

Μόνο για Επαγγελματική Χρήση



We build using DNA:
the molecule of life



REF UBM0025

Sagitta™

HPV Selfy Extended - 30 HPV types

ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

Πολλαπλή δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του γονότυπου 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου, 5 τύπων HPV πιθανώς υψηλού κινδύνου και 11 τύπων HPV χαμηλού 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

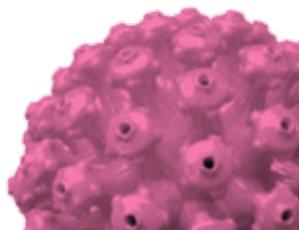
5 Γονότυποι HPV πιθανώς υψηλού κινδύνου:

26, 53, 69, 73, 82

11 Γονότυποι HPV χαμηλού κινδύνου:

6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81, 84

ΥΨΗΛΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ & ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ
Πολλαπλή PCR πραγματικό χρόνου με υψηλή ευαισθησία
και εξιδίκευση με τη χρήση της καποχιρωμένης με δίπλωμα
εμπειρεχνίας τεχνολογίας SAGITTA™.



Έκδοση 8 – Ιούνιος 2023

ΑΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΥΘΥΝΗΣ

Πνευματικά δικαιώματα © 2023 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 αναπαραγγής, 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

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | 3 |
| 1. Περιγραφή προϊόντος..... | 4 |
| Προβλεπόμενη χρήση | 4 |
| Επισκόπηση αρχών και διαδικασιών | 4 |
| Αποθήκευση και χειρισμός | 5 |
| Παρεχόμενα υλικά..... | 5 |
| Απαιτούμενα αλλά όχι παρεχόμενα υλικά | 6 |
| 2. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις | 8 |
| Γενικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις..... | 8 |
| Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για τις διαδικασίες μοριακής βιολογίας..... | 8 |
| 3. Πρωτόκολλο | 9 |
| Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων..... | 9 |
| Διαδικασία για QuantStudio™ 5, Agilent AriaDx..... | 10 |
| Διαδικασία για ELITe InGenius®..... | 18 |
| Διαδικασία για HYRIS bCUBE™ | 34 |
| 4. Όρια..... | 46 |
| 5. Επίδοση προϊόντος..... | 47 |
| Αναλυτική ευαισθησία | 47 |
| Αναλυτική εξειδίκευση (διασταυρούμενη αντιδραστικότητα)..... | 47 |
| Παρεμβολές | 48 |
| Αναλυτική αναπαραγωγιμότητα..... | 48 |
| Αναλυτική επαναληψιμότητα | 48 |
| Κλινική επίδοση | 48 |
| Δυνατότητα γονοτύπωσης..... | 49 |
| Βιβλιογραφία | 49 |
| 6. Επεξήγηση συμβόλων..... | 50 |
| 7. Επικοινωνία..... | 51 |

1. Περιγραφή προϊόντος

Προβλεπόμενη χρήση

Το "HPV Selfy Extended - 30 HPV types" είναι ένα *in vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν που προορίζεται για την ποιοτική πολλαπλή ανίχνευση και διαφοροποίηση νουκλεϊκών οξέων από 30 ιούς των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), συγκεκριμένα 14 τύπους HPV υψηλού κινδύνου (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), 5 τύπους HPV πιθανώς υψηλού κινδύνου (HPV 26, 53, 69, 73, 82) και 11 τύπους HPV χαμηλού κινδύνου (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81, 84) 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 30 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 Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types βασίζεται στην κατοχυρωμένη τεχνολογία SAGITTA της Ulisse Biomed S.p.A., 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 Extended - 30 HPV types είναι μια πολλαπλή δοκιμή PCR πραγματικού χρόνου που επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση, ανίχνευση και διαφοροποίηση των νουκλεϊκών οξέων-στόχων 30 τύπων HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 81, 82, 84), καθώς και του εσωτερικού μάρτυρα (IC-Internal Control).

Το HPV Selfy Extended - 30 HPV types εκτελεί την αντίδραση ενίσχυσης ξεκινώντας από DNA που εκχυλίζεται από κάθε υπό εξέταση δείγμα. Το HPV Selfy Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types αποτελείται από τέσσερις αντιδράσεις PCR:

- η πρώτη επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση του DNA-στόχου των 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου (HR HPV PCR Mix),
- η δεύτερη επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση του DNA-στόχου των 5 τύπων HPV πιθανώς υψηλού κινδύνου και των 5 τύπων HPV χαμηλού κινδύνου (pHR/LR HPV PCR Mix),
- η τρίτη επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση του DNA-στόχου των 6 τύπων HPV χαμηλού κινδύνου (LR HPV PCR Mix),
- η τέταρτη επιτρέπει την ενίσχυση του DNA-στόχου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης (β-globin PCR Mix).

