσμάτων.</b></p>	<p>Ανακριβής μεταγγιση.</p> <p>Ανεπαρκής ανάμιξη.</p> <p>Ατελής μεταφορά υγρού από τα μικροσωληνάρια υβριδισμού στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.</p> <p>Ακατάλληλες συνθήκες έκπλυσης.</p> <p>Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων με αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.</p>	<p>Ελέγξτε την πιπέτα για να διασφαλίσετε ότι μεταγγίζονται επαναλήψιμοι όγκοι. Βαθμονομήστε τακτικά τις πιπέτες.</p> <p>Αναμινύετε πλήρως σε όλα τα στάδια. Στροβιλίστε πριν την αποδιάταξη και μετά την προσθήκη του μείγματος ανιχνευτή. Βεβαιωθείτε ότι δημιουργείται εμφανής στρόβιλος.</p> <p>Απαιτείται προσοχή κατά τη διάρκεια του βήματος μεταφοράς από τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου υβριδισμού ή τα μικροσωληνάρια στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης προκειμένου να διασφαλιστεί ότι μεταφέρονται επαναλήψιμοι όγκοι.</p> <p>Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια κάθε φορά ή χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer και τα κατάλληλα πρωτόκολλα του Automated Plate Washer.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλες οι επιφάνειες εργασίας είναι καθαρές και στεγνές. Προσοχή απαιτείται κατά τη χρήση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 1. Αποφύγετε τα αερολύματα.</p>

Παρατήρηση	Πιθανές αιτίες	Διαλύματα
<p><b>Ψευδώς θετικά αποτελέσματα προκύπτουν από γνωστά ως αρνητικά δείγματα.</b></p>	<p>Μολυσμένο αντιδραστήριο ανίχνευσης 2.</p> <p>Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων με αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.</p> <p>Κατ' επανάληψη απορρόφηση στην ίδια περιοχή των Kimtowels Wipers ή αντίστοιχων χαρτομάντιλων χωρίς χνούδι.</p> <p>Ακατάλληλη προετοιμασία δείγματος.</p> <p>Ακατάλληλες συνθήκες έκπλυσης.</p> <p>Μόλυνση του ρύγχους της πιπέτας με μη-αποδιαταγμένο υλικό κατά τη μετάγγιση αποδιαταγμένου δείγματος στο μικροσωληνάριο ή πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή HPV.</p>	<p>Προσέχετε ώστε να μην επιμολύνετε τα δείγματα κατά τον υποπολλαπλασιασμό του αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 μεταξύ των δειγμάτων. Εάν χρησιμοποιείτε μόνο ένα τμήμα του kit, μεταφέρετε υποπολλαπλάσιο με τον όγκο που απαιτείται για τη συγκεκριμένη δοκιμασία σε ένα καθαρό αναλώσιμο δοχείο αντιδραστηρίων πριν γεμίσετε την πιπέτα.</p> <p>Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια κάθε φορά ή χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer. Δεν πρέπει να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου μετά την έκπλυση.</p> <p>Μην στυπώνετε σε επιφάνεια που έχει ήδη χρησιμοποιηθεί, διότι υφίσταται κίνδυνος μόλυνσης.</p> <p>Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο αντιδραστηρίου αποδιάταξης και αναμίξτε καλά με στροβιλισμό. Για να αποφύγετε ψευδή θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου είτε με τη χειροκίνητη μέθοδο είτε με τη μέθοδο MST Vortexer 2 (για τη χειροκίνητη μέθοδο vortexer, αναστρέψτε το φιαλίδιο μία φορά). Για δείγματα σε διάλυμα PreservCyt, βεβαιωθείτε ότι έχει ολοκληρωθεί η κατάλληλη ανάμιξη και επανεναιώρηση του σφαιριδίου κυττάρων πριν την επώαση αποδιάταξης. Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης του kit μετατροπής δειγμάτων <i>digene</i> HC2 για λεπτομέρειες του πρωτοκόλλου. Σε όλα τα δείγματα πρέπει να παρατηρηθεί μια εμφανής χρωματική αλλαγή σε σκούρο μοβ χρώμα. Επώαστε για 45 ± 5 λεπτά στους 65 ± 2°C. Για δείγματα SurePath, βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα επωάζονται για 90 ± 5 λεπτά στους 65 ± 2°C.</p> <p>Πλύνετε τα πηγαδάκια μικροπλακιδίου σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, υπερχειλίζοντας τα πηγαδάκια κάθε φορά ή χρησιμοποιώντας το Automated Plate Washer και τα κατάλληλα πρωτόκολλα του Automated Plate Washer.</p> <p>Το βήμα αποδιάταξης της διαδικασίας επεξεργασίας δείγματος πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες χρήσης. Τυχόν λανθασμένος στροβιλισμός δειγμάτων, αναστροφή σωληναρίων και ανακίνηση μπορεί να προκαλέσουν την ημιτελή αποδιάταξη μη-ειδικών υβριδίων RNA:DNA, ενδογενών στα τραχηλικά δείγματα. Ειδικότερα κατά τη χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt ή σε Υγρό συντήρησης SurePath, τα υβρίδια αυτά είναι πιθανό να υφίστανται στα εσωτερικά τοιχώματα του σωληναρίου αποδιάταξης δείγματος. Για την αποφυγή πιθανής μετάδοσης αυτού του μη-αποδιαταγμένου κυτταρικού υλικού, το ρύγχος της μικροπιπέτας δεν πρέπει να αγγίζει τα τοιχώματα του σωληναρίου μετατροπής δείγματος κατά τη μεταφορά του αποδιαταγμένου δείγματος στο μικροσωληνάριο ή στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή HPV.</p>
<p><b>Αυξημένες αρνητικές τιμές RLU βαθμονομητή (&gt;200 RLUs). Το υπόλοιπο της δοκιμασίας εκτελείται κανονικά.</b></p>	<p>Το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 επώαστηκε σε θερμοκρασία υψηλότερη των 20-25°C.</p> <p>Το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 επώαστηκε για χρονική διάρκεια μεγαλύτερη των 30 λεπτών.</p> <p>Το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 ή το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μολύνθηκε με αλκαλική φωσφατάση ή με αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.</p>	<p>Επανεκτελέστε τη διαδικασία και βεβαιωθείτε ότι τα βήματα δέσμευσης και ανίχνευσης επωάζονται σε θερμοκρασία 20-25°C.</p> <p>Διαβάστε το μικροπλακίδιο μετά από 15 λεπτά επώασης (και όχι πέραν των 30 λεπτών επώασης) σε θερμοκρασία 20-25°C.</p> <p>Ανατρέξτε στον Έλεγχο μόλυνσης στην παρούσα ενότητα της Αντιμετώπισης προβλημάτων χρήσης.</p>
<p><b>Η δοκιμασία δεν πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης. Αυξημένη αναλογία PC/NC</b></p>	<p>Αντίστροφη τοποθέτηση των HRC και QC2-HR ή /και των LRC και QC1-LR.</p>	<p>Επανεξετάστε τα δείγματα. Για να αποτρέψετε την αντίστροφη τοποθέτηση των παραπάνω αντιδραστηρίων, διαβάστε προσεκτικά τις επικέτες στα φιαλίδια του βαθμονομητή και του ορού ελέγχου ποιότητας.</p>

## ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Αξιολογούμενο αντιδραστήριο	Διαδικασία ελέγχου μόλυνσης	Ερμηνεία των αποτελεσμάτων
-----------------------------	-----------------------------	----------------------------

<b>Σημείωση:</b> Απαιτείται προσοχή κατά τη μεταφορά με πιπέτα του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 για να αποφεύγετε τη μόλυνση. Να φοράτε γάντια και μην ακουμπάτε τα ρύγχη των πιπέτων σε οποιαδήποτε επιφάνεια εργασίας.		
<b>Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Σε ένα κενό πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμευσης μεταφέρετε 75 μl από το υποπολλαπλασιασμένο, υπολειπόμενο ή/και αρχικό φιαλίδιο του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2.</li> <li>Επλώστε στους 20-25°C για 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.</li> <li>Διαβάστε τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου σε ένα λουμινόμετρο.</li> </ul> <p><b>Σημείωση:</b> Η εξέταση του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε επαναλήψεις των 3 προσφέρει τη βέλτιστη αποτίμηση της απόδοσης.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο ορός ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 πρέπει να είναι &lt; 50 RLU.</li> <li>Εάν οι τιμές του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 είναι &lt; 50 RLU, το αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επανάληψη της δοκιμασίας.</li> <li>Εάν έχει μολυνθεί (&gt;50 RLU), προμηθευτείτε ένα νέο kit και επαναλάβετε τη δοκιμασία.</li> </ul>
<b>Συσκευή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ή/και πηγή νερού</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε 4 ξεχωριστά πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.</li> <li>Επισημάνετε τα πηγαδάκια 1-4.</li> <li>Το πηγαδάκι 1 χρησιμεύει ως ορός ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2.</li> <li>Μεταφέρετε 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τον υδροβολέα στο πηγαδάκι 2.</li> <li>Αφήστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης να κινηθεί μέσω των σωληνώσεων του συστήματος έκπλυσης.</li> <li>Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τη σωλήνωση στο πηγαδάκι 3.</li> <li>Λάβετε ένα υποπολλαπλάσιο του νερού που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης. Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl του νερού στο πηγαδάκι 4.</li> <li>Επλώστε στους 20-25°C για 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.</li> <li>Διαβάστε τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου σε ένα λουμινόμετρο.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο ορός ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1) πρέπει να είναι &lt; 50 RLU.</li> <li>Συγκρίνετε την τιμή RLU από τα πηγαδάκια 2, 3 και 4 με την τιμή RLU του ορού ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1). Οι μεμονωμένες τιμές RLU για τα πηγαδάκια 2, 3 και 4 δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 50 RLU της τιμής RLU του ορού ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1).</li> <li>Τιμές που υπερβαίνουν τα 50 RLU του ορού ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 δηλώνουν λοίμωξη. Για οδηγίες σχετικά με τον καθαρισμό και τη συντήρηση της συσκευής έκπλυσης ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων.</li> </ul>
<b>Automated Plate Washer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε 5 ξεχωριστά πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.</li> <li>Επισημάνετε τα πηγαδάκια 1-5.</li> <li>Το πηγαδάκι 1 χρησιμεύει ως ορός ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2.</li> <li>Μεταφέρετε 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από τον υδροβολέα του συστήματος έκπλυσης πλακιδίων με την επισήμανση <i>WASH</i> (έκπλυση) στο πηγαδάκι 2.</li> <li>Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl του υγρού ξεπλύματος από τον υδροβολέα του συστήματος έκπλυσης πλακιδίων με την επισήμανση <i>RINSE</i> (ξέπλυμα) στο πηγαδάκι 3.</li> <li>Πιέστε το πλήκτρο <i>PRIME</i> (πλήρωση) στο πληκτρολόγιο του συστήματος έκπλυσης μικροπλακιδίων, αφήνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης να διατρέξει τις γραμμές.</li> <li>Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από το αυλάκι στο πηγαδάκι 4.</li> <li>Πιέστε το πλήκτρο <i>RINSE</i> στο πληκτρολόγιο του συστήματος έκπλυσης πλακιδίων, αφήνοντας το υγρό ξεπλύματος να διατρέξει τις γραμμές.</li> <li>Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από το αυλάκι στο πηγαδάκι 5.</li> <li>Καλύψτε και επλώστε για 15 λεπτά στους 20-25°C. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.</li> <li>Διαβάστε τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου σε ένα λουμινόμετρο.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο ορός ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1) πρέπει να είναι &lt; 50 RLU.</li> <li>Συγκρίνετε την τιμή RLU από τα πηγαδάκια 2, 3, 4 και 5 με την τιμή RLU του ορού ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1). Οι μεμονωμένες τιμές RLU για τα πηγαδάκια 2, 3, 4 και 5 δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 50 RLU της τιμής RLU του ορού ελέγχου του αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1).</li> <li>Τιμές που υπερβαίνουν τα 50 RLU του ορού ελέγχου του DR2 δηλώνουν μόλυνση του συστήματος έκπλυσης μικροπλακιδίων.</li> <li>Ανατρέξτε στο <i>Automated Plate Washer User Manual</i>, Διαδικασία απολύμανσης.</li> </ul>



Χρησιμοποιήστε το φύλλο πληροφοριών επικοινωνίας που συνοδεύει αυτό το προϊόν για να επικοινωνήσετε με τον τοπικό σας αντιπρόσωπο της QIAGEN.

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

Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται ως 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:

**Αριθμοί διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας HPV των Η.Π.Α.**

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

**Αριθμός διπλώματος ευρεσιτεχνίας Hybrid Capture των Η.Π.Α.**

6,228,578 B1



# Σύνοψη της δοκιμασίας *digene* HC2 HPV DNA

**ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ:** Είναι σημαντικό να είστε πλήρως εξοικειωμένοι με τη λεπτομερή διαδικασία πριν χρησιμοποιήσετε αυτή την σύνοψη.

