

Μόνο για Επαγγελματική Χρήση



We build using DNA:  
the molecule of life



REF UBM0013

Sagitta™

## HPV Selfy HR

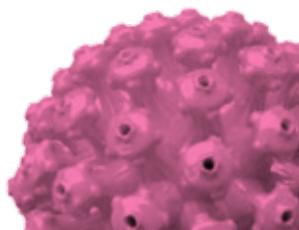
### ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Πολλαπλή δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του γονότυπου 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου από δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος, κολπικού επιχρίσματος και τραχηλικού δείγματος κυτταρολογίας υγρής φάσης.

14 Γονότυποι HPV υψηλού κινδύνου:

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

 **ΥΨΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ & ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ**  
Πολλαπλή PCR πραγματικού χρόνου με υψηλή ευαίσθησία  
και εξειδίκευση με τη χρήση της καποχυρωμένης με δηπλωμα  
ευρεσπεχνίας τεχνολογίας SAGITTA™



## **Έκδοση 8 – Ιανουάριος 2024**

### **ΑΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΥΘΥΝΗΣ**

Πνευματικά δικαιώματα © 2024 της Ulisse Biomed S.p.A.

Όλα τα δικαιώματα κατοχυρωμένα. Κανένα μέρος της παρούσας έκδοσης δεν επιτρέπεται να αναπαραχθεί, να διανεμηθεί ή να μεταδοθεί με οποιαδήποτε μορφή ή μέσο, συμπεριλαμβανομένων φωτοαντιγράφων, ηχογραφήσεων ή άλλων ηλεκτρονικών ή μηχανικών μεθόδων, χωρίς την προηγούμενη γραπτή άδεια του εκδότη. Για αιτήματα χορήγησης άδειας αναπαραγωγής, επικοινωνήστε με την Ulisse Biomed S.p.A., απευθυνόμενοι "Προς: Συντονιστή Εξουσιοδότησης", στη διεύθυνση της εταιρείας.

Η Ulisse Biomed S.p.A. διατηρεί το δικαίωμα να τροποποιεί τα προϊόντα και τις υπηρεσίες της ανά πάσα στιγμή. Το παρόν εγχειρίδιο οδηγιών μπορεί να αλλάξει χωρίς προειδοποίηση. Αν και έχει προετοιμαστεί για την διασφάλιση ακρίβειας, η Ulisse Biomed S.p.A. δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για λάθη ή για τυχόν ζημίες που προκύπτουν από την εφαρμογή ή τη χρήση αυτών των πληροφοριών.

### **ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ**

Τα καταχωρημένα εμπορικά σήματα που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο, ακόμη και αν δεν αναφέρεται ρητά, πρέπει να θεωρούνται προστατευόμενα από το νόμο. Αυτό το προϊόν και η χρήση του καλύπτονται από πολλαπλά διπλώματα ευρεσιτεχνίας της Ulisse Biomed S.p.A.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Περιγραφή προϊόντος.....</b>	<b>4</b>
Προβλεπόμενη χρήση .....	4
Επισκόπηση αρχών και διαδικασιών .....	4
Αποθήκευση και χειρισμός .....	5
Παρεχόμενα υλικά .....	5
Απαιτούμενα αλλά όχι παρεχόμενα υλικά .....	6
Προτεινόμενα υλικά.....	7
<b>2. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις .....</b>	<b>8</b>
Γενικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	8
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για τις διαδικασίες μοριακής βιολογίας.....	8
<b>3. Πρωτόκολλο .....</b>	<b>9</b>
Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων.....	9
Διαδικασία για CFX96 <sup>TM</sup> , QuantStudio <sup>TM</sup> 5, Agilent AriaDx .....	10
Διαδικασία για ELITe InGenius <sup>®</sup> .....	18
Διαδικασία για HYRIS bCUBE <sup>TM</sup> .....	32
<b>4. Όρια.....</b>	<b>44</b>
<b>5. Επίδοση προϊόντος.....</b>	<b>45</b>
Αναλυτική ευαισθησία .....	45
Αναλυτική εξειδίκευση (διασταυρούμενη αντιδραστικότητα).....	45
Παρεμβολές .....	46
Αναλυτική αναπαραγωγιμότητα .....	46
Αναλυτική επαναληψιμότητα .....	46
Κλινική επίδοση .....	46
Ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα .....	46
Δυνατότητα γονοτύπωσης .....	47
Βιβλιογραφία .....	47
<b>6. Επεξήγηση συμβόλων.....</b>	<b>48</b>
<b>7. Επικοινωνία.....</b>	<b>49</b>

## 1. Περιγραφή προϊόντος

### Προβλεπόμενη χρήση

Το "HPV Selfy HR" είναι ένα *in vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν (IVD) που προορίζεται για την ποιοτική πολλαπλή ανίχνευση και διαφοροποίηση νουκλεϊκών οξέων από 14 ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων υψηλού κινδύνου (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR) σε πραγματικό χρόνο από δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος, κολπικού επιχρίσματος και τραχηλικά δείγματα κυτταρολογίας υγρής φάσης.

Το προϊόν προορίζεται για επαγγελματική χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση των λοιμώξεων από τον ίο των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), σε συνδυασμό με τα κλινικά δεδομένα του ασθενούς και τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων.

Τα θετικά αποτελέσματα υποδεικνύουν την παρουσία DNA ενός ή περισσότερων από τους 14 τύπους HPV, αλλά δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την παρουσία βακτηριακής λοίμωξης ή συλλοίμωξης με άλλους ιούς, συμπεριλαμβανομένων άλλων ογκογόνων ή μη ογκογόνων τύπων HPV.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη λοίμωξη από HPV και, επομένως, το HPV Selfy HR δεν μπορεί να είναι το μοναδικό διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση πιθανών θεραπειών και του προσυμπτωματικού ελέγχου. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να συνδυάζονται με κλινικές παρατηρήσεις, το ιστορικό του ασθενούς και με επιδημιολογικές πληροφορίες.

### Επισκόπηση αρχών και διαδικασιών

Η δοκιμή HPV Selfy HR βασίζεται στην κατοχυρωμένη τεχνολογία SAGITTA της Ulisse Biomed, η οποία επιτρέπει τη ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε ένα μόνο κανάλι φθορισμού σε όργανα PCR πραγματικού χρόνου με ανάλυση καμπύλης τήξης.

Το HPV Selfy HR είναι μια πολλαπλή δοκιμή PCR πραγματικού χρόνου που επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση, ανίχνευση και διαφοροποίηση των νουκλεϊκών οξέων-στόχων 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), καθώς και του εσωτερικού μάρτυρα (IC-Internal Control).

Το HPV Selfy HR εκτελεί την αντίδραση ενίσχυσης ξεκινώντας από DNA που εκχυλίζεται από κάθε υπό εξέταση δείγμα. Το HPV Selfy HR είναι επίσης συμβατό με μη καθαρά δείγματα μετά από προεπεξεργασία με Ulisse Faster DNA (Ulisse Biomed, S.p.A., κωδικός #UBM0014, δεν περιλαμβάνεται στο παρόν κιτ), ένα αντιδραστήριο που επιτρέπει την αποφυγή της εκχύλισης DNA.

Ένας εσωτερικός μάρτυρας (IC) είναι ενσωματωμένος στο προϊόν ως ενδογενής έλεγχος ολόκληρης της διαδικασίας, προκειμένου να παρακολουθείται η απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων και να ελέγχεται η πιθανή αναστολή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ο IC ενισχύεται ταυτόχρονα με τα νουκλεϊκά οξέα- στόχους. Το HPV Selfy HR χρησιμοποιεί την ανθρώπινη β-σφαιρίνη ως ενδογενή εσωτερικό μάρτυρα ο οποίος μπορεί να εξασφαλίσει τον καθαρισμό του DNA, την επαλήθευση της αντίδρασης PCR και την εξακρίβωση της επάρκειας των κυττάρων από κάθε δείγμα.

Η δοκιμή HPV Selfy HR αποτελείται από δύο αντιδράσεις PCR:

- η πρώτη επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση του DNA-στόχου 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου (HR HPV PCR Mix),
- η δεύτερη επιτρέπει την ενίσχυση του DNA-στόχου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (β-globin PCR Mix).

Στην αντίδραση PCR, η αποτελεσματικότητα μπορεί να μειωθεί από αναστολές που ενδέχεται να υπάρχουν στα κλινικά δείγματα.

## Αποθήκευση και χειρισμός

Τα περιεχόμενα του HPV Selfy HR πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία μεταξύ -25 °C και -15 °C, σε όρθια θέση και μακριά από το φως. Όλα τα περιεχόμενα είναι σταθερά υπό τις συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Θα πρέπει να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και κατάψυξη, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ευαισθησίας. Το HPV Selfy HR μπορεί να καταψυχθεί και να αποψυχθεί έως 6 φορές· περαιτέρω κύκλοι κατάψυξης/απόψυξης ενδέχεται να προκαλέσουν μείωση της επίδοσης του προϊόντος. Εάν τα αντιδραστήρια πρόκειται να χρησιμοποιηθούν μόνο κατά διαστήματα, θα πρέπει να καταψύχονται σε αριθμητικά ίσα φιαλίδια/κλάσματα (aliquots) τα οποία δεν περιέχουν ριβονουκλεάση ή δεοξυριβονουκλεάση (RNase/DNase free tubes).

## Παρεχόμενα υλικά

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται σε ένα κιτ HPV Selfy HR (Ulisse Biomed, S.p.A., κωδικός #UBM0013-050) επαρκούν για 18 εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων, σε βέλτιστες συνθήκες κατανάλωσης αντιδραστηρίων (τουλάχιστον 3 εξετάσεις ανά συνεδρία) όταν χρησιμοποιούνται με το σύστημα ELITe InGenius®.

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται σε ένα κιτ HPV Selfy HR (Ulisse Biomed, S.p.A., κωδικός #UBM0013-050) επαρκούν για 50 αναλύσεις σε συνδυασμό με άλλα συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων.

HPV Selfy HR ( REF UBM0013-050)			
Περιεχόμενα	Όγκος	Περιγραφή	Χρώμα
HR HPV Mix (HR HPV μίγμα)	1 X 0,35 mL	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει συνθετικό DNA για την ειδική ενίσχυση 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου.	Κίτρινο
β-globin Mix (Μίγμα β σφαιρινών)	1 X 0,35 mL	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει συνθετικό DNA για την ειδική ενίσχυση της β σφαιρίνης.	Ροζ
Reaction Mix (Μίγμα αντίδρασης) (DNA)	1 X 1,50 mL	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει παράγοντες ενίσχυσης και ανίχνευσης.	Άσπρο
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1 X 0,10 mL	Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου 25mM.	Πράσινο
Θετικός μάρτυρας HPV	1 X 0,20 mL	Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει κομμάτια συνθετικού DNA των HPV και β-σφαιρίνη (5.000 αντίγραφα/μl).	Κόκκινο
Αρνητικός μάρτυρας	1 X 0,20 mL	Νερό για βιολογική χρήση (Molecular-biological grade water - MBG νερό).	Άσπρο

## **Απαιτούμενα αλλά όχι παρεχόμενα υλικά**

### **Α. Υλικά που απαιτούνται για κάθε συμβατό σύστημα:**

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται για τη χρήση του HPV Selfy HR σε κάθε συμβατό σύστημα:

- MBG νερό χωρίς RNase και DNase.
- Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (βλ. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων).
- Σωληνάρια πολυπροπυλενίου με πώμα 1,5 mL και 5 mL, αποστειρωμένα, χωρίς RNάση και DNάση.
- Βαθμονομημένες πιπέτες ακριβείας με δυνατότητα διανομής 2-20 μl (διαβάθμιση 0,1-0,2 μl), 20-200 μl (διαβάθμιση 0,1-0,2 μl) και 100-1.000 μl (διαβάθμιση 1-2 μl).
- Αποστειρωμένα ακροφύσια με φίλτρο, χαμηλής κατακράτησης anti-aerosol, μιας χρήσης, για πιπέτες ακριβείας 2-20 μl, 20-200 μl και 100-1.250 μl, χωρίς νουκλεάση.
- Επιτραπέζιος φυγοκεντρωτής.
- Αναμίκτης περιδίνησης (vortex mixer).
- Βιολογικός απαγωγός με νηματική ροή κλάσης II.
- CFX96™ Real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.), QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc.), AriaDx Real-time PCR System (Agilent Technologies, Inc.), ELITe InGenius® (ELITechGroup, S.p.A.), ή HYRIS bCUBETM (HYRIS, S.r.l.) βαθμονομημένα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Πάγος.
- Γάντια μίας χρήσης από νιτρίλιο χωρίς πούδρα, ή από παρόμοιο υλικό, και κατάλληλος ατομικός προστατευτικός εξοπλισμός.

### **Β. Απαιτούμενα υλικά για το CFX96™ Real-time PCR detection (σύστημα ανίχνευσης PCR πραγματικού χρόνου) (Bio-Rad Laboratories, Inc.)**

Για χρήση του οργάνου CFX96™ Real-time PCR detection (Bio-Rad Laboratories, Inc.) απαιτούνται τα ακόλουθα υλικά:

- Multiplate™ 96-Well PCR Plates (PCR πλάκες 96 θέσεων), χαμηλού προφίλ, χωρίς πλευρικό κάλυμμα, διαφανείς, (Bio-Rad Laboratories, Inc.; κωδικός #MLL9601).
- Microseal 'A' Film (Bio-Rad Laboratories, Inc.; κωδικός #MSA5001), Microseal 'B' Film (Bio-Rad Laboratories, Inc.; κωδικός #MSB5001) ή Microseal 'C' Film (Bio-Rad Laboratories, Inc.; κωδικός #MSC5001).
- 1x φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS)

### **Γ. Απαιτούμενα υλικά για το QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (σύστημα PCR πραγματικού χρόνου) (Applied Biosystems, Inc.)**

Για χρήση του οργάνου QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (συστήματος PCR πραγματικού χρόνου) (Applied Biosystems, Inc.) απαιτούνται τα ακόλουθα υλικά:

- MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Πλάκα αντίδρασης) (Applied Biosystems, Inc.; κωδικός #N8010560).
- MicroAmp™ Optical Adhesive Film (αυτοκόλλητη μεμβράνη στεγανοποίησης) (Applied Biosystems, Inc.; κωδικός #4311971).
- 1x φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

### **Δ. Απαιτούμενα υλικά για το AriaDx Real-time PCR System (σύστημα PCR πραγματικού χρόνου) (Agilent Technologies, Inc.)**

Για χρήση του οργάνου AriaDx Real-time PCR System (Agilent Technologies Inc.) απαιτούνται τα ακόλουθα υλικά:

- PCR πλάκες 96 θέσεων, με πλευρικό κάλυμμα και χαμηλού προφίλ (Agilent Technologies, Inc.; κωδικός #401490).
- Αυτοκόλλητες ταινίες/μεμβράνες στεγανοποίησης πλακών (Agilent Technologies, Inc.; κωδικός #401492).
- 1x φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

## **E. Απαιτούμενα υλικά για το σύστημα ανίχνευσης ELITe InGenius® (ELITechGroup S.p.A.)**

Για χρήση του οργάνου ELITe InGenius® (ELITechGroup, S.p.A) απαιτούνται τα ακόλουθα υλικά:

- Extraction cartridges (Φυσίγγια εκχύλισης) "ELITe InGenius® SP 200" (ELITechGroup, S.p.A.; κωδικός #INT032SP200).
- Αναλώσιμα για την εκχύλιση "ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set" (ELITechGroup, S.p.A.; κωδικός #INT032CS).
- Φυσίγγια ενίσχυσης "ELITe InGenius® PCR Cassette" (ELITechGroup, S.p.A.; κωδικός #INT035PCR).
- Ρύγχη (tips) "300 μL Filter tips Axygen" (Axygen BioScience, Inc.; κωδικός #TF-350-L-R-S),
- Δοχεία "ELITe InGenius® Waste Box" (ELITechGroup, S.p.A.; κωδικός #F2102-000).
- Sarstedt™ Micro Tube 2 mL με βιδωτό πώμα (Sarstedt, AG & Co.; κωδικός #72.694.006).
- Sarstedt™ Micro Tube 0,5 mL με βιδωτό πώμα (Sarstedt, AG & Co.; κωδικός #72.730.005).

Επιπλέον, είναι απαραίτητα τα ακόλουθα ειδικά Πρωτόκολλα Δοκιμών (ELITechGroup, S.p.A.):

- Πρωτόκολλα ανάλυσης για την ενίσχυση του θετικού μάρτυρα "Ulisse HPV Mix\_PC\_00" και "Assay\_Ulisse Bglobin Mix\_PC\_00".
- Πρωτόκολλα ανάλυσης για την ενίσχυση του αρνητικού μάρτυρα "Ulisse HPV Mix\_NC\_00" και "Assay\_Ulisse Bglobin Mix\_NC\_00".
- Πρωτόκολλα ανάλυσης για τα προς ανάλυση δείγματα "Ulisse HPV Mix\_CYT\_200\_200\_00", "Ulisse HPV Mix\_CS\_200\_200\_00", "Ulisse Bglobin Mix\_CYT\_200\_200\_00" και "Ulisse Bglobin Mix\_CS\_200\_200\_00".