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

Αποθήκευση και χειρισμός

Τα περιεχόμενα του HPV Selfy Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types (Ulisse Biomed, S.p.A., κωδικός # UBM0025-050) 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 Extended - 30 HPV types (Ulisse Biomed, S.p.A., κωδικός # UBM0025-050) επαρκούν για 50 αναλύσεις σε συνδυασμό με άλλα συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων.

| HPV Selfy Extended - 30 HPV types (REF UBM0025-050) | | | |
|--|-------------|---|---------|
| Περιεχόμενα | Όγκος | Περιγραφή | Χρώμα |
| HR HPV Mix (Μίγμα HR HPV) | 1 X 0,35 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει συνθετικό DNA για την ειδική ενίσχυση των 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου. | Κίτρινο |
| β -Globin Mix (Μίγμα β-σφαιρίνης) | 1 X 0,35 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει συνθετικό DNA για την ειδική ενίσχυση της β-σφαιρίνης. | Ρόζ |
| Reaction Mix (Μίγμα αντίδρασης) (DNA) | 2 X 1,50 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει παράγοντες ενίσχυσης και ανίχνευσης. | Άσπρο |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 2 X 0,10 mL | Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου 25mM. | Πράσινο |
| Θετικός Μάρτυρας (HPV HR) | 1 X 0,10 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει κομμάτια συνθετικού DNA των HPV 18, HPV 56, HPV 68 και β-σφαιρίνη (5.000 αντίγραφα/μl). | Κόκκινο |
| Αρνητικός Μάρτυρας | 1 X 0,10 mL | Νερό για βιολογική χρήση (Molecular-biological grade water - MBG νερό). | Άσπρο |
| pHR/LR HPV Mix (Μίγμα pHR/LR HPV) | 1 X 0,35 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει συνθετικό DNA για την ειδική ενίσχυση 5 τύπων HPV πιθανώς υψηλού κινδύνου και 5 τύπων HPV χαμηλού κινδύνου. | Κίτρινο |
| LR HPV Mix (Μίγμα LR HPV) | 1 X 0,35 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει συνθετικό DNA για την ειδική ενίσχυση 6 τύπων HPV χαμηλού κινδύνου. | Κίτρινο |
| Θετικός Μάρτυρας (HPV 42+53) | 1 X 0,10 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει κομμάτια συνθετικού DNA των HPV 42, HPV 43 και β-σφαιρίνη (5.000 αντίγραφα/μl). | Κόκκινο |
| Θετικός Μάρτυρας (HPV 40+54) | 1 X 0,10 mL | Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει κομμάτια συνθετικού DNA των HPV 40, HPV 54 και β-σφαιρίνη (5.000 αντίγραφα/μl). | Κόκκινο |

Απαιτούμενα αλλά όχι παρεχόμενα υλικά

A. Υλικά που απαιτούνται για κάθε συμβατό σύστημα:

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται για τη χρήση του HPV Selfy Extended - 30 HPV types σε κάθε συμβατό σύστημα:

- MBG νερό χωρίς RNase και DNase.
- Κιτ απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων (βλ. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων).
- Σωληνάρια πολυυπροπλενίου 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.
- 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 bCUBE™ (HYRIS, S.r.l.), βαθμονομημένα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Πάγος.
- Γάντια νιτριλίου από νιτρίλιο χωρίς πούδρα, ή από παρόμοιο υλικό, και κατάλληλος ατομικός προστατευτικός εξοπλισμός.

B. Απαιτούμενα υλικά για το QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (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).
- 1 x φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

C. Απαιτούμενα υλικά για το AriaDx Real-time PCR System (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).
- 1 x φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS).

D. 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 HR Mix_PC_00", "Ulisse LR Mix_PC_00", "Ulisse PHR LR Mix_PC_00" και "Ulisse Bglobin EXT Mix_PC_00".

- Πρωτόκολλα ανάλυσης για την ενίσχυση του αρνητικού μάρτυρα "Ulisse HR Mix_NC_00", "Ulisse LR Mix_NC_00", "Ulisse PHR LR Mix_NC_00" και "Ulisse Bglobin EXT Mix_NC_00".
- Πρωτόκολλα ανάλυσης για τα προς ανάλυση δείγματα "Ulisse HR Mix_CYT_200_200_00", "Ulisse HR Mix_CS_200_200_00", "Ulisse LR Mix_CYT_200_200_00", "Ulisse LR Mix_CS_200_200_00", "Ulisse PHR LR Mix_CYT_200_200_00", "Ulisse PHR LR Mix_CS_200_200_00", "Ulisse Bglobin EXT Mix_CYT_200_200_00" και "Ulisse Bglobin EXT Mix_CS_200_200_00".

E. 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).

2. Προειδοποίησεις και προφυλάξεις

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

Γενικές προειδοποίησεις 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 και να 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.