## Διαδικασία

	<b>Μέθοδος στροβιλισμού με το χέρι</b>	<b>Μέθοδος Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2</b>
<b>ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ</b> (Για δείγματα σε διάλυμα PreservCyt, ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του κιτ μετατροπής δειγμάτων <i>digene</i> HC2)	<p>Επικολλήστε ετικέτες στα μικροσωληνάρια υβριδισμού. Παρασκευάστε αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p>↓</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ορούς ελέγχους ποιότητας και δείγματα.</p> <p>Αναδεύστε σε αναδευτήρα τύπου vortex κάθε δείγμα, βαθμονομητή και ορό ελέγχου ποιότητας για 5 δευτερόλεπτα, σε υψηλή ταχύτητα (ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης για λεπτομέρειες).</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p>↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτών HPV.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Επικολλήστε ετικέτα στο μικροπλακίδιο υβριδισμού. Παρασκευάστε αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p>↓</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ορούς ελέγχους ποιότητας και δείγματα.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p>↓</p> <p>Καλύψτε το στατώ με μεμβράνη και καπάκι.</p> <p>↓</p> <p>Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα.</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p>↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτών HPV.</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
<b>ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ</b>  <b>Μέθοδος μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών</b>  <b>Μέθοδος δύο ανιχνευτών</b>	<p><b>Μέθοδος υδατόλουτρου</b></p> <p>Αναμίξτε καλά το δείγμα που έχει υποστεί αποδιάταξη και μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl στα σωληνάρια.</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20-25°C</p> <p>↓</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα 25 μl μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών μέσα στα μικροσωληνάρια υβριδισμού.</p> <p>↓</p> <p>Ή</p> <p>Αναμίξτε καλά το δείγμα που έχει υποστεί αποδιάταξη και μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl στα σωληνάρια «LR».</p> <p>Αναμίξτε καλά το δείγμα που έχει υποστεί αποδιάταξη και μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl στα σωληνάρια «HR».</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20-25°C</p> <p>↓</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα 25 μl μείγματος ανιχνευτών HPV χαμηλού κινδύνου στα σωληνάρια «LR».</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα 25 μl μείγματος ανιχνευτών HPV υψηλού κινδύνου στα σωληνάρια «HR».</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Καλύψτε τα μικροσωληνάρια με το σφραγιστικό μικροπλακιδίου και ανακινήστε με το Rotary Shaker I στη θέση 1.100 ±100 rpm για 3 ±2 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια παρουσιάζουν κίτρινο χρώμα.</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 60 ±5 λεπτά. Ετοιμάστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p><b>Μέθοδος Microplate Heater I</b></p> <p>Αναμίξτε το αποδιαταγμένο δείγμα καλά και μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl μέσα στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου.</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20-25°C</p> <p>↓</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα 25 μl μείγματος συνδυασμού ανιχνευτών μέσα στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου υβριδισμού.</p> <p>↓</p> <p>Ή</p> <p>Αναμίξτε καλά το δείγμα που έχει υποστεί αποδιάταξη και μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου «LR» και 75 μl στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου «HR».</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20-25°C</p> <p>↓</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα 25 μl του ανιχνευτή HPV χαμηλού κινδύνου στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου «LR».</p> <p>Μεταφέρετε με πιπέτα 25 μl του ανιχνευτή HPV υψηλού κινδύνου στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου «HR».</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Καλύψτε τα μικροσωληνάρια με το κάλυμμα μικροπλακιδίου και ανακινήστε με το Rotary Shaker I στη θέση 1.100 ±100 rpm για 3 ±2 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια παρουσιάζουν κίτρινο χρώμα.</p> <p>↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 60 ±5 λεπτά. Ετοιμάστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης.</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
<b>ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ</b>	<p>Μεταφέρει τα περιεχόμενα από κάθε πηγαδάκι του πλακιδίου υβριδισμού στο αντίστοιχο πηγαδάκι στο μικροπλακίδιο δέσμευσης χρησιμοποιώντας 8-κάναλη πιπέτα.</p> <p>Καλύψτε με ένα καπάκι ή κάλυμμα μικροπλακιδίου.</p> <p>Ανακινήστε στη θέση 1100 ±100 rpm σε θερμοκρασία 20-25°C για 60 ±5 λεπτά. Παρασκευάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.</p> <p>↓</p> <p>Μεταγγίστε και στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης (ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης για λεπτομέρειες).</p> <p>↓</p>	
<b>ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ</b>	<p>Μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμευσης.</p> <p>Καλύψτε το μικροπλακίδιο δέσμευσης με καπάκι μικροπλακιδίου, Parafilm ή αντίστοιχο υλικό.</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 30 - 45 λεπτά. Εκπλύνετε το μικροπλακίδιο με τη μέθοδο που επιθυμείτε.</p> <p>↓</p>	
<b>ΕΚΠΛΥΣΗ</b>	<b>Μέθοδος χειροκίνητης έκπλυσης</b>	<b>Μέθοδος Automated Plate Washer</b>
	<p>Μεταγγίστε και στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης (ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης για λεπτομέρειες).</p> <p>↓</p> <p>Εκπλύνετε 6 φορές.</p> <p>↓</p> <p>Στυπώστε σε χαρτομάντιλα χωρίς χνούδι</p> <p>↓</p>	<p>Τοποθετήστε το πλακίδιο στη συσκευή έκπλυσης και πατήστε «START/STOP» για να ξεκινήσει η διαδικασία.</p> <p>↓</p> <p>Προχωρήστε στο επόμενο βήμα.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
<b>ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗ</b>	<p>Μεταφέρετε με πιπέτα 75 μl αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμευσης.</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 15-30 λεπτά.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Διαβάστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης χρησιμοποιώντας ένα όργανο DML.</p> <p>↓</p> <p>Επαληθεύστε τη δοκιμασία και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα των δειγμάτων.</p>	