## **Z. Απαιτούμενα υλικά για το HYRIS bCUBE™ (HYRIS, S.r.l.)**

Για χρήση του οργάνου HYRIS bCUBE™ (HYRIS, S.r.l.) απαιτούνται τα ακόλουθα υλικά:

- Φυσίγγια 16 ή 36 κοιλωμάτων για HYRIS bCUBE™ με αυτοκόλλητες ταινίες/μεμβράνες στεγανοποίησης πλακών (HYRIS, S.r.l.; κωδικός #HyCT16.01 ή #HyCT36.01).
- HYRIS bAPP™: μια διεπαφή χρήστη web συμβατή με smartphone, tablet, φορητούς υπολογιστές και υπολογιστές οποιασδήποτε μάρκας και μοντέλου.
- 1x φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

## **Προτεινόμενα υλικά**

Τα εξωτερικά θετικά στοιχεία ελέγχου διατίθενται από τη Microbix Biosystems Inc (<https://microbix.com/home.php>). Αυτοί οι έλεγχοι αποτελούνται από αδρανοποιημένα ολόκληρα γονιδιώματα του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) υψηλού κινδύνου και ανθρώπινα κύτταρα σε 1 mL συντηρητικού διαλύματος. Πριν από τη χρήση, κάθε μάρτυρας 1 ml θα πρέπει να συνδυάζεται με 3 mL προεπιλεγμένων, HPV αρνητικών υγρών κυτταρολογικών δειγμάτων. Τα διαθέσιμα θετικά στοιχεία ελέγχου περιλαμβάνουν:

- Microbix REDx™ HPV 16 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-16)
- Microbix REDx™ HPV 18 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-18)
- Microbix REDx™ HPV 31 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-31)
- Microbix REDx™ HPV 33 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-33)
- Microbix REDx™ HPV 45 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-45)
- Microbix REDx™ HPV 51 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-51)
- Microbix REDx™ HPV 66 Θετικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-62-66)
- Microbix REDx™ HPV Αρνητικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός RED-99-M1)
- Microbix REDx™ HPV hr-HPV Αρνητικός μάρτυρας (Microbix Biosystems Inc., κωδικός no. RED-62-67)

## 2. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Το προϊόν αυτό έχει σχεδιαστεί αποκλειστικά για in-vitro χρήση.

### Γενικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Να χειρίζεστε και να απορρίπτετε όλα τα βιολογικά δείγματα ως μολυσματικά. Αποφεύγετε την άμεση επαφή με τα βιολογικά δείγματα. Αποφεύγετε το ράντισμα ή τον ψεκασμό. Τα υλικά που έρχονται σε επαφή με τα βιολογικά δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία για τουλάχιστον 30 λεπτά με υποχλωριώδες νάτριο 3% ή να αποστειρώνονται σε κλίβανο για μία ώρα στους 121 °C πριν από την απόρριψη.
- Να χειρίζεστε και να απορρίπτετε όλα τα αντιδραστήρια και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη διενέργεια της ανάλυσης ως μολυσματικά. Αποφεύγετε την άμεση επαφή με τα αντιδραστήρια. Αποφεύγετε το ράντισμα ή τον ψεκασμό. Τα απόβλητα πρέπει να χειρίζονται και να απορρίπτονται σύμφωνα με τα κατάλληλα πρότυπα ασφαλείας.
- Να φοράτε κατάλληλα προστατευτικά ρούχα και γάντια, προστατεύετε τα μάτια και το πρόσωπο σας.
- Ποτέ μην αναρροφάτε διαλύματα με το στόμα.
- Μην τρώτε, μην πίνετε, μην καπνίζετε και μην εφαρμόζετε καλλυντικά προϊόντα στους χώρους εργασίας.
- Πλένετε προσεκτικά τα χέρια σας μετά το χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων.
- Να απορρίπτετε τα υπολειπόμενα αντιδραστήρια και τα απόβλητα σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.
- Διαβάστε προσεκτικά όλες τις οδηγίες που συνοδεύουν το προϊόν πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης.
- Κατά την εκτέλεση της ανάλυσης, ακολουθήστε τις οδηγίες που συνοδεύουν το προϊόν.
- Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν μετά την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.
- Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν εάν, κατά την παραλαβή, η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά ή η σφραγίδα είναι σπασμένη.
- Χρησιμοποιείτε μόνο τα αντιδραστήρια που παρέχονται με το προϊόν και αυτά που συνιστώνται από τον κατασκευαστή.
- Μην συγκεντρώνετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες ή από διαφορετικά σωληνάρια της ίδιας παρτίδας.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών.

### Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για τις διαδικασίες μοριακής βιολογίας

- Οι διαδικασίες μοριακής βιολογίας απαιτούν εξειδικευμένο και εκπαιδευμένο προσωπικό για να αποφευχθεί ο κίνδυνος εσφαλμένων αποτελεσμάτων, ιδίως λόγω της αποικοδόμησης των νουκλεϊκών οξέων που περιέχονται στα δείγματα ή της επιμόλυνσης του δείγματος από προϊόντα ενίσχυσης.
- Εργαστηριακές ποδιές, γάντια και εξοπλισμός αποκλειστικά για την εκτέλεση της δοκιμής είναι απαραίτητα.
- Τα δείγματα πρέπει να είναι κατάλληλα και, αν είναι δυνατόν, ειδικά για αυτόν τον τύπο ανάλυσης. Τα δείγματα πρέπει να χειρίζονται κάτω από απαγωγό νηματικής ροής. Οι πιπέτες που χρησιμοποιούνται για το χειρισμό των δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για το συγκεκριμένο σκοπό.
- Τα φυσίγγια ή οι πλάκες PCR πρέπει να χειρίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνεται όσο το δυνατόν περισσότερο η διασπορά του προϊόντος ενίσχυσης στο περιβάλλον, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση του δείγματος και των αντιδραστηρίων.
- Κατά την εκτέλεση της ανάλυσης, ακολουθήστε τις οδηγίες που περιέχονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο για τον ίο των ανθρώπινων θηλωμάτων, δημοσιευμένο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

### 3. Πρωτόκολλο

#### Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων

##### A. Συλλογή Δειγμάτων

###### Τραχηλικό δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης

Το τραχηλικό δείγμα που συλλέγεται σε μέσο ThinPrep® με ενδοτραχηλική ψήκτρα/σπάτουλα έχει επικυρωθεί για χρήση με το HPV Selfy HR. Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για τη συλλογή τραχηλικού δείγματος.

###### Δείγμα τραχηλικού επιχρίσματος

Για τη συλλογή δείγματος τραχηλικού επιχρίσματος, χρησιμοποιήστε τα ακόλουθα υλικά σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

- FLOQSwab® με κωνικό άκρο 80 mm (Copan Italia, S.p.A.; κωδικός #52980C) για τη συλλογή ενδο-οισοτραχηλικών δειγμάτων η οποία πραγματοποιείται από ιατρό.

###### Δείγμα κολπικού επιχρίσματος

Για την αυτοσυλλογή δείγματος κολπικού επιχρίσματος, χρησιμοποιήστε τα ακόλουθα υλικά σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- FLOQSwab® regular plus, με στρογγυλεμένο άκρο, αποκολλούμενο barcode, χωρίς σημείο θραύσης (Copan Italia, S.p.A.; κωδικός #5E046S) για αυτοσυλλογή κολπικών δειγμάτων.

##### B. Αποθήκευση δειγμάτων

Η ευαίσθησία της ανάλυσης μπορεί να μειωθεί εάν το δείγμα καταψύχεται και αποψύχεται επανειλημμένα ή αποθηκεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα νουκλεϊκά οξέα θα πρέπει να εξάγονται από το δείγμα το συντομότερο δυνατό.

###### Τραχηλικό δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης

Το δείγμα τραχηλικών κυττάρων που συλλέγεται στο ThinPrep® μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία 2 ~ 8 °C για έως και 6 εβδομάδες.

###### Δείγμα τραχηλικού και κολπικού επιχρίσματος

Εάν τα δείγματα τραχηλικού και κολπικού επιχρίσματος δεν υποβάλλονται σε επεξεργασία αμέσως μετά την παραλαβή τους στο εργαστήριο, πρέπει να αποθηκεύονται στους -15° ~ -25 °C και να υποβάλλονται σε επεξεργασία εντός ενός μηνός.

##### C. Μεταφορά δειγμάτων

Για τη διασφάλιση της υψηλής ποιότητας του δείγματος, τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται το συντομότερο δυνατό στην ενδεικνυόμενη θερμοκρασία.

###### Τραχηλικό δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης

Τα δείγματα τραχηλικών κυττάρων που συλλέγεται στο ThinPrep® μπορούν να μεταφερθούν σε θερμοκρασία 2 ~ 25 °C.

###### Δείγμα τραχηλικού και κολπικού επιχρίσματος

Τα δείγματα τραχηλικού και κολπικού επιχρίσματος πρέπει κατά προτίμηση να μεταφέρονται υπό ψύξη, αλλά μπορούν να μεταφερθούν σε θερμοκρασία δωματίου (~ +25 °C) για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 7 ημερών. Τα δείγματα τραχηλικού και κολπικού επιχρίσματος θα πρέπει να αποστέλλονται στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατό έπειτα από τη συλλογή τους, ακολουθώντας τις οδηγίες του εργαστηρίου για τις μεταφορές. Τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται σύμφωνα με τις τοπικές και εθνικές οδηγίες για τη μεταφορά παθογόνου υλικού.

## **Διαδικασία για CFX96™, QuantStudio™ 5, Agilent AriaDx**

Η διαδικασία χρήσης του HPV Selfy HR με τα προαναφερθέντα συστήματα PCR πραγματικού χρόνου αποτελείται από έξι βήματα:

- A. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων
- B. Προετοιμασία ενίσχυσης των μιγμάτων PCR.
- Γ. Συναρμολόγηση πλάκας PCR.
- Δ. Ρύθμιση οργάνου PCR πραγματικού χρόνου.
- Ε. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών.
- Ζ. Ποιοτικός έλεγχος.

### **A. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων**

Διάφοροι κατασκευαστές διαθέτουν κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιήστε τη σωστή ποσότητα δείγματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται. Τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης έχουν επικυρωθεί για χρήση με το HPV Selfy HR.

#### **α. Προετοιμασία τραχηλικών δειγμάτων κυτταρολογίας υγρής φάσης**

Πριν από την προεπεξεργασία με το Ulisse Faster DNA ή την εκχύλιση DNA, τα τραχηλικά κυτταρολογικά δείγματα που έχουν αποθηκευτεί στο Thin Prep® πρέπει να προετοιμαστούν όπως υποδεικνύεται παρακάτω:

- Αναδεύστε με αναδευτήρα τύπου vortex το φιαλίδιο Thin Prep® για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα για να ομογενοποιήσετε το δείγμα.
- Μεταφέρετε 1,5 ml τραχηλικού δείγματος κυτταρολογίας υγρής φάσης από το αρχικό φιαλίδιο Thin Prep® σε σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml.
- Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο στα 9.000 g για 3 λεπτά.
- Αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό χειροκίνητα με την πιπέτα, προσέχοντας να μην αναρροφήσετε το κυτταρικό ίζημα. Τα πλεονάζοντα υπολείμματα του διαλύματος Thin Prep® μπορούν να προκαλέσουν την αναστολή της ακόλουθης αντίδρασης PCR.
- Προσθέστε 1 ml διαλύματος 1x αλατούχο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline) (PBS) στο κυτταρικό ίζημα και ανακινήστε το σωληνάριο στον αναδευτήρα τύπου vortex για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο στα 9.000 g για 3 λεπτά.
- Αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό χειροκίνητα με την πιπέτα, προσέχοντας να μην αναρροφήσετε το κυτταρικό ίζημα.
- Επαναιωρήστε σε 80 µL MBG νερό (molecular-biology grade water).

Τα επεξεργασμένα δείγματα μπορούν τώρα να υποβληθούν σε προεπεξεργασία με Ulisse Faster DNA ή να εκχυλιστούν με κιτ εκχύλισης DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τους.

#### **β. Προετοιμασία τραχηλικών και κολπικών επιχρισμάτων**

Πριν από την προεπεξεργασία με το Ulisse Faster DNA ή την εκχύλιση DNA, τα δείγματα κολπικού ή τραχηλικού επιχρισμάτος πρέπει να εναιωρηθούν ξανά όπως υποδεικνύεται παρακάτω:

- Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με ρύγχος(tip) μίας χρήσης για να μεταφέρετε 2 mL MBG νερού στο σωληνάριο των 5 mL.
- Βυθίστε το στυλεό με το δείγμα στο νερό με μια σειρά από γρήγορες κατακόρυφες κινήσεις- εν συνεχείᾳ και χωρίς να βυθιστεί, περιστρέψτε το στυλεό πιέζοντάς το στα τοιχώματα του σωλήνα, ώστε να διευκολυνθεί η αποδέσμευση όσο το δυνατόν περισσότερου υλικού.
- Ομογενοποιήστε το εναιωρήμα αναδεύοντάς το σε αναδευτήρα τύπου vortex για 10-20 δευτερόλεπτα και επιβεβαιώστε ότι δεν υπάρχει ορατό ίζημα.
- Τα έτοιμα δείγματα μπορούν τώρα να υποβληθούν σε προεπεξεργασία με Ulisse Faster DNA ή να εκχυλιστούν με κιτ εκχύλισης DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τους.

#### γ. Συμβατά κιτ απομόνωσης

Τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης έχουν επικυρωθεί για χρήση με το HPV Selfy HR:

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Inc.; κωδικός #51304); εκλούονται σε νερό MBG χωρίς RNase και DNase.
- Reliaprep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Corp.; κωδικός #A5082).
- Ulisse Faster DNA (Ulisse Biomed, S.p.A.; κωδικός #UBM0014).

#### **Β. Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR**

Αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου ( $\sim + 25^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, διατηρήστε όλα τα αντιδραστήρια σε πάγο.

Προετοιμάστε δύο σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1,5 ml, τα οποία θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάντε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.

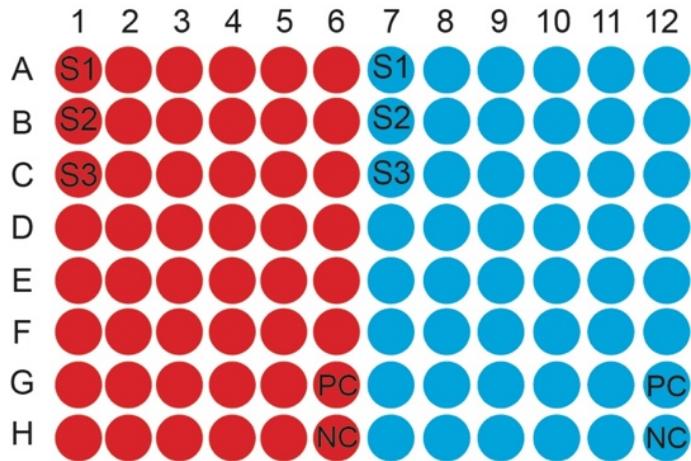
Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix : για κάθε εξέταση, συνδυάστε τα ακόλουθα συστατικά που επαρκούν για τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να εξεταστούν συν ένα θετικό και ένα αρνητικό μάρτυρα. Όλοι οι όγκοι περιλαμβάνουν 10% πλεόνασμα λόγω σφάλματος πιπέτας.

HR HPV PCR Mix		
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για "n" δείγματα συν 2 μάρτυρες
Reaction Mix (Μίγμα αντίδρασης) (DNA)	12,00 µL	13,20 x (n + 2) µL
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	0,60 µL	0,66 x (n + 2) µL
Μίγμα HR HPV mix	5,40 µL	5,94 x (n + 2) µL
Συνολικός Όγκος	18,00 µL	-
β-globin PCR Mix		
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για "n" δείγματα συν 2 μάρτυρες
Reaction Mix (Μίγμα αντίδρασης) (DNA)	12,00 µL	13,20 x (n + 2) µL
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	0,60 µL	0,66 x (n + 2) µL
β-Globin mix (Μίγμα β-σφαιρίνης)	5,40 µL	5,94 x (n + 2) µL
Συνολικός Όγκος	18,00 µL	-

Στο τέλος, ανακατεύουμε τα μείγματα με vortex και φυγοκεντρούμε για λίγο, αποφεύγουμε φυσαλίδων.

## Γ. Συναρμολόγηση πλάκας PCR

Γεμίστε 18 μL μίγματος HR HPV PCR και 18 μL μίγματος β-globin PCR για κάθε δείγμα σε δύο ξεχωριστά κοιλώματα. Γεμίστε 2 μL από κάθε βιολογικό δείγμα (S1, S2, S3, κ.λπ.), από τον θετικό μάρτυρα (PC) και από τον αρνητικό μάρτυρα (NC) δύο φορές : μία φορά στο βοθρίο με το HR HPV PCR Mix και μία φορά στο βοθρίο με το β-globin PCR Mix, όπως υποδεικνύεται στο παρακάτω σχήμα.