Προειδοποίησεις 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

Α. 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 Extended - 30 HPV types. 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® ακροφύσιο με κωνικό άκρο 80 mm (Copan Italia, S.p.A., κωδικός #52980C) για τη συλλογή ενδοστραχηλικών 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, ακροφύσιο με στρογγυλεμένο άκρο, αποκολλούμενο barcode, χωρίς σημείο θραύσης (Copan Italia, S.p.A., κωδικός #5E046S) για αυτοσυλλογή κολπικών δειγμάτων.

Β. Αποθήκευση δειγμάτων

Η ευαισθησία 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.

Γ. 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 διωματίου (~ +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 QuantStudio™ 5, Agilent AriaDx

Η διαδικασία χρήσης του HPV Selfy Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types.

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 υγρού κυτταρολογικού δείγματος τραχήλου της μήτρας από το αρχικό φιαλίδιο Thin Prep® σε σωληνάριο 1,5 mL. Σε περίπτωση δείγματος πλούσιου σε κυτταρικό υλικό, πάρτε το δείγμα από τη μεσαία φάση αποφεύγοντας την αναρρόφηση κυτταρικών σβώλων. Σε περίπτωση δείγματος φτωχού σε κυτταρικό υλικό, πάρτε το δείγμα από την κάτω φάση.
- Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο στα >9.000 g για 9 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 ρυθμιστικό 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 9 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) για τη δημιουργία εναιωρήματος.

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 μετατραπούν σε εναιώρημα 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 Extended - 30 HPV types:

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Inc., κωδικός #51304).
- 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

Αποφύγετε 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 τέσσερα σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1,5 ml τα οποία θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix, το μίγμα pHR/LR HPV PCR mix, το μίγμα LR HPV PCR mix και το μίγμα β-globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.

Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix, το μίγμα pHR/LR HPV PCR mix, το μίγμα LR HPV PCR mix και το μίγμα β-globin PCR Mix σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες: 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 ₂ 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 | - |
| pHR/LR 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 ₂ 25mM διάλυμα | 0,60 μL | 0,66 x (n + 2) μL |
| Μίγμα pHR/LR HPV Mix | 5,40 μL | 5,94 x (n + 2) μL |
| Συνολικός Όγκος | 18,00 μL | - |
| LR 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 ₂ 25mM διάλυμα | 0,60 μL | 0,66 x (n + 2) μL |
| Μίγμα LR 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 ₂ 25mM διάλυμα | 0,60 μL | 0,66 x (n + 2) μL |
| β-Globin mix (Μίγμα β-οφαιρίνης) | 5,40 μL | 5,94 x (n + 2) μL |
| Συνολικός Όγκος | 18,00 μL | - |

Στο τέλος, αναμείτε αργά περιστρέφοντας το σωληνάριο τουλάχιστον 10 φορές, αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων.

Γ. Συναρμολόγηση πλάκας PCR

Γεμίστε 18 μL μίγματος HR HPV PCR Mix, 18 μL μίγματος pHR/LR HPV PCR Mix, 18 μL μίγματος LR HPV PCR Mix και 18 μL μίγματος β-globin PCR Mix για κάθε δείγμα σε τέσσερα ξεχωριστά κοιλώματα.

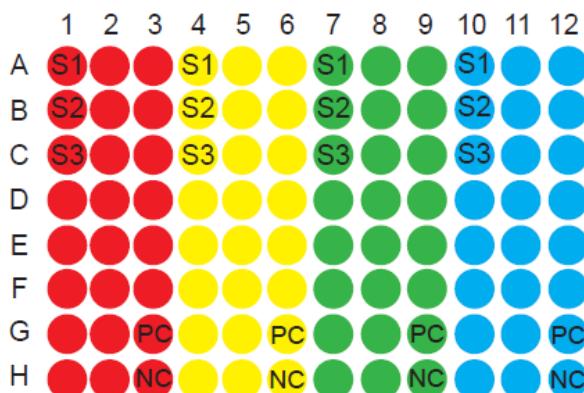
Γεμίστε 2 μL από κάθε βιολογικό δείγμα (S1, S2, S3, κ.λπ.), από τον θετικό μάρτυρα (PC) και από τον αρνητικό μάρτυρα (NC) τέσσερις φορές : μία φορά στο βοθρίο με το HR HPV PCR Mix, μία φορά στο βοθρίο με το pHR/LR HPV PCR Mix, μία φορά στο βοθρίο με το LR HPV PCR Mix και μία φορά στο βοθρίο με το β-globin PCR Mix, όπως υποδεικνύεται στο παρακάτω σχήμα.

Χρησιμοποιήστε το Θετικό Μάρτυρα (HR HPV) στο HR HPV PCR Mix.

Χρησιμοποιήστε το Θετικό Μάρτυρα (HPV42+53) στο pHR/LR PCR Mix.

Χρησιμοποιήστε το Θετικό Μάρτυρα (HPV40+54) στο LR HPV PCR Mix.

Χρησιμοποιήστε το Θετικό Μάρτυρα (HR HPV) στο β-globin PCR Mix.



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) ¹ | | | Καμία | |
| Βήμα | Στάδιο | Χρόνος | Θερμοκρασία | Συλλογή Δεδομένων |
| PCR | Ενεργοποίηση πολυμεράσης | 30 sec | 98,0 °C | - |
| | Αποδιάταξη | Επαναλάβετε 36 κύκλους | 5 sec | 98,0 °C |
| | Επαναδιάταξη | | 10 sec | 61,5 °C |
| | Επιμήκυνση | | 1 sec | 72,0 °C |
| Καμπύλη τήξης | Αποδιάταξη | 15 sec | 95,0 °C | - |
| | Έναρξη τήξης | 60 sec | 60,0 °C | - |
| | Βέλτιστος ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας/χρόνο ενυδάτωσης ³ | 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 |
|--|---------------|
| QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc.) | 300.000 |
| AriaDx Real-time PCR System (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.

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

² Στο όργανο AriaDx Real-time PCR System, η συλλογή δεδομένων τοποθετήθηκε στη φάση επαναδιάταξης και όχι στη φάση επιμήκυνσης.

³ 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 όποιος HPV PCR Mix | Ct β-globin PCR Mix | Tm όποιος HPV PCR Mix | Tm β-globin PCR Mix | Κατάσταση ασημένιας 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 (Detected HPV) | Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV - 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) γονότυπος(οι) | Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV - 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) γονότυπος(οι) | Θετικό σε έναν ή περισσότερους τύπους HPV - 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 στόχων τύπων HPV, μπορεί να αναλυθεί περαιτέρω για να προσδιοριστεί συγκεκριμένα ποιος ή ποιοι τύποι HPV έχουν ανιχνευθεί.

Η δοκιμή HPV Selfy Extended - 30 HPV types επιτρέπει τη διάκριση 30 τύπων HPV, ήτοι: HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 81, 82, 84, μέσω της ανάλυσης της θερμοκρασίας τήξης (Tm) του ενισχυμένου αναλύτη DNA. Στη δοκιμή HPV Selfy Extended - 30 HPV types, κάθε μίγμα επιτρέπει την ταυτοποίηση και τη διαφοροποίηση του στοχευόμενου τύπου HPV, δεδομένου ότι κάθε γονότυπος χαρακτηρίζεται από μία μοναδική Tm στη συγκεκριμένη ομάδα:

- Το HR HPV PCR Mix ανιχνεύει και διαφοροποιεί τους ακόλουθους τύπους HPV: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68;
- Το pHRL/R HPV PCR Mix ανιχνεύει και διαφοροποιεί τους ακόλουθους τύπους HPV: HPV 6, 11, 26, 42, 53, 69, 73, 81, 82 and 84;
- Το LR HPV PCR Mix ανιχνεύει και διαφοροποιεί τους ακόλουθους τύπους HPV: HPV 40, 43, 44, 54, 61 and 70.

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.

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 εκχύλισης, 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 παρακάτω.

Πίνακας γονοτύπων

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

| pHR/LR HPV PCR Mix | | | | | | |
|---------------------|----------------------|-------|-----------|----------------------|-------|--|
| Instrument (Όργανο) | | | | | | |
| Τύπος HPV | QuantStudio™ 5 | | Τύπος HPV | AriaDx | | |
| | Θερμοκρασία Τήξης °C | | | Θερμοκρασία Τήξης °C | | |
| | από | έως | | από | έως | |
| HPV26 | 74,50 | 75,90 | HPV26 | 74,00 | 76,00 | |
| HPV42 | 76,00 | 77,20 | HPV42 | 76,20 | 77,60 | |
| HPV69 | 77,30 | 78,05 | HPV69 | 77,80 | 78,20 | |
| HPV53 | 78,10 | 78,90 | HPV53 | 78,40 | 79,20 | |
| HPV6 | 79,00 | 80,00 | HPV6 | 79,40 | 80,20 | |
| HPV82 | 80,10 | 81,00 | HPV82 | 80,40 | 81,20 | |
| HPV11 | 81,10 | 82,00 | HPV11 | 81,40 | 82,60 | |
| HPV73 | 82,10 | 83,10 | HPV73 | 82,80 | 84,00 | |
| HPV84 | 84,50 | 86,00 | HPV84 | 85,00 | 86,60 | |
| HPV81 | 88,00 | 89,00 | HPV81 | 87,00 | 89,00 | |

| LR HPV PCR Mix | | | | | | |
|---------------------|----------------------|-------|-----------|----------------------|-------|--|
| Instrument (Όργανο) | | | | | | |
| Τύπος HPV | QuantStudio™ 5 | | Τύπος HPV | AriaDx | | |
| | Θερμοκρασία Τήξης °C | | | Θερμοκρασία Τήξης °C | | |
| | από | έως | | από | έως | |
| HPV61 | 72,50 | 74,00 | HPV61 | 73,00 | 74,80 | |
| HPV70 | 74,05 | 75,50 | HPV70 | 75,00 | 76,60 | |
| HPV40 | 77,00 | 79,00 | HPV40 | 77,00 | 79,60 | |
| HPV43 | 79,50 | 81,00 | HPV43 | 79,80 | 81,00 | |
| HPV54 | 81,05 | 82,50 | HPV54 | 81,40 | 84,00 | |
| HPV44 | 85,50 | 87,00 | HPV44 | 86,00 | 88,00 | |