Στεγανοποιήστε την πλάκα PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλες αυτοκόλλητες ταινίες, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## Δ. Ρύθμιση οργάνου PCR πραγματικού χρόνου

Διατίθενται πρότυπα αρχεία για συμβατά συστήματα PCR πραγματικού χρόνου, κατόπιν αιτήματος. Για να εισάγετε το πρότυπο αρχείο στο όργανο PCR πραγματικού χρόνου, ακολουθήστε τις οδηγίες του λογισμικού του οργάνου.

Πριν από την έναρξη της εξέτασης, εισάγετε τα ονόματα των δειγμάτων.

Εάν δεν θέλετε να χρησιμοποιήσετε τα πρότυπα αρχεία ή αν αυτά δεν είναι διαθέσιμα για το όργανο, παρακαλούμε ρυθμίστε το όργανο και τα πρωτόκολλα σύμφωνα με τις ακόλουθες οδηγίες:

Παράμετρος			Ρύθμιση	
Volume (Όγκος)			20 μL	
Cover (Lid temperature) (Κάλυμμα -Θερμοκρασία καλύμματος)			105 °C	
Reporter (αντιδραστήριο ανίχνευσης) για κάθε μίγμα			SYBR	
Quencher (αντιδραστήριο απόσβεσης) για κάθε μίγμα			Καμία	
Passive reference (Παθητική αναφορά) <sup>1</sup>			Καμία	
Βήμα	Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία	Συλλογή Δεδομένων
PCR	Ενεργοποίηση πολυμεράσης	30 sec	98,0 °C	-
	Αποδιάταξη	5 sec	98,0 °C	-
	Επαναδιάταξη	10 sec	61,5 °C	-
	Επιμήκυνση	1 sec	72,0 °C	ναι
Καμπύλη τήξης	Αποδιάταξη	15 sec	95,0 °C	-
	Έναρξη τήξης	60 sec	60,0 °C	-
	Βέλτιστος ρυθμός αύξησης της Θερμοκρασίας/χρόνο ενυδάτωσης <sup>2</sup>	0,1°C / 3 sec		ναι
	Τέλος τήξης	1 sec	95,0 °C	-

## Ε. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών

Οι καταγεγραμμένες τιμές του φθορισμού στις αντιδράσεις ενίσχυσης πρέπει να αναλυθούν από το λογισμικό του οργάνου. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται με το λογισμικό του συστήματος του οργάνου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι τιμές του φθορισμού επιτρέπουν τον προσδιορισμό του αριθμού των κύκλων ενίσχυσης του δείγματος (Threshold cycle-Ct), τον αριθμό των κύκλων κατά τον οποίο ο φθορισμός φθάνει στην κατώτατη τιμή. Πριν από την έναρξη της ανάλυσης, ρυθμίστε το κατώτερο όριο (τιμή κατωφλίου) φθορισμού ως εξής:

Όργανο PCR	Κατώτατο όριο
CFX96™ Real-time PCR detection system (Σύστημα Ανίχνευσης PCR Πραγματικού Χρόνου) (Bio-Rad Laboratories, Inc.)	500
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Σύστημα PCR Πραγματικού Χρόνου) (Applied Biosystems, Inc.)	300.000
AriaDx Real-time PCR System (Σύστημα PCR Πραγματικού Χρόνου) (Agilent Technologies, Inc.)	2.500

Οι κύκλοι ενίσχυσης εξόδου (Ct) εκφράζονται ως αριθμητική τιμή μεταξύ 1 και 36. Εάν το αποτέλεσμα Ct είναι "Undetermined" (Απροσδιόριστο) σημαίνει ότι δεν ανιχνεύθηκε σήμα μεγαλύτερο της προκαθορισμένης κατώτατης τιμής. Για την ερμηνεία του αποτελέσματος, ανατρέξτε στον «Πίνακα ερμηνείας» στην επόμενη σελίδα.

<sup>1</sup> Το "ROX" επιλέγεται συχνά ως προεπιλεγμένη παθητική αναφορά. Εάν δεν χρησιμοποιείτε πρότυπα αρχεία, θυμηθείτε να καταργήσετε την επιλογή κάθε παθητικής αναφοράς.

<sup>2</sup> Για να επιτευχθεί ακριβής γνοτυπικός προσδιορισμός των τύπων HPV που υπάρχουν στο δείγμα, ρυθμίστε το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας <0,2°C (η βέλτιστη αύξηση είναι 0,1°C).

Πίνακας ερμηνείας

Ct HR HPV PCR Mix	Ct β-globin PCR Mix	Tm HR HPV PCR Mix	Tm β-globin PCR Mix	Κατάσταση δοκυμής	Αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Προτεινόμενη ενέργεια
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Ανιχνεύτηκε HPV (Detected HPV)	Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου - ο γονοτυπικός προσδιορισμός είναι δυνατός	Προσδιορίστε το γονότυπο του δείγματος χρησιμοποιώντας τον "Πίνακα γονοτύπων"
Απροσδιόριστο (Undetermined)	Αριθμητική τιμή < 30	-	Εντός ή εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Μη ανιχνεύσιμος HPV (Undetected HPV)	Αρνητικό	-
Αριθμητική τιμή	Απροσδιόριστο (Undetermined)	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	-	Έγκυρη (Valid)	Ανιχνεύτηκε HPV - Απροσδιόριστος(οι) γονοτυπος(οι)	Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου - ο γονοτυπικός προσδιορισμός δεν είναι δυνατός	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων»
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Ανιχνεύτηκε HPV - Απροσδιόριστος(οι) γονοτυπος(οι)	Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου - ο γονοτυπικός προσδιορισμός δεν είναι δυνατός	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων»
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Μη ανιχνεύσιμος HPV	Αρνητικό	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων»
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Μη έγκυρη (Invalid)	Απροσδιόριστος HPV (Undetermined HPV)	-	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων»
Αριθμητική τιμή	Απροσδιόριστο (Undetermined)	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	-	Μη έγκυρη (Invalid)	Απροσδιόριστος HPV	-	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων»
Απροσδιόριστο (Undetermined)	Αριθμητική τιμή > 30 ή απροσδιόριστο (undetermined)	-	Δεν έχει υπολογιστεί / εντός ή εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Μη έγκυρη (Invalid)	Απροσδιόριστος HPV	-	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων»

Κάθε δείγμα που έχει έγκυρο και θετικό αποτέλεσμα για την παρουσία ενός ή περισσότερων τύπων HPV υψηλού κινδύνου, μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω για να προσδιοριστεί συγκεκριμένα ποιος ή ποιοι τύποι HPV υψηλού κινδύνου έχουν ανιχνευθεί.

Η δοκυμή HPV Selfy HR επιτρέπει τη διάλειση 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου, ήτοι: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68, μέσω της ανάλυσης της θερμοκρασίας τήξης (Tm) του ενισχυμένου αναλύτη DNA. Στη δοκυμή HPV Selfy HR, καθένας από τους τύπους HPV υψηλού κινδύνου χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο διάστημα θερμοκρασίας τήξης (Tm).

Οι συν-μολύνσεις δύο ή περισσότερων τύπων HPV υψηλού κινδύνου, των οποίων οι κορυφές τήξης είναι γειτονικές, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δημιουργήσουν μια ενιαία κορυφή τήξης μεταξύ των τιμών Tm των μεμονωμένων τύπων HPV υψηλού κινδύνου.

Η θερμοκρασία τήξης Tm μπορεί να επηρεαστεί από ορισμένους παράγοντες που σχετίζονται με το βιολογικό δείγμα, κυρίως από το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο απομόνωσης, καθώς και από το όργανο PCR. Συνιστάται να ελέγχετε ότι τα σήματα Tm που προέρχονται από τον θετικό μάρτυρα αντιστοιχούν σε εκείνα που αναφέρονται στον "Πίνακα γονοτύπων" στην επόμενη σελίδα.

Πίνακας γονοτύπων

HR HPV PCR Mix										
Instrument (Όργανο)										
Τύπος HPV	QuantStudio™ 5		Τύπος HPV	AriaDx		Τύπος HPV	CFX96™			
	Θερμοκρασία τήξης °C			Θερμοκρασία τήξης °C			Θερμοκρασία τήξης °C			
	από	έως		από	έως		από	έως		
HPV68	72,00	73,20	HPV68	72,40	73,80	HPV68	72,00	73,30		
HPV59	73,30	74,10	HPV59	74,00	74,60	HPV59	73,40	73,60		
HPV66	74,50	75,30	HPV66	74,80	75,60	HPV66	73,80	75,30		
HPV16	76,00	76,95	HPV16	76,20	77,40	HPV16	75,40	76,80		
HPV35	77,00	78,00	HPV35	77,60	78,40	HPV35	76,90	77,40		
HPV31	78,20	79,45	HPV31	78,80	79,60	HPV31	77,80	78,90		
HPV56	79,50	80,00	HPV56	79,80	80,20	HPV56	79,00	79,70		
HPV52	80,05	80,40	HPV52	80,40	80,60	HPV52	79,80	80,00		
HPV39	80,60	80,90	HPV39	80,80	81,20	HPV39	80,10	80,30		
HPV58	81,20	81,80	HPV58	81,40	82,00	HPV58	80,60	81,00		
HPV51	81,85	82,40	HPV51	82,20	82,60	HPV51	81,40	81,60		
HPV45	82,50	83,95	HPV45	82,80	83,40	HPV45	81,80	82,80		
HPV33	84,60	85,30	HPV33	84,60	85,40	HPV33	83,60	84,80		
HPV18	85,60	87,00	HPV18	85,60	87,00	HPV18	84,90	87,00		
β-globin PCR Mix										
Instrument (Όργανο)										
Στόχος	QuantStudio™ 5		Στόχος	AriaDx		Στόχος	CFX96™			
	Θερμοκρασία τήξης °C			Θερμοκρασία τήξης °C			Θερμοκρασία τήξης °C			
	από	έως		από	έως		από	έως		
β-globin	75,50	76,80	β-globin	76,40	77,80	β-globin	75,00	77,00		

## Z. Ποιοτικός έλεγχος

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων της δοκιμής, είναι απαραίτητο να επαληθευτεί η εγκυρότητα της εκτέλεσης PCR (ανάλυσης). Για το σκοπό αυτό, απαιτείται ένας Αρνητικός Μάρτυρας και ένας Θετικός Μάρτυρας για κάθε εκτέλεση ενίσχυσης PCR, τόσο για το μίγμα HR HPV PCR mix όσο και για το μίγμα PCR β-globin mix. Ο Αρνητικός Μάρτυρας χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί ότι κανένα συστατικό δεν έχει επιμολυνθεί με νουκλεϊκά οξέα κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων ενίσχυσης. Ο Θετικός Μάρτυρας χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επίδοσης της ανάλυσης. Η ανάλυση θεωρείται έγκυρη όταν πληρούνται και οι δύο ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Ο Θετικός Μάρτυρας HPV χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο μίγμα HR HPV PCR mix και στο μίγμα PCR β-globin mix.
- Ο Αρνητικός Μάρτυρας χαρακτηρίζεται από μη ύπαρξη καμπυλών ενίσχυσης ούτε στο μίγμα HR HPV PCR mix ούτε στο μίγμα PCR β-globin mix.

-Για μια σωστή ανάλυση γονοτύπου, είναι απαραίτητο να ανιχνευθεί τουλάχιστον μία από τις τρεις κορυφές τήξης του Θετικού Μάρτυρα (που εξετάστηκε με το PCR HR HPV mix) και η κορυφή τήξης του Θετικού Μάρτυρα (που εξετάστηκε με το β-globin PCR Mix), εντός των θερμοκρασιών τήξης που υποδεικνύονται κατωτέρω:

PCR Mix	Target (Στόχος)	Έυρος Θερμοκρασίας Τήξης °C					
		QuantStudio™ 5		AriaDx		CFX96™	
		από	έως	από	έως	από	έως
HR HPV PCR Mix	HPV68	72,00	73,20	72,40	73,80	72,00	73,30
	HPV56	79,50	80,00	79,80	80,20	79,00	79,70
	HPV18	85,60	87,00	85,60	87,00	84,90	87,00
β-globin PCR Mix	β-globin	75,50	76,80	76,40	77,80	75,00	77,00

Εάν ανιχνευθεί σήμα ενίσχυσης που υπερβαίνει την κατώτατη τιμή για το μίγμα HR HPV PCR mix ή για το μίγμα PCR β-globin mix στον αρνητικό μάρτυρα, η πλάκα ακυρώνεται και η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί μετά την εξάλειψη της πηγής μόλυνσης.

Καθαρίστε το χώρο προετοιμασίας του δείγματος PCR και επαναλάβετε τη δοκιμή με νέο κιτ. Βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι του οργάνου έχουν ρυθμιστεί σωστά.

Εάν παρατηρηθούν ανωμαλίες στην ενίσχυση του Θετικού Μάρτυρα, η πλάκα ακυρώνεται και πρέπει να επαναληφθεί. Στην περίπτωση αυτή επικοινωνήστε με τον προμηθευτή του προϊόντος.

Εάν παρατηρηθούν ανωμαλίες στην καμπύλη τήξης του Θετικού Μάρτυρα, η πλάκα είναι έγκυρη, αλλά ο γονοτυπικός προσδιορισμός δεν μπορεί να είναι αξιόπιστος. Στην περίπτωση αυτή επικοινωνήστε με τον προμηθευτή του προϊόντος.

## Αντιμετώπιση προβλημάτων

Τύπος δείγματος	Πρόβλημα / Σφάλμα	Πιθανή Αιτία	Πιθανή λύση
Θετικός Μάρτυρας	Μη έγκυρος Θετικός Μάρτυρας - Δεν υπάρχουν καμπύλες ενίσχυσης	Σφάλμα στη χρήση της πιπέτας.	Προσέξτε όταν διανέμετε αντιδραστήρια στα βοθρία της μικροπλάκας(microplate).
		Σφάλμα σύνθεσης μίγματος PCR.	Βεβαιωθείτε ότι έχετε εκτελέσει σωστά τις οδηγίες που περιγράφονται στην παράγραφο «Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR ».
		Ακατάλληλη αποθήκευση αντιδραστηρίων.	Χρησιμοποιήστε ένα νέο κλάσμα αντιδραστηρίων ή ένα νέο κιτ.
		Παρουσία DNase.	Χρησιμοποιήστε αναλώσιμα ελεύθερα DNase.
		Αποτυχία PCR.	Βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι του οργάνου είναι σωτές.
		Φυσαλίδες στην αντίδραση PCR.	Επαναλάβετε τη δοκιμή διασφαλίζοντας ότι θα αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στο βοθρίο.
Αρνητικός Μάρτυρας	Μη έγκυρος Αρνητικός Μάρτυρας - Παρουσία καμπυλών ενίσχυσης	Τοπική επιμόλυνση.	Καθαρίστε την περιοχή προετοιμασίας PCR. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται επαρκής εξοπλισμός ατομικής προστασίας για τη μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης.
		Επιμόλυνση από αντιδραστήρια.	Χρησιμοποιήστε ένα νέο κλάσμα μη μολυσμένων αντιδραστηρίων.
		Ακατάλληλη αποθήκευση αντιδραστηρίων.	Χρησιμοποιήστε ένα νέο κλάσμα αντιδραστηρίων ή ένα νέο κιτ.
		Σφάλμα στη χρήση της πιπέτας.	Πάντα να αλλάζετε ρύγχος(tip) μεταξύ των δευγμάτων. Προσέξτε όταν διανέμετε αντιδραστήρια στα βοθρία της μικροπλάκας(microplate).
		Σφάλμα σύνθεσης μίγματος PCR.	Βεβαιωθείτε ότι έχετε εκτελέσει σωστά τις οδηγίες που περιγράφονται στην παράγραφο «Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR ».
		Σφάλμα στεγανοποίησης πλακών.	Προσέξτε όταν στεγανοποιείτε την πλάκα και ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή.
Βιολογικό Δείγμα	Αναποτελεσματικός γονοτυπικός προσδιορισμός - Μη έγκυρη δοκιμή: Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Ακατάλληλο δείγμα.	Επαληθεύστε τη συμβατότητα και την επάρκεια του δείγματος.
		Ακατάλληλη συλλογή, αποθήκευση ή μεταφορά δειγμάτων.	Επαναλάβετε την απομόνωση DNA ή τη συλλογή του δείγματος.
		Ακατάλληλη απομόνωση DNA. - Χημική επιμόλυνση.	Επαληθεύστε τη συμβατότητα απομόνωσης DNA. Επαναλάβετε την απομόνωση DNA.
		Φυσαλίδες στην αντίδραση PCR.	Επαναλάβετε τη δοκιμή διασφαλίζοντας ότι θα αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στο βοθρίο.
		Ακατάλληλο δείγμα.	Επαληθεύστε τη συμβατότητα και την επάρκεια του δείγματος.
	Μη έγκυρη δοκιμή: καμία καμπύλη ενίσχυσης στο μίγμα HR HPV PCR και καμία καμπύλη ενίσχυσης στο μίγμα β-σφαιρίνης PCR ή καμπύλη ενίσχυσης με Ct > 30	Ακατάλληλη συλλογή, αποθήκευση ή μεταφορά δειγμάτων.	Επαναλάβετε την απομόνωση DNA ή τη συλλογή του δείγματος.
		Ακατάλληλη απομόνωση νουκλεϊκού οξέος.	Επαληθεύστε τη συμβατότητα απομόνωσης DNA. Επαναλάβετε την απομόνωση DNA.
		Αποτυχία PCR.	Βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι του οργάνου είναι σωτές.
		Φυσαλίδες στην αντίδραση PCR.	Επαναλάβετε τη δοκιμή διασφαλίζοντας ότι θα αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στο βοθρίο.
		Παρουσία αναστολέων PCR.	Προσπαθήστε να αραιώσετε το απομόνωμένο DNA 1:5. Επαναλάβετε την απομόνωση DNA ή τη συλλογή του δείγματος.

## Διαδικασία για ELITe InGenius®

Η διαδικασία χρήσης του HPV Selfy HR με το σύστημα ELITe InGenius® αποτελείται από τρία βήματα:

- επαλήθευση της ετοιμότητας του συστήματος.
- Ρύθμιση της διαδικασίας.
- Αξιολόγηση και έγκριση των αποτελεσμάτων.

### A. Επαλήθευση ότι το σύστημα είναι έτοιμο προς χρήση

Πριν από την έναρξη της διαδικασίας, σύμφωνα με τις οδηγίες του οργάνου, είναι απαραίτητο να:

- Ενεργοποιήστε το ELITe InGenius® και επιλέξτε τη λειτουργία(login mode) σύνδεσης "CLOSED". Επαληθεύστε ότι οι αντιδράσεις ενίσχυσης των μαρτύρων - Θετικός HPV και Αρνητικός μάρτυρας - εκτελέστηκαν σε συνδυασμό τόσο με το μίγμα HR HPV PCR mix όσο και με το μίγμα β-globin PCR mix, με την παρτίδα αντιδραστηρίου ενίσχυσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί και ότι είναι εγκεκριμένες και σε έγκυρη κατάσταση (Status). Εάν δεν υπάρχουν εγκεκριμένες ή έγκυρες αντιδράσεις ενίσχυσης των μαρτύρων, εκτελέστε τις χρησιμοποιώντας τα ειδικά πρωτόκολλα ανάλυσης που αναφέρονται στην ενότητα "Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται" στο σημείο "E", όπως περιγράφεται παρακάτω.
- Επιλέξτε τον τύπο της εκτέλεσης, ακολουθώντας τις οδηγίες στο γραφικό περιβάλλον χρήστη (GUI: Graphical User Interface) για τη ρύθμιση της εξέτασης και χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα ανάλυσης που παρέχονται από την ELITechGroup S.p.A. Αυτά τα πρωτόκολλα IVD (in vitro diagnostics) επικυρώθηκαν ειδικά με το HPV Selfy HR, το όργανο ELITe InGenius και τις αναφερόμενες μήτρες δειγμάτων.

Τα πρωτόκολλα ανάλυσης που είναι διαθέσιμα για την εξέταση δειγμάτων με το προϊόν HPV Selfy HR περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Assay Protocols for HPV Selfy HR			
Όνομα	Μήτρα/Εκλουσμα	Αναφορά	Χαρακτηριστικά
Ulisse HPV Mix_CYT_200_200_00	Τραχηλικό δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης.	Θετική/ Αρνητική (Positive/ Negative)	Όγκος εισόδου εκχύλισης: 200 μL Όγκος έκλουσης εκχύλισης: 200 μL Εσωτερικός Μάρτυρας: OXI Υπερήχηση: OXI Συντελεστής αραίωσης: 1 Μίγμα PCR: HR HPV PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL
Ulisse HPV Mix_CS_200_200_00	Τραχηλικά/κολπικά επιχρίσματα	Θετική/ Αρνητική (Positive/ Negative)	Όγκος εισόδου εκχύλισης: 200 μL Όγκος έκλουσης εκχύλισης: 200 μL Εσωτερικός Μάρτυρας: OXI Υπερήχηση: OXI Συντελεστής αραίωσης: 1 Μίγμα PCR: HR HPV PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL
Ulisse Bglobin Mix_CYT_200_200_00	Τραχηλικό δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης.	Έγκυρη/ Μη Έγκυρη (Valid/ Not valid)	Όγκος εισόδου εκχύλισης: 200 μL Όγκος εκροής εκχύλισης: 200 μL Εσωτερικός Μάρτυρας: OXI Υπερήχηση: OXI Συντελεστής αραίωσης: 1 Μίγμα PCR: β-globin PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL

Ulisse Bglobin Mix_CS_200_200_00	Τραχηλικά/κολπικά επιχρίσματα	Έγκυρη/ Μη Έγκυρη (Valid/ Not valid)	Όγκος εισόδου εικχύλισης: 200 μL Όγκος έκλουσης εικχύλισης: 200 μL Εσωτερικός Μάρτυρας: OXI Υπερήχηση: OXI Συντελεστής αραίωσης: 1 Μίγμα PCR: β-globin PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δειγματος: 5 μL
-------------------------------------	-------------------------------	---	---

Εάν το πρωτόκολλο ανάλυσης που σας ενδιαφέρει δεν έχει εισαχθεί στο σύστημα, επικοινωνήστε με το τοπικό τμήμα εξυπηρέτησης πελατών της ELITechGroup.

## **B. Ρύθμιση της διαδικασίας**

Το προϊόν HPV Selfy HR, σε συνδυασμό με το σύστημα ELITe InGenius®, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση:

- α. ολοκληρωμένη εκτέλεση (Extract + PCR) (εκχύλιση + αντίδραση PCR);
- β. Εκτέλεση αντίδρασης ενίσχυσης (PCR only) (μόνο PCR),
- γ. Εκτέλεση αντίδρασης ενίσχυσης θετικού και αρνητικού μάρτυρα (PCR only) (μόνο PCR).

Όλες οι παράμετροι που απαιτούνται για την εξέταση περιλαμβάνονται στα Πρωτόκολλα ανάλυσης που είναι διαθέσιμα στο όργανο και ανακαλούνται αυτόματα όταν αυτά επιλέγονται.

**Σημείωση:** το σύστημα ELITe InGenius® μπορεί να συνδεθεί με τον "Εργαστηριακό σύστημα πληροφοριών: Laboratory Information System" (LIS), μέσω του οποίου είναι δυνατή η μεταφόρτωση των πληροφοριών της εξέτασης. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου ELITe InGenius® για περισσότερες λεπτομέρειες.

Τα κύρια βήματα για τη ρύθμιση των τριών τύπων αναλύσεων περιγράφονται παρακάτω:

#### α. Ολοκληρωμένη εκτέλεση

Για να ρυθμίσετε μια ολοκληρωμένη εκτέλεση ξεκινώντας από το βασικό δείγμα, εκτελέστε τα ακόλουθα βήματα σύμφωνα με το γραφικό περιβάλλον χρήστη (GUI):

- αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου ( $\sim + 25^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Διατηρείτε όλα τα αντιδραστήρια σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας.
- Προετοιμάστε δύο σωληνάρια των 2 ml (Sarstedt) που θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα  $\beta$ -globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάντε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.
- Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα  $\beta$ -globin PCR Mix σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες:

HR HPV PCR Mix			
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για $n \leq 4$	Όγκος για $4 < n \leq 6$
Reaction Mix (DNA)	30,0 $\mu\text{L}$	$30,0 \times (n + 1) \mu\text{L}$	$30,0 \times (n + 2) \mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1,5 $\mu\text{L}$	$1,5 \times (n + 1) \mu\text{L}$	$1,5 \times (n + 2) \mu\text{L}$
HR HPV mix	13,5 $\mu\text{L}$	$13,5 \times (n + 1) \mu\text{L}$	$13,5 \times (n + 2) \mu\text{L}$
Συνολικός όγκος	45,0 $\mu\text{L}$	-	-
$\beta$ -globin PCR Mix			
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για $n \leq 4$	Όγκος για $4 < n \leq 6$
Reaction Mix (DNA)	30,0 $\mu\text{L}$	$30,0 \times (n + 1) \mu\text{L}$	$30,0 \times (n + 2) \mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1,5 $\mu\text{L}$	$1,5 \times (n + 1) \mu\text{L}$	$1,5 \times (n + 2) \mu\text{L}$
$\beta$ -globin mix	13,5 $\mu\text{L}$	$13,5 \times (n + 1) \mu\text{L}$	$13,5 \times (n + 2) \mu\text{L}$
Συνολικός όγκος	45,0 $\mu\text{L}$	-	-

- Στο τέλος, ανακατεύουμε τα μείγματα με vortex και φυγοκεντρούμε για λίγο, αποφεύγουμε φυσαλίδων.
- Επιλέξτε "Perform Run" (Έναρξη εκτέλεσης) από την κεντρική οθόνη "Home" (Αρχική Σελίδα).
- Βεβαιωθείτε ότι ο "Extraction Input Volume" (Όγκος εισόδου εκχύλισης) είναι 200  $\mu\text{L}$  και ο "Extraction Elute Volume" (Όγκος έκλουσης εκχύλισης) είναι 200  $\mu\text{L}$ .
- Εάν χρειαστεί, μεταφέρετε 200  $\mu\text{L}$  του δείγματος από το πρωτεύον σωληνάριο σε ένα "σωληνάριο εκχύλισης" του ELITe InGenius.
- Για κάθε ενδιαφέρον ίχνος (Track of interest) συμπληρώστε το "SampleID" (SID) πληκτρολογώντας ή σαρώνοντας τον γραμματό κώδικα(barcode) του δείγματος.
- Επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) (π.χ. "Ulisse HPV Mix\_CYT\_200\_200\_00").
- Βεβαιωθείτε ότι το "Protocol" (Πρωτόκολλο) που εμφανίζεται είναι: "Extract + PCR" (Εκχύλιση + PCR).
- Επιλέξτε τη θέση εισαγωγής του δείγματος στη στήλη "Sample Position" (Θέση δείγματος):
  - Εάν χρησιμοποιείται πρωτεύον σωληνάριο, επιλέξτε "Primary Tube" (πρωτεύον σωληνάριο),
  - Εάν χρησιμοποιείται δευτερεύον σωληνάριο, επιλέξτε "Extraction Tube" (Σωληνάριο εκχύλισης).
- Κάντε κλικ στο "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε το πρόσφατα παρασκευασμένο μίγμα PCR HPV mix και το μίγμα PCR  $\beta$ -globin mix στο "Inventory Block" (Μπλοκ απογραφής) που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του κιτ HPV Selfy HR. Επιλέξτε το "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε και ελέγχετε τα Tip Racks (ρύγχη) στην επιλεγμένη "Inventory Area" (Περιοχή απογραφής) ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Κάντε κλικ στο κουμπί "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε τις "PCR Cassettes" (κασέτες PCR), τα φυσίγγια εκχύλισης "ELITe InGenius® SP 200", όλα τα απαιτούμενα αναλώσιμα και τα προς εκχύλιση δείγματα, ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Κάντε κλικ στο κουμπί "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Κλείστε την πόρτα του οργάνου.
- Πατήστε "Start" (Έναρξη) για να ξεκινήσει η εκτέλεση.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το σύστημα ELITe InGenius® επιτρέπει στους χρήστες να προβάλουν, να εγκρίνουν, να αποθηκεύσουν τα αποτελέσματα και να εκτυπώσουν και να αποθηκεύσουν την αναφορά.

**Σημείωση:** στο τέλος της εκτέλεσης, το εναπομείναν εκχυλισμένο δείγμα πρέπει να αφαιρεθεί από το όργανο, να καλυφθεί, να ταυτοποιηθεί και να αποθηκευτεί στους -20 °C. Αποφύγετε τη διάχυση του εκχυλισμένου δείγματος.

**Σημείωση:** στο τέλος της εκτέλεσης, οι PCR Cassettes με τα προϊόντα της αντίδρασης και τα αναλώσιμα πρέπει να αφαιρούνται από το όργανο και να απορρίπτονται χωρίς να επιβαρύνεται το περιβάλλον. Αποφύγετε τη διάχυση των προϊόντων της αντίδρασης.

## β. Εκτέλεση αντίδρασης ενίσχυσης

Για να ρυθμίσετε την εκτέλεση της αντίδρασης της ενίσχυσης ξεκινώντας από ένα ήδη εκχυλισμένο/εκλουσόμενο δείγμα, εκτελέστε τα ακόλουθα βήματα σύμφωνα με το GUI:

- αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου ( $\sim + 25^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Διατηρήστε όλα τα αντιδραστήρια σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας.
- Προετοιμάστε δύο σωληνάρια των 2 ml (Sarstedt) που θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα  $\beta$ -globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.
- Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα  $\beta$ -globin PCR Mix σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες:

HR HPV PCR Mix			
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για $n \leq 4$	Όγκος για $4 < n \leq 6$
Reaction mix (DNA)	30,0 $\mu\text{L}$	30,0 $\times (n + 1) \mu\text{L}$	30,0 $\times (n + 2) \mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\times (n + 1) \mu\text{L}$	1,5 $\times (n + 2) \mu\text{L}$
HR HPV mix	13,5 $\mu\text{L}$	13,5 $\times (n + 1) \mu\text{L}$	13,5 $\times (n + 2) \mu\text{L}$
Συνολικός όγκος	45,0 $\mu\text{L}$	-	-

β-globin PCR Mix			
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για $n \leq 4$	Όγκος για $4 < n \leq 6$
Reaction mix (DNA)	30,0 $\mu\text{L}$	30,0 $\times (n + 1) \mu\text{L}$	30,0 $\times (n + 2) \mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\times (n + 1) \mu\text{L}$	1,5 $\times (n + 2) \mu\text{L}$
β-globin mix	13,5 $\mu\text{L}$	13,5 $\times (n + 1) \mu\text{L}$	13,5 $\times (n + 2) \mu\text{L}$
Συνολικός όγκος	45,0 $\mu\text{L}$	-	-

- Στο τέλος, ανακατεύουμε τα μείγματα με vortex και φυγοκεντρούμε για λίγο, αποφεύγουμε φυσαλίδων.
- Επιλέξτε "Perform Run" ("Εναρξη εκτέλεσης) από την οθόνη "Home" (Αρχική σελίδα).
- Ακόμη και αν δεν θα πραγματοποιηθεί εκχύλιση, βεβαιωθείτε ότι ο "Extraction Input Volume" (Όγκος εισόδου εκχύλισης) είναι 200  $\mu\text{L}$  και ο "Extraction Elute Volume" (Όγκος έκλουσης εκχύλισης) είναι 200  $\mu\text{L}$ .
- Για κάθε δείγμα(Track of interest) συμπληρώστε το "SampleID" (SID) πληκτρολογώντας ή σαρώνοντας τον γραμμωτό κώδικα(barcode) του δείγματος.
- Επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) (π.χ. "Ulisse HPV Mix\_CYT\_200\_200\_00"). Επιλέξτε "PCR Only" (Μόνο PCR) στη στήλη "Protocol" (Πρωτόκολλο).
- Βεβαιωθείτε ότι η θέση φόρτωσης του δείγματος στη στήλη "Sample Position" είναι "Elution Tube (bottom row)"(Σωληνάριο έκλουσης (κάτω σειρά)). Κάντε κλικ στο "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Φορτώστε το πρόσφατα παρασκευασμένο μίγμα HPV PCR Mix και  $\beta$ -globin PCR Mix στο "Inventory Block"που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του κιτ HPV Selfy HR. Κάντε κλικ στο κουμπί "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε και ελέγχετε τα Tip Racks(ρύγχη) στο "Inventory Area" (Περιοχή απογραφής) που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Κάντε κλικ στο κουμπί "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε την "PCR Cassette" (κασέτα PCR) και τα εκχυλισμένα δείγματα νουκλεϊκού οξέος ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Κάντε κλικ στο "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Κλείστε την πόρτα του οργάνου.
- Πατήστε "Start" για να ξεκινήσει η εκτέλεση.
- Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το σύστημα ELITe InGenius<sup>®</sup> επιτρέπει στους χρήστες να προβάλουν, να εγκρίνουν, να αποθηκεύσουν τα αποτελέσματα και να εκτυπώσουν και να αποθηκεύσουν την αναφορά.

**Σημείωση:** Στο τέλος της εκτέλεσης, το εναπομείναν Εκχυλιζόμενο Δείγμα πρέπει να αφαιρεθεί από το όργανο, να καλυφθεί και να αποθηκευτεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Αποφύγετε τη διάχυση του εκχυλισμένου δείγματος.

**Σημείωση:** στο τέλος της εκτέλεσης, οι κασέτες PCR με τα προϊόντα της αντίδρασης και τα αναλώσιμα πρέπει να αφαιρούνται από το όργανο και να απορρύπτονται χωρίς να επιβαρύνεται το περιβάλλον. Αποφύγετε τη διάχυση των προϊόντων της αντίδρασης.