| β-globin PCR Mix | | | | | | |
|---------------------|----------------------|-------|----------|----------------------|-------|--|
| Instrument (Όργανο) | | | | | | |
| Στόχος | QuantStudio™ 5 | | Στόχος | AriaDx | | |
| | Θερμοκρασία Τήξης °C | | | Θερμοκρασία Τήξης °C | | |
| | από | έως | | από | έως | |
| β-globin | 75,50 | 76,80 | β-globin | 76,40 | 77,80 | |

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 τρεις Θετικοί Μάρτυρες για κάθε εκτέλεση ενίσχυσης PCR. Ο Αρνητικός Μάρτυρας χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί ότι κανένα συστατικό δεν έχει επιμολυνθεί με νουκλεϊκά οξέα κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων ενίσχυσης. Οι Θετικοί Μάρτυρες χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόδοσης της ανάλυσης. Η ανάλυση θεωρείται έγκυρη όταν πληρούνται όλες ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Ο Θετικός Μάρτυρας HPV HR χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο HR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix.
- Ο Θετικός Μάρτυρας (HPV42+53) χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο pHRLR HPV PCR Mix.
- Ο Θετικός Μάρτυρας (HPV40+54) χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο LR HPV PCR Mix.
- Ο Αρνητικός Μάρτυρας χαρακτηρίζεται από μη ύπαρξη καμπυλών ενίσχυσης σε κανένα από τα μίγματα HPV PCR mix, ούτε στο β-globin PCR Mix.

Για μια σωστή ανάλυση γονότυπου, είναι απαραίτητο να ανιχνευθούν οι ακόλουθες κορυφές εύρους θερμοκρασίας τήξης των θετικών μαρτύρων που πρέπει να επαληθεύονται (δοκιμάζονται με κάθε μίγμα PCR) εντός των περιοχών θερμοκρασίας τήξης που υποδεικνύονται παρακάτω:

| PCR Μίγμα | Στόχος | Έυρος Θερμοκρασίας Τήξης Tm (°C) | | | |
|--------------------|------------|----------------------------------|-------|--------|-------|
| | | QuantStudio™ 5 | | AriaDx | |
| | | από | έως | από | έως |
| HR HPV PCR Mix | HPV68 | 72,00 | 73,20 | 72,40 | 73,80 |
| | HPV56 | 79,50 | 80,00 | 79,80 | 80,20 |
| | HPV18 | 85,60 | 87,00 | 85,60 | 87,00 |
| pHR/LR HPV PCR Mix | HPV42 | 76,00 | 77,20 | 76,20 | 77,60 |
| | HPV53 | 78,10 | 78,90 | 78,40 | 79,20 |
| LR HPV PCR Mix | HPV40 | 77,00 | 79,00 | 77,00 | 79,60 |
| | HPV54 | 81,05 | 82,50 | 81,40 | 84,00 |
| β-Globin PCR Mix | β-σφαιρίνη | 75,50 | 76,80 | 76,40 | 77,80 |

Εάν ανιχνευθεί σήμα ενίσχυσης που υπερβαίνει την κατώτατη τιμή για οποιοδήποτε από τα μίγματα 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 παραμετροί 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 αναλώτιμα 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 αντιδραστηρία. | 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 δειγμάτων. Προσέξτε όταν διανέμετε αντιδραστηρία 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. | Προσέχετε 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 απομονωμένο DNA 1:5. Επαναλάβετε την απομόνωση DNA ή τη συλλογή του δείγματος. |

Διαδικασία για ELITe InGenius®

Η διαδικασία χρήσης του HPV Selfy Extended - 30 HPV types με το σύστημα ELITe InGenius® αποτελείται από τρία βήματα:

- A. επαλήθευση ότι το σύστημα είναι έτοιμο προς χρήση.
- B. Ρύθμιση της διαδικασίας.
- Γ. 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 Μάρτυρας (HPV HR σχετικός με το Πρωτόκολλο "Ulisse HR Mix_PC_00"), Θετικός Μάρτυρας (HPV 42+53 σχετικός με το Πρωτόκολλο "Ulisse PHR LR Mix_PC_00"), Θετικός Μάρτυρας (HPV 40+54 σχετικός με το Πρωτόκολλο "Ulisse LR Mix_PC_00") και Αρνητικός Μάρτυρας (σχετικός με τα Πρωτόκολλα "Ulisse HR Mix_NC_00", "Ulisse PHR LR Mix_NC_00" και "Ulisse LR Mix_NC_00"- πραγματοποιήθηκαν σε συνδυασμό με το αντίστοιχο HPV Mix με την παρτίδα αντιδραστηρίου ενίσχυσης που θα χρησιμοποιηθεί και ότι είναι εγκεκριμένες και σε έγκυρη κατάσταση (Status). Επαληθεύστε ότι οι οι αντιδράσεις ενίσχυσης των μαρτύρων - Θετικός (HPV HR) και Αρνητικός Μάρτυρας - εκτελέστηκαν σε συνδυασμό με το β - globin 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 Δοκιμής 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 Δοκιμής που παρέχονται από την ELITechGroup S.p.A. Αυτά τα πρωτόκολλα IVD (in vitro diagnostics) επικυρώθηκαν ειδικά με το HPV Selfy Extended - 30 HPV types, το όργανο ELITe InGenius και τις αναφερόμενες μήτρες δειγμάτων.

Τα Πρωτόκολλα Δοκιμής που είναι διαθέσιμα για την εξέταση δειγμάτων με το προϊόν HPV Selfy Extended - 30 HPV types περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

| Πρωτόκολλα Δοκιμής για το HPV Selfy Extended - 30 HPV types | | | |
|---|--|--|---|
| Όνομα | Μήτρα/Εκλουσμα | Αναφορά | Χαρακτηριστικά |
| Ulisse HR 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 HR 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 PHR LR 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: pHR/LR HPV PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL |

| Όνομα | Μήτρα/Εκλουσμα | Αναφορά | Χαρακτηριστικά |
|--|--|--|--|
| Ulisse PHR LR 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: pHRLR HPV PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL |
| Ulisse LR 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: LR HPV PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL |
| Ulisse LR 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: LR HPV PCR Mix Όγκος μίγματος PCR: 45 μL Όγκος εισόδου PCR δείγματος: 5 μL |
| Ulisse Bglobin EXT Mix_CS_200_200_00 | Τραχηλικό δείγμα κυτταρολογίας υγρής φάσης | Έγκυρη/ Μη Έγκυρη (Valid/ Not valid) | Όγκος εισόδου εκχύλισης: 200 μL Όγκος έκλουσης 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 EXT Mix_CYT_200_200_00 | Τραχηλικά/κολπικά επιχρίσματα | Έγκυρη/ Μη Έγκυρη (Valid/ Not valid) | Όγκος εισόδου εκχύλισης: 200 μL Όγκος έκλουσης 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 |

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

Β. Ρύθμιση της διαδικασίας

Το προϊόν HPV Selfy Extended - 30 HPV types, 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 ζεκινώντας από το βασικό δείγμα, εκτελέστε τα ακόλουθα βήματα σύμφωνα με το Γραφικό Περιβάλλον Χρήστη (GUI):

- αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (~+ 25 °C) για 30 λεπτά. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Διατηρείτε όλα τα αντιδραστήρια σε πάγο κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας.
- Προετοιμάστε τέσσερα σωληνάρια των 2 ml (Sarstedt) που θα περιέχουν τα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix αντίστοιχα - επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.
- Προετοιμάστε τα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες:

| HR HPV PCR Mix | | | |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 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 | - | - |
| pHR/LR HPV PCR Mix | | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 1,5 μL | 1,5 x (n + 1) μL | 1,5 x (n + 2) μL |
| pHR/LR HPV Mix | 13,5 μL | 13,5 x (n + 1) μL | 13,5 x (n + 2) μL |
| Συνολικός όγκος | 45,0 μL | - | - |
| LR HPV PCR Mix | | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 1,5 μL | 1,5 x (n + 1) μL | 1,5 x (n + 2) μL |
| LR 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 <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 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, αναμείξτε αργά περιστρέφοντας το σωληνάριο τουλάχιστον 10 φορές, αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων.
- Επιλέξτε "Perform Run" ('Εναρξη εκτέλεσης) από την κεντρική οθόνη "Home"(Αρχική Σελίδα).
- Βεβαιωθείτε ότι ο "Extraction Input Volume" (Όγκος εισόδου εκχύλισης) είναι 200 μL και ο "Extraction Elute Volume" (Όγκος έκλουσης εκχύλισης) είναι 200 μL.
- Εάν χρειαστεί, μεταφέρετε 200 μL 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 γραμμωτό κώδικα(barcode) του δείγματος.
- Επιλέξτε το πρωτόκολλο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί στη στήλη "Assay"(Δοκιμή) (π.χ. Ulisse HR 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 τα πρόσφατα παρασκευασμένα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix και στο επιλεγμένο "Inventory Block" (Μπλοκ απογραφής) που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες κατά GUI και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του κιτ HPV Selfy Extended - 30 HPV types. 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" (Εναρξη) 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 εναπομέναν 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 δείγμα, εκτελέστε τα ακόλουθα βήματα σύμφωνα με το GUI:

- αποψύξτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (~+ 25 °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 τα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και το β-globin PCR Mix αντίστοιχα - επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.
- Προετοιμάστε τα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες:

| HR HPV PCR Mix | | | |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 µL | 30,0 x (n + 1) µL | 30,0 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 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 | - | - |
| pHR/LR HPV PCR Mix | | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 µL | 30,0 x (n + 1) µL | 30,0 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 1,5 µL | 1,5 x (n + 1) µL | 1,5 x (n + 2) µL |
| pHR/LR HPV Mix | 13,5 µL | 13,5 x (n + 1) µL | 13,5 x (n + 2) µL |
| Συνολικός όγκος | 45,0 µL | - | - |
| LR HPV PCR Mix | | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 µL | 30,0 x (n + 1) µL | 30,0 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 1,5 µL | 1,5 x (n + 1) µL | 1,5 x (n + 2) µL |
| LR 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 <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 µL | 30,0 x (n + 1) µL | 30,0 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 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, αναμείξτε αργά περιστρέφοντας το σωληνάριο τουλάχιστον 10 φορές, αποφεύγοντας το σχηματισμό 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 µL και ο "Extraction Elute Volume" (Όγκος έκλουσης εκχύλισης) είναι 200 µL.
- 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 HR Mix_CYT_200_200). 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.
- Φορτώστετα πρόσφατα παρασκευασμένα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-

globin PCR Mix και στο επιλεγμένο "Inventory Block" που επιλέχθηκε ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του κιτ HPV Selfy Extended - 30 HPV types. Κάντε κλικ στο κουμπί "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) και τα εκχυλισμένα Νουκλεϊκά Οξέα, 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 κασέτες 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.

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 (~+ 25 °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 τα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix αντίστοιχα - επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.
- Προετοιμάστε τα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix σύμφωνα με τους ακόλουθους πίνακες:

| HR HPV PCR Mix | | | |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 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 | - | - |
| pHR/LR HPV PCR Mix | | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 1,5 μL | 1,5 x (n + 1) μL | 1,5 x (n + 2) μL |
| pHR/LR HPV Mix | 13,5 μL | 13,5 x (n + 1) μL | 13,5 x (n + 2) μL |
| Συνολικός όγκος | 45,0 μL | - | - |
| LR HPV PCR Mix | | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για n <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 1,5 μL | 1,5 x (n + 1) μL | 1,5 x (n + 2) μL |
| LR 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 <= 4 | Όγκος για 4 < n <= 6 |
| Reaction Mix (DNA) | 30,0 μL | 30,0 x (n + 1) μL | 30,0 x (n + 2) μL |
| MgCl ₂ 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, αναμείξτε αργά περιστρέφοντας το σωληνάριο τουλάχιστον 10 φορές, αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων.
- Αποψύξτε τα σωληνάρια Θετικού μάρτυρα (HPV HR), Θετικού Μάρτυρα HPV42+53 και Θετικού Μάρτυρα HPV40+54 για τη διαδικασία. Κάθε σωληνάριο επαρκεί για 2 εξετάσεις. Ανακατέψτε απαλά, φυγοκεντρήστε το περιεχόμενο για 5 δευτερόλεπτα. Μεταφέρετε τουλάχιστον 50 μL από τον κάθε Θετικό Μάρτυρα σε 3 "Elution tubes" (σωληνάρια έκλουσης), που παρέχονται με το "ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set".
- Αποψύξτε το σωληνάριο του 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 3 "Elution tubes" (σωληνάρια έκλουσης), που παρέχονται με το "ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set".
- Επιλέξτε "Perform Run" (Εναρξη εκτέλεσης) από την οθόνη "Home" (Αρχική σελίδα).
- Στο δείγμα που ενδιαφέρει (Track of interest) επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί στη σήλη "Assay"(Δοκιμή).