### γ. Εκτέλεση αντίδρασης ενίσχυσης Θετικού και Αρνητικού Μάρτυρα

Για να ρυθμίσετε την εκτέλεση της ενίσχυσης για τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα, εκτελέστε τα παρακάτω βήματα σύμφωνα με το GUI:

- αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου ( $\sim + 25^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Διατηρείτε όλα τα αντιδραστήρια σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας.
- Προετοιμάστε δύο σωληνάρια των 2 ml (Sarstedt) που θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.
- Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες:

HR HPV PCR Mix			
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για $n \leq 4$	Όγκος για $4 < n \leq 6$
Reaction mix (DNA)	30,0 μL	30,0 x (n + 1) μL	30,0 x (n + 2) μL
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1,5 μL	1,5 x (n + 1) μL	1,5 x (n + 2) μL
HR HPV mix	13,5 μL	13,5 x (n + 1) μL	13,5 x (n + 2) μL
Συνολικός όγκος	45,0 μL	-	-
β-globin PCR Mix			
Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα	Όγκος για $n \leq 4$	Όγκος για $4 < n \leq 6$
Reaction mix (DNA)	30,0 μL	30,0 x (n + 1) μL	30,0 x (n + 2) μL
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	1,5 μL	1,5 x (n + 1) μL	1,5 x (n + 2) μL
β-globin mix	13,5 μL	13,5 x (n + 1) μL	13,5 x (n + 2) μL
Συνολικός όγκος	45,0 μL	-	-

- Στο τέλος, ανακατεύουμε τα μείγματα με vortex και φυγοκεντρούμε για λίγο, αποφεύγουμε φυσαλίδων.
- Αποψύξτε το σωληνάριο Θετικού Μάρτυρα HPV για τη διαδικασία. Κάθε σωληνάριο επαρκεί για 2 εξετάσεις. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Μεταφέρετε τουλάχιστον 50 μL Θετικού Μάρτυρα HPV σε 2 "Elution tubes" (σωληνάρια έκλουσης), που παρέχονται με το "ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set".
- Αποψύξτε το σωληνάριο Αρνητικού Μάρτυρα για τη διαδικασία. Κάθε σωληνάριο επαρκεί για 2 εξετάσεις. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Μεταφέρετε τουλάχιστον 50 μL Αρνητικού Μάρτυρα σε 2 "Elution tubes" (σωληνάρια έκλουσης), που παρέχονται με το "ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set".
- Επιλέξτε "Perform Run" (Έναρξη εκτέλεσης) από την οθόνη "Home" (Αρχική σελίδα).
- Στο δείγμα που ενδιαφέρει (Track of interest) επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί στη στήλη "Assay"(Δοκιμή).
- Για το δείγμα του θετικού μάρτυρα(Track of positive control) που πρόκειται να ενισχυθεί με μίγμα HR HPV PCR Mix, επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse HPV Mix\_PC\_00" στη στήλη "Assay"(Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του θετικού μάρτυρα HPV.
- Για το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα που πρόκειται να ενισχυθεί με μίγμα HR HPV PCR Mix, επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse HPV Mix\_NC\_00" στη στήλη "Assay"(Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του αρνητικού μάρτυρα.
- Για το δείγμα του θετικού μάρτυρα(Track of positive control) που πρόκειται να ενισχυθεί με μίγμα β-globin PCR Mix, επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης "Assay Ulisse Bglobin Mix\_PC\_00" στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του θετικού μάρτυρα HPV.
- Για το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα (Track of negative control) που πρόκειται να ενισχυθεί με μίγμα β-globin PCR Mix, επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης "Assay Ulisse Bglobin Mix\_NC\_00" στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του αρνητικού μάρτυρα.
- Κάντε κλικ στο "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε το πρόσφατα παρασκευασμένο μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix στο επιλεγμένο "Inventory Block" που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI ,συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την

ημερομηνία λήξης του κιτ HPV Selfy HR. Κάντε κλικ στο κουμπί "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.

- Εισάγετε και ελέγχετε τα (ρύγχη)Tip Racks στο "Inventory Area" (Περιοχή απογραφής) που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Κάντε κλικ στο κουμπί "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Εισάγετε τις "PCR Cassettes" (κασέτες PCR), τα σωληνάρια έκλουσης (Elution tubes) θετικού μάρτυρα HPV και τα σωληνάρια έκλουσης αρνητικού μάρτυρα ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Κάντε κλικ στο "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
- Κλείστε την πόρτα του οργάνου.
- Πατήστε "Start" για να ξεκινήσει η εκτέλεση.
- Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το σύστημα ELITe InGenius<sup>®</sup> επιτρέπει στους χρήστες να προβάλουν, να εγκρίνουν, να αποθηκεύσουν τα αποτελέσματα και να εκτυπώσουν και να αποθηκεύσουν την αναφορά.

**Σημείωση:** στο τέλος της εκτέλεσης, ο εναπομένων θετικός μάρτυρας πρέπει να αφαιρεθεί από το όργανο, να καλυφθεί, να ταυτοποιηθεί και να αποθηκευτεί στους -20 °C. Αποφύγετε τη διάχυση του θετικού μάρτυρα. Ο εναπομένων αρνητικός μάρτυρας πρέπει να απορρίπτεται.

**Σημείωση:** στο τέλος της εκτέλεσης, οι κασέτες PCR με τα προϊόντα της αντίδρασης και τα αναλώσιμα πρέπει να αφαιρεθούν από το όργανο και να απορριφθούν χωρίς να επιβαρύνεται το περιβάλλον. Αποφύγετε τη διάχυση των προϊόντων της αντίδρασης.

## **Γ. Αξιολόγηση και έγκριση των αποτελεσμάτων**

Στο τέλος της εκτέλεσης, εμφανίζεται αυτόματα η οθόνη "Results Display" (Εμφάνιση αποτελεσμάτων). Στην οθόνη αυτή εμφανίζονται τα αποτελέσματα του δείγματος/αποτελέσματα των μαρτύρων και οι πληροφορίες σχετικά με την εξέταση. Από αυτή την οθόνη είναι δυνατή η έγκριση του αποτελέσματος, η εκτύπωση ή η αποθήκευση των αναφορών ("Sample Report" ή "Track Report"). Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου ELITe InGenius® για περισσότερες λεπτομέρειες.

**Σημείωση:** το σύστημα ELITe InGenius® μπορεί να συνδεθεί με το "Laboratory Information System" (LIS) (Εργαστηριακό Σύστημα Πληροφοριών), μέσω του οποίου είναι δυνατή η αποστολή των αποτελεσμάτων της εξέτασης στο κέντρο δεδομένων του εργαστηρίου. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου ELITe InGenius® για περισσότερες λεπτομέρειες.

Το σύστημα ELITe InGenius® παράγει τα αποτελέσματα με το προϊόν HPV Selfy HR μέσω της ακόλουθης διαδικασίας:

- α) Επικύρωση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα.
- β) Επικύρωση των αποτελεσμάτων του δείγματος.
- γ) Αναφορά αποτελεσμάτων δειγμάτος.

### **α) Επικύρωση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης Θετικού και του Αρνητικού Μάρτυρα**

Τα σήματα φθορισμού που εκπέμπονται από τα προϊόντα ενίσχυσης των 3 τύπων HPV υψηλού κινδύνου (HR HPV PCR Mix) και του IC (β-globin PCR Mix) στην αντίδραση ενίσχυσης Θετικού HPV και Αρνητικού Μάρτυρα αναλύονται και ερμηνεύονται από το λογισμικό ELITe InGenius® με τις παραμέτρους που περιλαμβάνονται στα Assay Protocols (Πρωτόκολλα Ανάλυσης) "Ulisse HPV Mix\_PC\_00", "Assay\_Ulisse Bglobin Mix\_PC\_00", "Ulisse HPV Mix\_NC\_00" και "Assay\_Ulisse Bglobin Mix\_NC\_00".

Τα αποτελέσματα ενίσχυσης του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα, τα οποία είναι συγκεκριμένα για την παρτίδα του αντιδραστηρίου ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε, καταγράφονται στη βάση δεδομένων (Controls). Μπορούν να προβληθούν και να εγκριθούν από το αρμόδιο προσωπικό ως "Administrator" (Διαχειριστής) ή "Analyst" (Αναλυτής), ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI.

Τα αποτελέσματα ενίσχυσης του Θετικού και του Αρνητικού Μάρτυρα, τα οποία είναι συγκεκριμένα για την παρτίδα του αντιδραστηρίου ενίσχυσης, **λήγουν μετά από 15 ημέρες**.

Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης Θετικού και Αρνητικού Μάρτυρα χρησιμοποιούνται από το λογισμικό του οργάνου για τη ρύθμιση των "Control Charts" (διαγραμμάτων ελέγχου) τα οποία ελέγχουν την επίδοση των βημάτων ενίσχυσης. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του οργάνου για περισσότερες λεπτομέρειες.

**Σημείωση:** Κατά την έγκριση του αποτελέσματος της ενίσχυσης του Θετικού Μάρτυρα, για την επαλήθευση της αξιοπιστίας του γονοτυπικού προσδιορισμού είναι απαραίτητο να ελέγχονται τα γραφήματα της καμπύλης τήξης των μιγμάτων στην αναφορά της εξέτασης. Οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) που πρέπει να παρατηρούνται στον Θετικό Μάρτυρα παρατίθενται στον πίνακα με τίτλο "Positive Control - Melting temperatures observed on ELITe InGenius®" (Θετικός Μάρτυρας - θερμοκρασίες τήξης που παρατηρούνται στο ELITe InGenius®) που παρουσιάζεται παρακάτω. Για έναν αξιόπιστο γονοτυπικό προσδιορισμό πρέπει να ανιχνεύονται τουλάχιστον μία από τις τρεις κορυφές τήξης του Θετικού Μάρτυρα που εξετάστηκε με το HR HPV PCR Mix και η κορυφή τήξης του Θετικού Μάρτυρα που εξετάστηκε με το β-globin PCR Mix.

**Σημείωση:** όταν το αποτέλεσμα της ενίσχυσης του Θετικού ή του Αρνητικού μάρτυρα δεν πληρού τα κριτήρια αποδοχής, στην οθόνη "Controls" (Έλεγχοι) εμφανίζεται το μήνυμα "not passed" (δεν έχει περαστεί) και δεν είναι δυνατή η έγκρισή του. Στην περίπτωση αυτή, η αντίδραση ενίσχυσης του Θετικού ή του αρνητικού μάρτυρα πρέπει να επαναληφθεί.

**Σημείωση:** όταν ο θετικός μάρτυρας ή/και ο αρνητικός μάρτυρας εκτελείται μαζί με δειγμάτα προς εξέταση και το αποτέλεσμά του είναι άκυρο, ολόκληρη η συνεδρία είναι άκυρη. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να επαναληφθεί η αντίδραση ενίσχυσης όλων των δειγμάτων.

Θετικός Μάρτυρας - θερμοκρασίες τήξης που παρατηρούνται στο ELITe InGenius®

PCR Mix	Στόχος Θετικού Μάρτυρα	Εύρος Θερμοκρασίας τήξης °C	
		από	έως
HR HPV PCR Mix	HPV68	72,0	73,3
	HPV56	79,4	80,1
	HPV18	85,6	87,0
β-globin PCR Mix	β-globin	75,2	77,4

## β. Επικύρωση των αποτελεσμάτων του δείγματος

Τα σήματα φθορισμού που εκπέμπονται από τα προϊόντα ενίσχυσης των 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου (μίγμα HR HPV PCR Mix) και του IC (β-globin PCR Mix) στις αντιδράσεις ενίσχυσης των δειγμάτων αναλύονται και ερμηνεύονται από το λογισμικό του οργάνου με τις παραμέτρους που περιλαμβάνονται στο πρωτόκολλο ανάλυσης.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις αναφορές που παράγει το όργανο "Result Display" (Εμφάνιση αποτελεσμάτων).

Η ανάλυση μπορεί να εγκριθεί όταν πληρούνται οι δύο προϋποθέσεις που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

1) Θετικός Μάρτυρας	Κατάσταση
HR HPV Θετικός Μάρτυρας "Ulisse HPV Mix_PC_00"	APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ)
HR HPV Θετικός Μάρτυρας "Assay Ulisse Bglobin Mix_PC_00"	APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ)
2) Αρνητικός Μάρτυρας	Κατάσταση
Αρνητικός Μάρτυρας "Ulisse HPV Mix_NC_00"	APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ)
Αρνητικός Μάρτυρας "Assay Ulisse Bglobin Mix_NC_00"	APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ)

Για κάθε δείγμα, το αποτέλεσμα της ανάλυσης ερμηνεύεται από το σύστημα όπως καθορίζεται από τον αλγόριθμο του λογισμικού ELITe InGenius® και τις παραμέτρους του πρωτοκόλλου ανάλυσης.

Τα πιθανά μηνύματα αποτελεσμάτων ενός δείγματος παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Αποτέλεσμα δείγματος με HR HPV PCR mix	Ερμηνεία
HPV: DNA Detected Check Tm result (HPV:DNA Ανιχνεύθηκε Ελέγξτε το αποτελέσμα της Tm)	Ένας ή περισσότεροι τύποι HPV υψηλού κινδύνου ανιχνεύονται με υπολογισμένο Ct. Ελέγξτε τα αποτελέσματα Tm για τον γονότυπο.
HPV: Check Bglobin Mix result (HPV: Ελέγξτε το αποτέλεσμα του μίγματος β σφαιρίνης)	Το δείγμα έχει απροσδιόριστη τιμή Ct και υπολογισμένη τιμή Tm. Το δείγμα είναι αρνητικό ως προς τον HPV. Το δείγμα έχει απροσδιόριστη τιμή Ct και μη υπολογισμένη τιμή Tm. Το δείγμα είναι αρνητικό ως προς τον HPV. Η εγκυρότητα του δείγματος εξαρτάται από την τιμή Ct της β-σφαιρίνης και την τιμή Tm που λαμβάνεται.
Αποτέλεσμα δείγματος με μίγμα PCR β-σφαιρίνης (β-globin PCR Mix)	Ερμηνεία
Bglobin: DNA Detected Tm within range (Bglobin:DNA Ανιχνεύθηκε Tm εντός εύρους)	Το δείγμα έχει τιμή Ct β-globin χαμηλότερη από 30, τιμή Tm β-globin εντός του εύρους αποδοχής. Το δείγμα είναι έγκυρο.
Bglobin: DNA Detected Tm out of range-Retest Sample (Bglobin:DNA ανιχνεύθηκε Tm εκτός εύρους - επανεξέταση δείγματος)	Το δείγμα έχει τιμή Ct β-globin χαμηλότερη από 30 αλλά τιμή Tm εκτός του εύρους αποδοχής. Το δείγμα είναι μη έγκυρο.
Invalid – retest the sample (Μη έγκυρο - επανεξέταση δείγματος)	Το δείγμα έχει τιμή Ct β-globin μεγαλύτερη από 30. Το δείγμα είναι μη έγκυρο.

Τα θετικά δείγματα HPV αναφέρονται ως "HPV:DNA Detected Check Tm result" από το λογισμικό ELITe InGenius®. Στην περίπτωση αυτή, ο γονοτυπικός προσδιορισμός πρέπει να αξιολογηθεί μετά την εκτέλεση, ελέγχοντας χειροκίνητα τις τιμές Tm που λαμβάνονται.

Εάν η τιμή HPV Ct έχει υπολογιστεί και το δείγμα αναφέρεται ως "HPV:DNA Detected Check Tm result" από το λογισμικό ELITe InGenius®, αλλά οι τιμές Tm δεν έχουν υπολογιστεί, η ανάλυση της καμπύλης διάσπασης δεν πραγματοποιήθηκε αποτελεσματικά λόγω προβλημάτων με το δείγμα (μεταφορά αναστολέων στο εκλούμιο ή παρουσία άλλων παρεμβαλλόμενων SNPs), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει εσφαλμένα αποτελέσματα. Στην περίπτωση αυτή, το δείγμα πρέπει να επανεξεταστεί.

Τα δείγματα με απροσδιόριστη τιμή Ct για τον HPV-στόχο, με ή χωρίς ένα υπολογισμένο Tm, αναφέρονται ως "HPV:Check Tm and Bglobin mix result" από το λογισμικό ELITe InGenius®. Στην περίπτωση αυτή, το δείγμα θεωρείται

αρνητικό για HPV. Η εγκυρότητα του δείγματος εξαρτάται από την τιμή Ct β-globin (της β-σφαιρίνης) και την τιμή Tm που λαμβάνεται. Στην περίπτωση αυτή, εάν το αντίστοιχο αποτέλεσμα που λαμβάνεται με το β-globin PCR Mix αναφέρεται ως "Bglobin: DNA Detected Tm within range" από το λογισμικό ELITe InGenius®, το δείγμα θεωρείται έγκυρα αρνητικό.

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων για τη β-globin-στόχο που αναφέρονται ως "Invalid - Retest Sample" (Μη έγκυρο - Επανεξέταση δείγματος) από το λογισμικό ELITe InGenius δεν είναι κατάλληλα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Σε αυτή την περίπτωση, το ανθρώπινο DNA του δείγματος δεν ανιχνεύθηκε αποτελεσματικά λόγω προβλημάτων στο στάδιο της ενίσχυσης ή της εκχύλισης (αποικοδόμηση του DNA, απώλεια DNA κατά την εκχύλιση, μεταφορά αναστολέων στο εκλούμενο ή μη επαρκής ποσότητα DNA στο δείγμα), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει εσφαλμένα αποτελέσματα. Όταν ο όγκος του εκλυόμενου είναι επαρκής, το δείγμα που εκλύεται μπορεί να επανεξεταστεί μέσω μιας εξέτασης ενίσχυσης σε λειτουργία "PCR Only". Σε περίπτωση δεύτερου μη έγκυρου αποτελέσματος, το δείγμα πρέπει να επανεξεταστεί ξεκινώντας από την εκχύλιση ενός νέου κλάσματος/δείγματος χρησιμοποιώντας τη λειτουργία "Extract + PCR".

**Σημείωση:** τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με αυτή τη δοκιμή πρέπει να ερμηνεύονται λαμβάνοντας υπόψη όλα τα κλινικά δεδομένα και τα αποτελέσματα άλλων εργαστηριακών εξετάσεων που αφορούν τον ασθενή.

**Σημείωση:** όταν εγκρίνετε τα αποτελέσματα της ανάλυσης, να επαληθεύετε πάντα το αποτέλεσμα του οργάνου, ελέγχοντας τα διαγράμματα των καμπυλών τήξης στην αναφορά της εξέτασης. Οι θερμοκρασίες τήξης (Tm) κάθε γονότυπου HR HPV στην ανάλυση πρέπει να αντιστοιχούν στις κορυφές που εμφανίζονται στα διαγράμματα καμπύλης τήξης (βλ. πίνακα παρακάτω).

Οι συν-μολύνσεις δύο ή περισσότερων τύπων HPV, των οποίων οι κορυφές τήξης είναι γειτονικές, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δημιουργήσουν μια ενιαία κορυφή τήξης μεταξύ των τιμών Tm των μεμονωμένων τύπων HPV.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων αποθηκεύονται στη βάση δεδομένων και, εφόσον είναι έγκυρα, μπορούν να εγκριθούν (Result Display) (Εμφάνιση αποτελεσμάτων) από το εξουσιοδοτημένο προσωπικό ως "Administrator" (Διαχειριστής) ή "Analyst" (Αναλυτής), ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI. Από το παράθυρο "Result Display" είναι δυνατή η εκτύπωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του δείγματος ως "Sample Report" (Έκθεση δείγματος) και "Track Report" (Έκθεση παρακολούθησης).

Πίνακας γονοτύπων για το ELite InGenius®

HR HPV PCR Mix		
Τύπος HPV	Θερμοκρασία τήξης °C	
	από	έως
HPV68	72,0	73,3
HPV59	73,4	74,0
HPV66	74,2	75,2
HPV16	76,0	77,0
HPV35	77,3	78,3
HPV31	78,5	79,2
HPV56	79,4	80,1
HPV52	80,2	80,5
HPV39	80,6	81,0
HPV58	81,1	81,7
HPV51	81,9	82,3
HPV45	82,4	83,0
HPV33	84,8	85,4
HPV18	85,6	87,0

β-globin PCR Mix		
Target (Στόχος)	Θερμοκρασία τήξης °C	
	από	έως
β-globin	75,2	77,4

γ. Αναφορά αποτελεσμάτων δείγματος

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του δείγματος αποθηκεύονται στη βάση δεδομένων και μπορούν να εξαχθούν ως "Sample Report" (Έκθεση δείγματος) και "Track Report" (Έκθεση παρακολούθησης).

Το "Sample Report" (Έκθεση δείγματος) εμφανίζει τις λεπτομέρειες μιας εξέτασης ταξινομημένες ανά επιλεγμένο δείγμα (SID).

Το "Track Report" (Έκθεση παρακολούθησης) παρουσιάζει τις λεπτομέρειες μιας εξέτασης ανά επιλεγμένο Track.

Το "Sample Report" (Έκθεση δείγματος) και το "Track Report" (Έκθεση παρακολούθησης) μπορούν να εκτυπωθούν και να υπογραφούν από εξουσιοδοτημένο προσωπικό.

**Αντιμετώπιση Προβλημάτων για το ELITe InGenius®**

Τύπος δείγματος	Πρόβλημα / Σφάλμα	Πιθανή Αιτία	Λύση
Θετικός μάρτυρας	Μη έγκυρη αντίδραση θετικού μάρτυρα	Σφάλμα ρύθμισης οργάνου.	Ελέγχετε τη θέση του μίγματος PCR HR HPV Mix και του θετικού μάρτυρα. Ελέγχετε τους όγκους του μίγματος HR HPV PCR Mix και του θετικού μάρτυρα.
		Αποδόμηση θετικού μάρτυρα.	Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα θετικού μάρτυρα.
		Αποδόμηση μίγματος PCR.	Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα του μίγματος HR HPV PCR Mix.
		Σφάλμα οργάνου.	Επικοινωνήστε με την Τεχνική Υπηρεσία της ELITechGroup.
Αρνητικός μάρτυρας	Μη έγκυρη αντίδραση αρνητικού μάρτυρα	Σφάλμα ρύθμισης οργάνου.	Ελέγχετε τη θέση του μίγματος HR HPV PCR Mix και του αρνητικού μάρτυρα. Ελέγχετε τους όγκους του μίγματος HR HPV PCR Mix και του αρνητικού μάρτυρα.
		Επιμόλυνση του αρνητικού μάρτυρα.	Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα MBG νερού
		Επιμόλυνση του μίγματος PCR.	Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα του μίγματος HR HPV PCR Mix.
		Επιμόλυνση της θέσης εκχύλισης, των ραφιών (Racks) ή του Inventory Block.	Καθαρίστε τις επιφάνειες με υδατικά απορρυπαντικά, πλύνετε τις εργαστηριακές ποδιές, αντικαταστήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες και τα ρύγχη που χρησιμοποιούνται.
		Σφάλμα οργάνου.	Επικοινωνήστε με την Τεχνική Υπηρεσία της ELITechGroup.
Βιολογικό Δείγμα	Μη έγκυρη ή ασαφής αντίδραση δείγματος	Σφάλμα ρύθμισης οργάνου.	Ελέγχετε τη θέση του μίγματος PCR HR HPV Mix και του δείγματος. Ελέγχετε τους όγκους του μίγματος PCR HR HPV Mix και του δείγματος.
		Αποδόμηση μίγματος PCR.	Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα του μίγματος HR HPV PCR Mix.
		Παρεμβαλλόμενες ουσίες στο δείγμα.	Επαναλάβετε την ενίσχυση με αραίωση 1:2 σε MBG νερό του εκλουσόμενου δείγματος σε μία ανάλυση "PCR only".
		Μη επαρκής ποσότητα DNA στο δείγμα.	Επαναλάβετε την εικχύλιση και την ενίσχυση με ένα νέο κλάσμα του δείγματος σε μια ανάλυση "Extract + PCR".
		Σφάλμα οργάνου.	Επικοινωνήστε με την Τεχνική Υπηρεσία της ELITechGroup.
N.A.	Σφάλμα 30103	Πολύ υψηλή συγκέντρωση στόχου στο δείγμα.	Επαναλάβετε την αντίδραση ενίσχυσης του δείγματος με αραίωση 1:10 του εκλουσόμενου δείγματος σε MBG νερό σε μια ανάλυση "PCR Only".
N.A.	ΤΗ Σφάλμα, SDM Σφάλμα, Ct Σφάλμα	Δείγμα με μη φυσιολογικό σχήμα διαγράμματος.	Επαναλάβετε την αντίδραση ενίσχυσης του δείγματος με αραίωση 1:10 του εκλουσόμενου δείγματος σε MBG νερό σε μια ανάλυση "PCR Only".

## **Διαδικασία για HYRIS bCUBE™**

Η διαδικασία χρήσης του HPV Selfy HR με το HYRIS bCUBE™ αποτελείται από εννέα βήματα:

- A. απομόνωση νουκλεϊκού οξέος.
- B. Ρύθμιση "Recipe" (Σύνθεση).
- C. Ρύθμιση της ανάλυσης bAPP™.
- D. Ρύθμιση του φυσιγγίου.
- E. Παρασκευή των μιγμάτων ενίσχυσης PCR.
- Z. Συναρμολόγηση πλακών PCR.
- H. Έναρξη της ανάλυσης.
- Θ. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών.
- I. Ποιοτικός έλεγχος.

### **A. Απομόνωση νουκλεϊκού οξέος.**

Διάφοροι κατασκευαστές διαθέτουν κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιήστε τη σωστή ποσότητα δείγματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται. Τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης έχουν επικυρωθεί για χρήση με το HPV Selfy HR.

#### **α. Προετοιμασία τραχηλικών δειγμάτων κυτταρολογίας υγρής φάσης**

Πριν από την προεπεξεργασία με το Ulisse Faster DNA ή την εκχύλιση DNA, τα τραχηλικά κυτταρολογικά δείγματα που έχουν αποθηκευτεί στο Thin Prep® πρέπει να προετοιμαστούν όπως υποδεικνύεται παρακάτω:

- Αναδεύστε με αναδευτήρα τύπου vortex το φιαλίδιο Thin Prep® για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα για να ομογενοποιήσετε το δείγμα.
- Μεταφέρετε 1,5 ml τραχηλικού δείγματος κυτταρολογίας υγρής φάσης από το αρχικό φιαλίδιο Thin Prep® σε σωληνάριο Eppendorf 1,5 ml.
- Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο στα 9.000 g για 3 λεπτά.
- Αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό χειροκίνητα με την πιπέτα, προσέχοντας να μην αναρροφήσετε το κυτταρικό ίζημα. Τα πλεονάζοντα υπολείμματα του διαλύματος Thin Prep® μπορούν να προκαλέσουν την αναστολή της ακόλουθης αντίδρασης PCR.
- Προσθέστε 1 ml διαλύματος 1x αλατούχο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline) (PBS) στο κυτταρικό ίζημα και ανακινήστε το σωληνάριο στον αναδευτήρα τύπου vortex για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο στα 9.000 g για 3 λεπτά.
- Αφαιρέστε το υπερκείμενο υγρό χειροκίνητα με την πιπέτα, προσέχοντας να μην αναρροφήσετε το κυτταρικό ίζημα.
- Επαναιωρήστε σε 80 μL MBG νερό (molecular-biology grade water).

Τα επεξεργασμένα δείγματα μπορούν τώρα να υποβληθούν σε προεπεξεργασία με Ulisse Faster DNA ή να εκχυλιστούν με κιτ εκχύλισης DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τους.

#### **β. Προετοιμασία τραχηλικών και κολπικών επιχρισμάτων**

Πριν από την προεπεξεργασία με το Ulisse Faster DNA ή την εκχύλιση DNA, τα δείγματα κολπικού ή τραχηλικού επιχρισμάτος πρέπει να εναιωρηθούν ξανά όπως υποδεικνύεται παρακάτω:

- Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με ρύγχος(tip) μίας χρήσης για να μεταφέρετε 2 mL MBG νερού στο σωληνάριο των 5 mL.
- Βυθίστε το στυλεό με το δείγμα στο νερό με μια σειρά από γρήγορες κατακόρυφες κινήσεις- εν συνεχείᾳ και χωρίς

να βυθιστεί, περιστρέψτε το στυλεό πιέζοντάς το στα τοιχώματα του σωλήνα, ώστε να διευκολυνθεί η αποδέσμευση όσο το δυνατόν περισσότερου υλικού.

- Ομογενοποιήστε το εναιώρημα αναδεύοντάς το σε αναδευτήρα τύπου vortex για 10-20 δευτερόλεπτα και επιβεβαιώστε ότι δεν υπάρχει ορατό ίζημα.
- Τα έτοιμα δείγματα μπορούν τώρα να υποβληθούν σε προεπεξεργασία με Ulisse Faster DNA ή να εκχυλιστούν με κιτ εκχύλισης DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τους.

#### γ. Συμβατά κιτ απομόνωσης

Τα ακόλουθα κιτ απομόνωσης έχουν επικυρωθεί για χρήση με το HPV Selfy HR:

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Inc.; κωδικός #51304) ; εκλούονται σε νερό MBG χωρίς RNase και DNase.
- Reliaprep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Corp.; κωδικός #A5082).
- Ulisse Faster DNA (Ulisse Biomed, S.p.A.; κωδικός #UBM0014).

## B. Ρύθμιση "Recipe"

1. Ανοίξτε το πρόγραμμα περιήγησης και αναζητήστε <https://bapp2.HYRIS.net>.
2. Συνδεθείτε στο HYRIS bAPP™ επιλέγοντας τη χώρα (π.χ. «Ευρώπη») και εισάγοντας το όνομα χρήστη και τον κωδικό πρόσβασης.
3. Κάντε κλικ στο μενού "Recipes".
4. Κάντε κλικ στο "New Recipe" (Νέα Σύνθεση).
5. Συμπληρώστε όλα τα πεδία για να ρυθμίσετε τη σύνθεση με τις πληροφορίες που αναφέρονται παρακάτω.
6. Ονομάστε τη σύνθεση με ένα μοναδικό όνομα για να τη συσχετίσετε με το κιτ που χρησιμοποιείται, για παράδειγμα «Ulisse BioMed – UBM0013 – HPV Selfy HR».

### Παράμετροι για τη ρύθμιση της σύνθεσης:

Detection channel (Κανάλι ανίχνευσης)	Yes/No (Ναι/όχι)	Intensity (Ενταση)	Exposition (Εκθεση)		
FAM	Yes (Ναι)	100%	50%		
<b>Well type (Τύπος βοθρίου)</b>					
<b>Name (Όνομα)</b>		<b>Description (Περιγραφή)</b>			
HR HPV PCR Mix		14 HR HPV			
$\beta$ -globin PCR Mix		$\beta$ -globin			
<b>Sample type (Τύπος δείγματος)</b>					
<b>Name (Όνομα)</b>		<b>Description (Περιγραφή)</b>			
PCHR		Θετικός Μάρτυρας			
NC		Αρνητικός Μάρτυρας			
Sample		Δείγμα			
Phase (Βήμα)	Phase (Στάδιο)	Step bAPP™ recipe (Βήμα bAPP™ σύνθεσης)	Time (Χρόνος)	Temperature (Θερμοκρασία)	Data collection (Συλλογή Δεδομένων)
PCR	Ενεργοποίηση πολυμεράσης	Βήμα σταθερής θερμοκρασίας	30 sec	98,0 °C	-
	Αποδιάταξη	Επαναλάβετε 36 κύκλους	5 sec	98,0 °C	-
	Επαναδιάταξη		10 sec	61,5 °C	-
	Επιμήκυνση		5 sec	72,0 °C	yes (ναι)
Melting curve (Καμπύλη τήξης)	Αποδιάταξη	Βήμα σταθερής θερμοκρασίας	15 sec	95,0 °C	-
	Έναρξη τήξης	Τήξη	60 sec	60,0 °C	-
	Βέλτιστος ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας/χρόνο ενυδάτωσης <sup>3</sup>		0,033°C / sec		yes (ναι)
	Τέλος τήξης		1 sec	95,0 °C	-

Για τη ρύθμιση της διάταξης του φυσιγγίου και την υποβοηθούμενη ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο οδηγιών του HYRIS bAPP™.

<sup>3</sup> Για να επιτευχθεί ακριβής γονοτυπικός προσδιορισμός των τύπων HPV που υπάρχουν στο δείγμα, ρυθμίστε το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας <0,2°C (η βέλτιστη αύξηση είναι 0,1°C).

## **Γ. Ρύθμιση ανάλυσης bAPP™**

1. Συνδεθείτε στο HYRIS bAPP™ (<https://bapp2.HYRIS.net>) με όνομα χρήστη και κωδικό πρόσβασης.
2. Ξεκινήστε μια νέα ανάλυση από το μενού Analysis (Ανάλυση) κάνοντας κλικ στο "Create analysis" (Δημιουργία ανάλυσης).
3. Συμπληρώστε τη σελίδα "General Information" (Γενικές πληροφορίες):
  - όνομα της ανάλυσης.
  - Περιγραφή (παρτίδα του κιτ).
4. Επιλέξτε το Use Custom Recipe (Χρήση προσαρμοσμένης συνταγής).
5. Επιλέξτε τη συνταγή από το αναπτυσσόμενο μενού: Ulisse BioMed – UBM0013 – HPV Selfy HR.
6. Κάντε κλικ στο "Continue" (Συνέχεια) για να συνεχίσετε.

## **Δ. Ρύθμιση του φυσιγγίου**

1. Επιλέξτε τον τύπο του φυσιγγίου μεταξύ των διατάξεων 16 και 36 κοιλωμάτων.
2. Για κάθε δείγμα, σαρώστε ή πληκτρολογήστε το αναγνωριστικό δείγματος στο πεδίο "Sample Name" (Όνομα δείγματος).
3. Όταν ολοκληρώσετε την εισαγωγή των αναγνωριστικών, πατήστε "Continue" (Συνέχεια).
4. Ελέγχτε τη θέση των δειγμάτων στη διάταξη του φυσιγγίου.
5. Αποθηκεύστε την αρχικοποιημένη ανάλυση για αργότερα, σύροντας τον επιλογέα πάνω από το κουμπί "Finish" (Τέλος).
6. Επιλέξτε "Save" (Αποθήκευση).

**Σημείωση:** συνιστάται να ταυτίζετε με το κόκκινο χρώμα τα βιοθρία που προορίζονται για τους Θετικούς Μάρτυρες (ένα για κάθε μίγμα) και με το μπλε χρώμα τα βιοθρία που προορίζονται για τους Αρνητικούς Μάρτυρες (ένα για κάθε μίγμα).

**Σημείωση:** Αυτό το κιτ είναι συμβατό με φυσίγγια 16 και 36 κοιλωμάτων.

## **E. Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR**

Αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου ( $\sim + 25^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, διατηρήστε όλα τα αντιδραστήρια σε πάγο.

Προετοιμάστε δύο σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1,5 mL, τα οποία θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.

Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix : για κάθε εξέταση, συνδυάστε τα ακόλουθα συστατικά που επαρκούν για τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να εξεταστούν συν ένα Θετικό και ένα Αρνητικό Μάρτυρα. Όλοι οι όγκοι περιλαμβάνουν 10% πλεόνασμα λόγω σφάλματος πιπέτας.

<b>HR HPV PCR Mix</b>		
<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα</b>	<b>Όγκος για "n" δείγματα συν 2 μάρτυρες</b>
Reaction Mix (DNA)	12,00 μL	13,20 x (n + 2) μL
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	0,60 μL	0,66 x (n + 2) μL
HR HPV mix	5,40 μL	5,94 x (n + 2) μL
Συνολικός Όγκος	18,00 μL	-
<b>β-globin PCR Mix</b>		
<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα</b>	<b>Όγκος για "n" δείγματα συν 2 μάρτυρες</b>
Reaction Mix (DNA)	12,00 μL	13,20 x (n + 2) μL
MgCl <sub>2</sub> 25mM διάλυμα	0,60 μL	0,66 x (n + 2) μL
β-Globin mix (Μίγμα β-σφαιρίνης)	5,40 μL	5,94 x (n + 2) μL
Συνολικός Όγκος	18,00 μL	-

Στο τέλος, ανακατεύουμε τα μείγματα με vortex και φυγοκεντρούμε για λίγο, αποφεύγουμε φυσαλίδων.

## Z. Συναρμολόγηση πλάκας PCR

Γεμίστε 18 μL μίγματος HR HPV PCR και 18 μL μίγματος PCR β-σφαιρίνης για κάθε δείγμα σε δύο ξεχωριστά κοιλώματα.

Γεμίστε 2 μL από κάθε βιολογικό δείγμα (S1, S2, S3, κ.λπ.), από τον Θετικό Μάρτυρα (PC) και από τον Αρνητικό Μάρτυρα (NC) δύο φορές : μία φορά στο βοθρίο με το HR HPV PCR Mix και μία φορά στο βοθρίο με το β-globin PCR Mix, όπως υποδεικνύεται στο παρακάτω σχήμα, όπου το μίγμα HR HPV PCR υποδεικνύεται με μπλε και το μίγμα β-σφαιρίνης PCR με κίτρινο (Εικόνα A για φυσίγγιο 16 κοιλοτήτων, Εικόνα B για φυσίγγιο 36 κοιλοτήτων).



Στεγανοποιήστε την πλάκα PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλες αυτοκόλλητες ταινίες, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τοποθετήστε το φυσίγγιο στο HYRIS bCUBE™.

**Σημείωση:** Μη χρησιμοποιείτε καμία αυτοκόλλητη μεμβράνη που δεν περιλαμβάνεται στη συσκευασία των φυσιγγίων που παρέχονται από την HYRIS, S.r.l.. Μην τοποθετείτε το φυσίγγιο μέσα στο HYRIS bCUBE™ χωρίς να το έχετε προηγουμένως σφραγίσει με την αυτοκόλλητη μεμβράνη αλουμινίου.

## **Η. Έναρξη της ανάλυσης**

1. Ανοίξτε το μενού «Analysis» του HYRIS bAPP™.
2. Επιλέξτε την αρχικοποιημένη ανάλυση.
3. Κάντε κλικ στο κουμπί "Launch Analysis" (Εκκίνηση ανάλυσης).
4. Επιλέξτε τον σειριακό κωδικό (S/N) του bCUBE™.
5. Κάντε κλικ στο κουμπί «GO».
6. Στο τέλος της ανάλυσης αφαιρέστε το φυσίγγιο από το bCUBE™ και απορρίψτε το σύμφωνα με τους τοπικούς και κρατικούς κανονισμούς.
7. Στο τέλος της ανάλυσης, τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην οθόνη "PCR" του HYRIS bAPP™.

Ολόκληρη η διαδικασία περιγράφεται επίσης στον Πρακτικό Οδηγό Χρήσης (Practical User Guide), που είναι διαθέσιμος στο HYRIS bAPPTM και στο

Κέντρο βοήθειας HYRIS <https://support.HYRIS.net>.

## **Θ. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών**

Οι καταγεγραμμένες τιμές του φθορισμού στις αντιδράσεις ενίσχυσης πρέπει να αναλύονται από το λογισμικό του οργάνου. Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιείται με το λογισμικό του συστήματος του οργάνου και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στο τέλος της ανάλυσης τα αποτελέσματα εμφανίζονται στην οθόνη "PCR" του HYRIS bAPP™ "PCR" (οθόνη καμπυλών ενίσχυσης της ανάλυσης), η οποία δείχνει τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα και τον κύκλο κατωφλίου (Ct).

Οι τιμές του φθορισμού επιτρέπουν τον προσδιορισμό του αριθμού των κύκλων ενίσχυσης του δείγματος, τον αριθμό των κύκλων κατά τον οποίο ο φθορισμός φθάνει στην κατώτατη τιμή. Πριν ξεκινήσετε την ανάλυση, ρυθμίστε το κατώτερο όριο (τιμή κατωφλίου) φθορισμού ως εξής, ανατρέχοντας στο εγχειρίδιο οδηγιών HYRIS bAPP™.

Μίγμα PCR	Κατώτατο όριο (ενίσχυση   καμπύλη τήξης)
HR HPV PCR Mix	10.000   5.000
β-globin PCR Mix	10.000   5.000

Οι κύκλοι ενίσχυσης εξόδου (Ct) εκφράζονται ως αριθμητική τιμή μεταξύ 1 και 36. Εάν το αποτέλεσμα Ct είναι "Undetermined" (Απροσδιόριστο) σημαίνει ότι δεν ανιχνεύθηκε σήμα μεγαλύτερο της προκαθορισμένης κατώτατης τιμής. Για την ερμηνεία του αποτελέσματος, ανατρέξτε στον «Πίνακα ερμηνείας για το HYRIS bCUBETM» στην επόμενη σελίδα.

**Πίνακας ερμηνείας για το HYRIS bCUBE™**

Ct HR HPV PCR Mix	Ct β-globin PCR Mix	Tm HR HPV PCR Mix	Tm β-globin PCR Mix	Κατάστα ση δοκιμής	Αποτέλεσμα	Ερμηνεία	Προτεινόμενη ενέργεια
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Ανιχνεύτηκε HPV	Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου - ο γονοτυπικός προσδιορισμός είναι δυνατός	Προσδιορίστε το γονότυπο του δειγματος χρησιμοποιώντας τον "Πίνακα γονοτύπων για το HYRIS bCUBE™"
Απροσδιόριστο (Undetermined)	Αριθμητική τιμή < 30	-	Εντός ή εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Μη ανιχνεύσιμος HPV	Αρνητικό	-
Αριθμητική τιμή	Απροσδιόριστο (Undetermined)	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	-	Έγκυρη (Valid)	Ανιχνεύτηκε HPV - Απροσδιόριστος (οι) γονότυπος(οι)	Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου - ο γονοτυπικός προσδιορισμός δεν είναι δυνατός	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™»
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Ανιχνεύτηκε HPV - Απροσδιόριστος (οι) γονότυπος(οι)	Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου - ο γονοτυπικός προσδιορισμός δεν είναι δυνατός	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™»
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εντός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Έγκυρη (Valid)	Μη ανιχνεύσιμος HPV	Αρνητικό	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™»
Αριθμητική τιμή	Αριθμητική τιμή	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Μη έγκυρη (Invalid)	Απροσδιόριστος HPV	-	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™»
Αριθμητική τιμή	Απροσδιόριστο (Undetermined)	Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	-	Μη έγκυρη (Invalid)	Απροσδιόριστος HPV	-	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™»
Απροσδιόριστο (Undetermined)	Αριθμητική τιμή > 30 ή απροσδιόριστο (undetermined)	-	Δεν έχει υπολογιστεί / εντός ή εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων"	Μη έγκυρη (Invalid)	Απροσδιόριστος HPV	-	Δείτε «Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™»

Είναι δυνατό να ρυθμιστεί η υποβοηθούμενη ερμηνεία των αποτελεσμάτων ώστε το σύστημα να ερμηνεύει τις τιμές Ct των δειγμάτων και των μαρτύρων, καθώς και τις καμπύλες τήξης, και να προσδιορίζει ένα αποτέλεσμα που ερμηνεύεται όπως:

- ANIXNEYTHKE HPV(DETECTED HPV)
- MH ANIXNEYSIMOS HPV (UNDETECTED HPV).

Για να ρυθμίσετε την υποβοηθούμενη ερμηνεία και τις ερμηνευτικές επισημάνσεις,, ανατρέξτε στον "Πίνακα ερμηνείας για το HYRIS bCUBE™".

Η διαδικασία για τη ρύθμιση της υποβοηθούμενης ερμηνείας είναι διαθέσιμη στο εγχειρίδιο HYRIS bAPP™, στη διεύθυνση <https://support.hyris.net> ή μπορείτε να επικοινωνήσετε με τον ειδικό σας στο HYRIS στη διεύθυνση [support@hyris.net](mailto:support@hyris.net).

Κάθε δείγμα που έχει έγκυρο και θετικό αποτέλεσμα για την παρουσία ενός ή περισσότερων τύπων HPV υψηλού κινδύνου, μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω για να προσδιοριστεί συγκεκριμένα ποιος ή ποιοι τύποι HPV υψηλού κινδύνου έχουν ανιχνευθεί.

Η δοκιμή HPV Selfy HR επιτρέπει τη διάκριση 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου, ήτοι: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68, μέσω της ανάλυσης της θερμοκρασίας τήξης (Tm) του ενισχυμένου αναλύτη DNA. Στη δοκιμή HPV Selfy HR, καθένας από τους τύπους HPV υψηλού κινδύνου χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο διάστημα θερμοκρασίας τήξης (Tm).

Οι συν-μολύνσεις δύο ή περισσότερων τύπων HPV υψηλού κινδύνου, των οποίων οι κορυφές τήξης είναι γειτονικές, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δημιουργήσουν μια ενιαία κορυφή τήξης μεταξύ των τιμών Tm των μεμονωμένων τύπων HPV υψηλού κινδύνου.

Η θερμοκρασία τήξης Tm μπορεί να επηρεαστεί από ορισμένους παράγοντες που σχετίζονται με το βιολογικό δείγμα, κυρίως από το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο απομόνωσης, καθώς και από το όργανο PCR. Συνιστάται να ελέγχετε ότι τα σήματα Tm που προέρχονται από τον θετικό μάρτυρα αντιστοιχούν σε εκείνα που αναφέρονται στον "Πίνακα γονοτύπων για το HYRIS bCUBE™" στην επόμενη σελίδα.

Η υποβοηθούμενη ερμηνεία και ανάλυση του γονότυπου μπορεί επίσης να ρυθμιστεί για κάθε δείγμα στην υποβοηθούμενη ερμηνεία του HYRIS bAPP™. Οι αριθμητικές τιμές του Tm που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα μπορούν να συσχετίστονται με έναν ακριβή γονότυπο και το αποτέλεσμα μπορεί να εμφανιστεί αυτόματα στην ενότητα "RESULTS" (ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ) του HYRIS bAPP™ ή σε μια αναφορά PDF.

Πίνακας γονοτύπων για το HYRIS bCUBE™

HR HPV PCR Mix		
Τύπος HPV	Θερμοκρασία τήξης °C	
	από	έως
HPV68	71,80	73,19
HPV59	73,20	73,90
HPV66	74,00	75,00
HPV16	75,20	77,00
HPV35	77,20	78,00
HPV31	78,20	79,10
HPV56	79,11	79,75
HPV52	79,76	80,09
HPV39	80,16	80,60
HPV58	80,80	81,30
HPV51	81,50	81,80
HPV45	82,00	83,00
HPV33	84,00	84,99
HPV18	85,00	86,50

β-globin PCR Mix		
Στόχος	Θερμοκρασία τήξης °C	
	από	έως
β-globin	74,00	77,00

## I. Ποιοτικός έλεγχος

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων της δοκιμής, είναι απαραίτητο να επαληθευτεί η εγκυρότητα της εκτέλεσης PCR (ανάλυσης). Για το σκοπό αυτό, απαιτείται ένας Αρνητικός Μάρτυρας και ένας Θετικός Μάρτυρας για κάθε εκτέλεση ενίσχυσης PCR, τόσο για το μίγμα HR HPV PCR mix όσο και για το μίγμα β-globin PCR mix. Ο Αρνητικός Μάρτυρας χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί ότι κανένα συστατικό δεν έχει επιμολυνθεί με νουκλεϊκά οξέα κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων ενίσχυσης. Ο Θετικός Μάρτυρας χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επίδοσης της ανάλυσης. Η ανάλυση θεωρείται έγκυρη όταν πληρούνται και οι δύο ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Ο Θετικός Μάρτυρας HPV χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο μίγμα HR HPV PCR mix και στο μίγμα β-globin PCR β-globin mix.
- Ο Αρνητικός Μάρτυρας χαρακτηρίζεται από μη ύπαρξη καμπυλών ενίσχυσης ούτε στο μίγμα HR HPV PCR mix ούτε στο μίγμα β-globin PCR mix.

Για μια σωστή ανάλυση γονότυπου, είναι απαραίτητο να ανιχνευθεί τουλάχιστον μία από τις τρεις κορυφές τήξης του Θετικού Μάρτυρα (που εξετάστηκε με το HR HPV PCR) και της κορυφής τήξης του Θετικού Μάρτυρα (που εξετάστηκε με το β-σφαιρίνης PCR Mix ), εντός των θερμοκρασιών τήξης που υποδεικνύονται παρακάτω:

PCR Mix	Στόχος Θετικού Μάρτυρα	Θερμοκρασία τήξης °C	
		από	έως
HR HPV PCR Mix	HPV68	71,80	73,19
	HPV56	79,11	79,75
	HPV18	85,00	86,50
β-globin PCR Mix	β-globin	74,00	77,00

Εάν ανιχνευθεί σήμα ενίσχυσης που υπερβαίνει την κατώτατη τιμή για το μίγμα HR HPV PCR mix ή για το μίγμα PCR β-globin mix στον Αρνητικό Μάρτυρα, η πλάκα ακυρώνεται και η δοκιμή πρέπει να επαναληφθεί μετά την εξάλειψη της πηγής επιμόλυνσης. Καθαρίστε το χώρο προετοιμασίας του δείγματος PCR και επαναλάβετε τη δοκιμή με νέο κιτ. Βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι του οργάνου έχουν ρυθμιστεί σωστά.

Εάν παρατηρηθούν ανωμαλίες στην ενίσχυση του Θετικού Μάρτυρα, η πλάκα ακυρώνεται και πρέπει να επαναληφθεί. Στην περίπτωση αυτή επικοινωνήστε με τον προμηθευτή του προϊόντος.

Εάν παρατηρηθούν ανωμαλίες στην καμπύλη τήξης του Θετικού Μάρτυρα, η πλάκα είναι έγκυρη, αλλά ο γονοτυπικός προσδιορισμός δεν μπορεί να είναι αξιόπιστος. Στην περίπτωση αυτή επικοινωνήστε με τον προμηθευτή του προϊόντος.

## Αντιμετώπιση προβλημάτων για το HYRIS bCUBE™

Τύπος δείγματος	Πρόβλημα / σφάλμα	Πιθανή Αιτία	Πιθανή λύση
Θετικός Μάρτυρας	Μη έγκυρος Θετικός Μάρτυρας  Δεν υπάρχουν καμπύλες ενίσχυσης	Σφάλμα στη χρήση της πιπέτας.	Προσέξτε όταν διανέμετε αντιδραστήρια στα βοθρία της μικροπλάκας(microplate).

Σφάλμα σύνθεσης μίγματος PCR.

Ακατάλληλη αποθήκευση αντιδραστηρίων.

Παρουσία DNase.

Αποτυχία PCR.

Σφάλμα κατά την εισαγωγή του φυσιγγίου.

Φυσαλίδες στην αντίδραση PCR.

Βεβαιωθείτε ότι έχετε εκτελέσει σωστά τις οδηγίες που περιγράφονται στην παράγραφο «Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR».

Χρησιμοποιήστε ένα νέο κλάσμα αντιδραστηρίων ή ένα νέο κιτ.

Χρησιμοποιήστε αναλώσιμα ελεύθερα DNase.

Βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι του οργάνου είναι σωστές.

Βεβαιωθείτε ότι έχετε εισαγάγει σωστά το φυσίγγιο στο bCUBE™ στη σωστή πλευρά.

Επαναλάβετε τη δοκιμή διασφαλίζοντας ότι θα αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στο βοθρίο.

## 4. Όρια

Το HPV Selfy HR ανιχνεύει το DNA από 14 τύπους HPV υψηλού κινδύνου (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Αυτή η εξέταση δεν ανιχνεύει DNA άλλων τύπων HPV. Το HPV Selfy HR παρέχει ποιοτικό αποτέλεσμα.

Το HPV Selfy HR πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος, κολπικού επιχρίσματος και τραχηλικά δείγματα κυτταρολογίας υγρής φάσης. Συμβουλευτείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή για τις τεχνικές προδιαγραφές, τους περιορισμούς, τις προειδοποιήσεις και τις οδηγίες χρήσης των συσκευών συλλογής. Η επίδοση της μεθόδου δεν έχει αξιολογηθεί με άλλους τύπους δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το συγκεκριμένο προϊόν εξαρτώνται από την κατάλληλη ταυτοποίηση, συλλογή, μεταφορά, αποθήκευση και επεξεργασία των δειγμάτων. Για την αποφυγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων, είναι επομένως απαραίτητο να είστε προσεκτικοί κατά τη διάρκεια αυτών των βημάτων και να ακολουθείτε προσεκτικά τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται με τα κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων.

Λόγω της υψηλής αναλυτικής ευαισθησίας της, η μέθοδος ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο που χρησιμοποιείται σε αυτό το προϊόν είναι ευαίσθητη στις διασταυρούμενες επιμολύνσεις από τα θετικά δείγματα, από τον θετικό μάρτυρα και από τα ίδια προϊόντα ενίσχυσης. Οι διασταυρούμενες επιμολύνσεις προκαλούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ο σχεδιασμός του προϊόντος μπορεί να περιορίσει τις διασταυρούμενες επιμολύνσεις, ωστόσο, αυτές μπορούν να αποφευχθούν μόνο με ορθές εργαστηριακές πρακτικές και με την τίρηση των παρόντων οδηγιών χρήσης.

Η παρουσία αίματος μπορεί να επηρεάσει το HPV Selfy HR.

Ένα αρνητικό αποτέλεσμα που λαμβάνεται με αυτό το προϊόν σημαίνει ότι το DNA-στόχος δεν ανιχνεύεται στο DNA που εκχυλίζεται από το δείγμα. Δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι το DNA-στόχος έχει χαμηλότερη συγκέντρωση από το όριο ανίχνευσης του προϊόντος (βλέπε επίδοση του προϊόντος). Στην περίπτωση αυτή, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ψευδώς αρνητικό.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα των αναλύσεων μπορεί να επηρεαστούν από ακατάλληλη συλλογή δειγμάτων, τεχνικά σφάλματα ή ανάμεικη δειγμάτων, καθώς και από την παρουσία παρεμβαλλόμενων ουσιών.

Σε περίπτωση συν-μολύνσεων, η ευαισθησία του ενός στόχου μπορεί να επηρεαστεί από την ενίσχυση ενός άλλου στόχου.

Πιθανοί πολυμορφισμοί στην περιοχή του DNA-στόχου που καλύπτεται από τους εκκινητές (primers) και τους ανιχνευτές(probes) του προϊόντος μπορεί να επηρεάσουν την ανίχνευση του DNA-στόχου.

Ο επιπολασμός της HPV λοίμωξης σε έναν πληθυσμό μπορεί να επηρεάσει την επίδοση. Η θετική προγνωστική αξία μειώνεται όταν εξετάζονται πληθυσμοί με χαμηλή συχνότητα ή άτομα χωρίς κίνδυνο μόλυνσης.

Η λοίμωξη από HPV δεν αποτελεί ένδειξη της παρουσίας κυτταρολογικής αλλοίωσης υψηλού βαθμού (HSIL) ή προκαρκινικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (CIN), ούτε συνεπάγεται ότι θα αναπτυχθεί αλλοίωση CIN2/3 ή καρκίνος. Οι περισσότερες γυναίκες που έχουν μολυνθεί με έναν ή περισσότερους τύπους HPV υψηλού κινδύνου δεν αναπτύσσουν CIN2 / 3 ή καρκίνο.

Ένα αρνητικό τεστ HPV δεν αποκλείει την πιθανότητα εμφάνισης κυτταρολογικής αλλοίωσης υψηλού βαθμού (HSIL) ή προκαρκινικής ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης CIN2/3 ή καρκίνου. Ένα μικρό ποσοστό τέτοιων αλλοίωσεων και όγκων εμφανίζεται σε γυναίκες που βρέθηκαν αρνητικές ως προς τον HPV με βάση τις διαθέσιμες τεχνολογίες.

Το HPV Selfy HR θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κλινικές πληροφορίες από άλλες διαγνωστικές και προσυμπτωματικές εξετάσεις, ιατρικό έλεγχο και πλήρες ιατρικό ιστορικό, σύμφωνα με την κατάλληλη διαχείριση του ασθενούς. Το HPV Selfy HR δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως μοναδική μέθοδος διάγνωσης και θεραπείας των ασθενών.

Όπως συμβαίνει με κάθε άλλη διαγνωστική ιατρική συσκευή, υπάρχει ένας υπολειπόμενος κίνδυνος λανθασμένων, ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με αυτό το προϊόν. Αυτός ο υπολειπόμενος κίνδυνος δεν μπορεί να εξαλειφθεί ή να μειωθεί περαιτέρω. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο υπολειπόμενος κίνδυνος θα μπορούσε να συμβάλει σε λανθασμένες αποφάσεις με δυνητικά επικίνδυνες συνέπειες για τον ασθενή.

Το HPV Selfy HR δεν έχει αξιολογηθεί για τη διαχείριση γυναικών με προηγούμενες κυτταρολογικές ή ιστολογικές ανωμαλίες, υστερεκτομή, ηλικίας κάτω των 25 ετών ή άνω των 64 ετών, μετεμμηνοπαυσιακές ή με άλλους παράγοντες κινδύνου (HIV +, ανοσοκατασταλμένες, εκτεθειμένες σε διαιθυλεστυλεστρόλη, με προηγούμενα σεξουαλικώς μεταδιδόμενα νοσήματα).

## 5. Επίδοση προϊόντος

Όλα τα δεδομένα των χαρακτηριστικών επίδοσης προσδιορίστηκαν με τη χρήση χειροκίνητης ερμηνείας των αποτελεσμάτων και του συστήματος QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc). Έχουν διαπιστωθεί παρόμοιες επιδόσεις από ισοδύναμες μελέτες στο CFX96™ Real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc.), στο AriaDx Real-time PCR System (Agilent Technologies, Inc.), στο ELITe InGenius® (ELITechGroup S.p.A.) και HYRIS bCUBE™ (HYRIS, S.r.l.).

### Αναλυτική ευαισθησία

Η αναλυτική ευαισθησία ή το όριο ανίχνευσης (Limit of detection) (LoD) ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που >95% των εξεταζόμενων δειγμάτων παράγει θετικό αποτέλεσμα. Το LoD του HPV Selfy HR προσδιορίστηκε με την προσθήκη πλασμιδίων HPV πλήρους γονιδιώματος σε γνωστή συγκέντρωση. Το LoD του HPV Selfy HR είναι 100 αντίγραφα/αντίδραση για όλους τους τύπους HPV, εκτός από τον HPV 51 (1.000 αντίγραφα/αντίδραση).

### Αναλυτική εξειδίκευση (διασταυρούμενη αντιδραστικότητα)

Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της ανάλυσης HPV Selfy HR αξιολογήθηκε μέσω δοκιμής μιας ομάδας 17 οργανισμών (βακτηρίων, ιών και μυκήτων), 20 άλλων τύπων HPV (ίδιας πιθανότητας υψηλού όσο και χαμηλού κινδύνου) και ανθρώπινου DNA. Δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε αυτή την ομάδα παθογόνων.

Οργανισμός	Συγκέντρωση	Αποτέλεσμα   Ct
Καμπυλοβακτήριο της νήστιδας (Campylobacter jejuni)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ωόδιο το λευκάζον (Candida albicans)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Χλαμύδια του τραχώματος (Chlamydia trachomatis)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Κυτταρομεγαλοϊός (Cytomegalovirus)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Αιμόφιλος του κόλπου (Gardnerella vaginalis)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Απλός ερπετοϊός τύπου 1 (Herpes Simplex 1)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Απλός ερπετοϊός τύπου 2 (Herpes Simplex 2)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
HIV-1 (dsDNA gag-env-pol)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA (Human genomic DNA)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
HPV6, 11, 26, 40, 41, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 61, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 82	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Μυκόπλασμα των γεννητικών οργάνων (Mycoplasma genitalium)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Μυκόπλασμα Hominis (Mycoplasma hominis)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Neisseria flava	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ναϊσσέρια της γονόρροιας (Neisseria gonorrhoeae)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ναϊσσέρια της μηνιγγίτιδας (Neisseria meningitidis)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ωχρά σπειροχαίτη ή Τρεπόνημα το ωχρόν (Treponema pallidum)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Τριχομονάδα του κόλπου (Trichomonas vaginalis)	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ureaplasma parvum	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό
Ureaplasma urealyticum	10 <sup>4</sup> αντίγραφα / αντίδραση	Αρνητικό

## Παρεμβολές

Το HPV Selfy HR χρησιμοποιούει καθιερωμένες συμβατικές μεθόδους εικήλισης νουκλεϊκών οξέων και με βάση την εμπειρία μας με άλλες παρόμοιες δοκιμές, δεν αναμένουμε παρεμβολές από κοινές ενδογενείς ουσίες.

Όσον αφορά την παρεμβολή ουσιών στην περίπτωση που το HPV Selfy HR χρησιμοποιούεται σε απευθείας λειτουργία PCR μετά από προεπεξεργασία DNA με Ulisse Faster, έχουν διερευνηθεί οι ακόλουθες ουσίες για παρεμβολή. Δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμβολή για κολπικές πλύσεις που περιέχουν 0,2% υαλουρονικό οξύ, έως και 50% συγκέντρωση- ενώ το αίμα έχει αναστατική ισχύ ήδη σε συγκέντρωση 10%. Άλλες ουσίες παρεμβολής δεν εξετάστηκαν.

## Αναλυτική αναπαραγωγιμότητα

Η αναπαραγωγιμότητα/αξιοπιστία του HPV Selfy HR προσδιορίστηκε με την ανάλυση πλασμιδίων HPV πλήρους γονιδιώματος- κάθε σύγκριση διενεργήθηκε από διάφορους χειριστές, καθένας από τους οποίους χρησιμοποίησε διαφορετικά μηχανήματα PCR. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) εντός της ανάλυσης που υπολογίζεται στους κύκλους ενίσχυσης (Ct) είναι χαμηλότερος από 5%.

## Αναλυτική επαναληψιμότητα

Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) εντός της ανάλυσης για την τιμή Ct μετρήθηκε σε 10 επαναλήψεις διαφορετικών πλασμιδίων HPV πλήρους γονιδιώματος αραιωμένων σε 1.000 αντίγραφα / αντίδραση, τα οποία αναλύθηκαν στην ίδια ανάλυση PCR. Όλα οι συντελεστές CV είναι χαμηλότεροι από 5%.

## Κλινική επίδοση

Η κλινική επίδοση του HPV Selfy HR αξιολογήθηκε σε 98 τραχηλικά δείγματα κυτταρολογίας υγρής φάσης από γυναίκες ηλικίας άνω των 30 ετών και ιστολογίας >CIN2 και σε 791 τραχηλικά δείγματα κυτταρολογίας υγρής φάσης από γυναίκες ηλικίας άνω των 30 ετών, με αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο και προηγούμενο αρνητικό τεστ Παπανικολάου. Όλα τα δείγματα είχαν προηγουμένως ελεγχθεί με Digene HC2 high-risk HPV DNA (Qiagen, Inc.; κωδικός #5197-1330). Αυτά τα δείγματα αναλύθηκαν με το HPV Selfy HR μετά από εικήλιση με το σύστημα ReliaprepTM Blood gDNA Miniprep System (Promega, Corp.; κωδικός #A5082). Η σχετική ευαισθησία (relative sensitivity) του HPV Selfy HR σε σύγκριση με το Digene HC2 high-risk HPV DNA (Qiagen, Inc.; κωδικός #5197-1330) που πραγματοποιήθηκε στα ίδια δείγματα είναι 1,07 (87/98 HPV Selfy HR έναντι 81/98 HC2), ενώ η σχετική ειδικότητα (relative specificity) είναι 0,92 (680/791 HPV Selfy HR έναντι 742/791 HC2).

Ένα υποσύνολο 144 τραχηλικών δειγμάτων κυτταρολογίας υγρής φάσης (72 θετικά και 72 αρνητικά) προεπεξεργάστηκαν επίσης με Ulisse Faster DNA (Ulisse Biomed, S.p.A.; κωδικός #UBM0014) και στη συνέχεια αναλύθηκαν με HPV Selfy HR- η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 100%.

119 αυτοσυλλεγόμενα κολπικά επιχρισμάτα που προέρχονταν από γυναίκες με CIN2+ και 791 ζεύγη αυτοσυλλεγόμενα κολπικά επιχρισμάτα που συλλέχθηκαν από γυναίκες με αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο και προηγούμενο αρνητικό τεστ Παπανικολάου αναλύθηκαν με HPV Selfy HR σε σύγκριση με HPV Selfy HR που εκτελέστηκε σε ζεύγη τραχηλικών δειγμάτων κυτταρολογίας υγρής φάσης που συλλέχθηκαν από ιατρό. Το HPV Selfy HR εκτελέστηκε σε συνδυασμό με το Ulisse Faster DNA (Ulisse Biomed, S.p.A.; κωδικός #UBM0014). Η σχετική ευαισθησία (Relative sensitivity) του HPV Selfy είναι 0,92 (96/119 σε δείγματα αυτοσυλλογής έναντι 104/119 σε δείγματα κλινικής συλλογής), ενώ η σχετική ειδικότητα (relative specificity) είναι 1,03 (706/791 σε δείγματα αυτοσυλλογής έναντι 681/791 σε δείγματα κλινικής συλλογής).

## Ενδοεργαστηριακή και διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης HPV Selfy HR προσδιορίστηκε με την ανάλυση μιας ομάδας 523 αυτοσυλλεγόμενων κολπικών επιχρισμάτων, τα οποία αναλύθηκαν δύο φορές στο ίδιο εργαστήριο. Η παρατηρηθείσα συμφωνία είναι 96,7% (Συντελεστής καρπα Cohen - Cohen's kappa 0,882, εξαιρετική συμφωνία). Η διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης HPV Selfy HR προσδιορίστηκε με την ανάλυση μιας ομάδας 451 αυτοσυλλεγόμενων κολπικών επιχρισμάτων (εκ των οποίων το 25% θετικά), τα οποία αναλύθηκαν από δύο ανεξάρτητα εργαστήρια. Η παρατηρούμενη συμφωνία είναι 90,7% (Cohen's kappa 0,739, σημαντική συμφωνία).

## Δυνατότητα γονοτύπωσης

Για να αξιολογηθεί η ικανότητα γονοτυπικού προσδιορισμού του HPV Selfy HR, 59 τυχαία επιλεγμένα δείγματα θετικά στον HPV Selfy HR εξετάστηκαν με τη δοκιμασία CLART® HPV4 (Genomica, SAU; κωδικός #CS-0215-48), η οποία μπορεί να παρέχει πληροφορίες γονοτυπικού προσδιορισμού. Η CLART εντόπισε 88 διαφορετικές ιογενείς λοιμώξεις, ενώ 81 λοιμώξεις εντοπίστηκαν από το HPV Selfy HR. Συνολικά, η συμφωνία για τον γονοτυπικό προσδιορισμό του HPV μεταξύ των δύο δοκιμών ήταν πολύ καλή. Σε αυτόν τον υποπληθυσμό, η εξέταση CLART εντόπισε λιγότερες λοιμώξεις HPV68 και HPV39 από ότι η HPV Selfy HR, ενώ η HPV Selfy HR εντόπισε λιγότερες λοιμώξεις HPV59 και HPV66. Επαναλάβαμε το HPV Selfy HR στα ίδια δείγματα για να εκτιμήσουμε την αναπαραγωγιμότητα του γονοτύπου και λάβαμε σημαντική έως τέλεια συμφωνία με τον συγκεκριμένο τύπο καρρα στο εύρος 0,73 έως 1,00.

## Βιβλιογραφία

Meijer et al. *Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older*. Int J Cancer (2009).

Arbyn et al. *VALHUEDS: A protocol for validation of human papillomavirus assays and collection devices for HPV testing on self-samples and urine samples*. Journal of Clinical Virology 107 (2018).

Avian et al. *Clinical validation of full HR-HPV genotyping HPV Selfy assay according to the international guidelines for HPV test requirements for cervical cancer screening on clinician-collected and self-collected samples*. Journal of Translational Medicine (2022).

## 6. Επεξήγηση συμβόλων

Επεξήγηση συμβόλων που χρησιμοποιούνται στο εγχειρίδιο και τις ετικέτες.

Σύμβολο	Εξήγηση
	<i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Παρτίδα
	Αριθμός καταλόγου
	Χρήση έως την ημερομηνία
	Όριο θερμοκρασίας
	Θετικός Μάρτυρας (PC)
	Αρνητικός Μάρτυρας (NC)
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Κατασκευαστής
	Περιέχει επαρκή ποσότητα για <no> δοκιμές
	Μη χρησιμοποιείτε εάν η συσκευασία έχει υποστεί ζημιά και συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης.

## 7. Επικοινωνία

Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Ulisse Biomed για βοήθεια.



Ulisce Biomed S.p.A.  
Via Camillo Benso di Cavour 20  
33100 - Udine (UD)  
Italy

Υποστήριξη πελατών & τεχνική υποστήριξη: [support@ulissebiomed.com](mailto:support@ulissebiomed.com)

Για περισσότερες πληροφορίες επικοινωνίας επισκεφθείτε την ιστοσελίδα [www.ulissebiomed.com](http://www.ulissebiomed.com)