- Για το δείγμα του θετικού μάρτυρα (Track of positive control) που πρόκειται να ενισχυθεί με το HR HPV PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse HR Mix_PC_00" στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του Θετικού Μάρτυρα (HPV HR).
 - Για το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα (Track of negative control) που πρόκειται να ενισχυθεί με το HR HPV PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse HR 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 το pHR/LR HPV PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse PHR LR Mix_PC_00" στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του Θετικού Μάρτυρα (HPV42+53).
 - Για το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα (Track of negative control) που πρόκειται να ενισχυθεί με το pHR/LR HPV PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse PHR LR 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 το LR HPV PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse LR Mix_PC_00" στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του Θετικού Μάρτυρα (HPV40+54).
 - Για το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα (Track of negative control) που πρόκειται να ενισχυθεί με το LR HPV PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse LR 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 το β-globin PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse Bglobin EXT Mix_PC_00" στη στήλη "Assay" (Δοκιμή) και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του Θετικού Μάρτυρα (HPV HR).
 - Για το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα (Track of negative control) που πρόκειται να ενισχυθεί με το β-globin PCR Mix, επιλέξτε το Πρωτόκολλο ανάλυσης "Ulisse Bglobin EXT 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 τα πρόσφατα παρασκευασμένα μίγματα HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix, LR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix και στο επιλεγμένο "Inventory Block" ακολουθώντας τις οδηγίες κατά GUI και συμπληρώστε τον αριθμό παρτίδας και την ημερομηνία λήξης του κιτ HPV Selfy Extended - 30 HPV types. Επιλέξτε το "Next" (Επόμενο) για να συνεχίσετε τη ρύθμιση.
 - Εισάγετε και ελέγξτε 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 τις "PCR Cassettes" (κασέτες PCR), κάθε σωληνάριο Έκλουσης Θετικού Μάρτυρα και τα σωληνάρια Έκλουσης Αρνητικού Μάρτυρα 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, οι εναπομείναντες Θετικοί Μάρτυρες πρέπει να αφαιρεθούν από το όργανο, να καλυφθούν, να ταυτοποιηθούν και να αποθηκευτούν στους -20 °C. Αποφύγετε τη διάχυση των Θετικών Μαρτύρων. Ο εναπομένων Αρνητικός Μάρτυρας πρέπει να απορρίπτεται.
- Σημείωση:** στο τέλος της εκτέλεσης, οι PCR κασέτες 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 τον "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 Extended - 30 HPV types 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 δείγματος.

α) Επικύρωση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης Θετικού και Αρνητικού Μάρτυρα

Τα σήματα φθορισμού που εκπέμπονται από τα προϊόντα ενίσχυσης των τύπων HPV (HR HPV PCR Mix, pHRLR HPV PCR Mix και LR HPV PCR Mix) και του IC (β-globin Mix) στην αντίδραση ενίσχυσης Θετικών Μαρτύρων και Αρνητικού Μάρτυρα αναλύονται και ερμηνεύονται από το λογισμικό ELITe InGenius® με τις παραμέτρους που περιλαμβάνονται στα Πρωτόκολλα Δοκυμής "Ulisse HR Mix_PC_00", "Ulisse PHR LR Mix_PC_00", "Ulisse LR Mix_PC_00" "Ulisse Bglobin EXT Mix_PC_00", "Ulisse HR Mix_PC_00", "Ulisse PHR LR Mix_PC_00", "Ulisse LR Mix_PC_00" και "Ulisse Bglobin EXT Mix_NC_00".

Τα αποτελέσματα ενίσχυσης των Θετικών Μαρτύρων 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 εξουσιοδοτημένο προσωπικό ως "Administrator" (Διαχειριστής) ή "Analyst" (Αναλυτής), ακολουθώντας τις οδηγίες του GUI.

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

Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης Θετικών Μαρτύρων και του 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 ελεγχθούν 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 δύο από τις τρεις κορυφές τήξης του Θετικού Μάρτυρα που εξετάστηκε με το HR HPV PCR Mix, pHRLR HPV PCR Mix, LR 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 πληροί 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 δείγματα 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®

| Θετικός Μάρτυρας | PCR Mix | Στόχος Θετικού Μάρτυρα | Εύρος θερμοκρασίας τήξης °C | |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|------|
| | | | από | έως |
| Θετικός Μάρτυρας (HR HPV) | 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 | 77,0 |
| Θετικός Μάρτυρας (HPV42+53) | pHR/LR HPV PCR Mix | HPV42 | 76,0 | 77,1 |
| | | HPV53 | 78,1 | 78,9 |
| Θετικός Μάρτυρας (HPV40+54) | LR HPV PCR Mix | HPV40 | 77,0 | 78,5 |
| | | HPV54 | 81,5 | 82,5 |

β. Επικύρωση των αποτελεσμάτων του δείγματος

Τα σήματα φθορισμού που εκπέμπονται από τα προϊόντα ενίσχυσης των τύπων HPV (HR HPV PCR Mix, pHR/LR HPV PCR Mix και LR HPV PCR Mix) και του IC (β-globin 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 HR Mix_PC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| PHR LR HPV Θετικός Μάρτυρας "Ulisse PHR LR Mix_PC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| LR HPV Θετικός Μάρτυρας "Ulisse LR Mix_PC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| HR HPV Θετικός Μάρτυρας "Ulisse Bglobin EXT Mix_PC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| 2) Αρνητικός Μάρτυρας | Κατάσταση |
| Αρνητικός Μάρτυρας "Ulisse HR Mix_NC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| Αρνητικός Μάρτυρας "Ulisse PHR LR Mix_NC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| Αρνητικός Μάρτυρας "Ulisse LR Mix_NC_00" | APPROVED (ΕΓΚΡΙΘΗΚΕ) |
| Αρνητικός Μάρτυρας "Ulisse Bglobin EXT 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 που εκτελέστηκε με όλα τα μίγματα HPV PCR | Ερμηνεία |
|---|---|
| HPV: DNA Detected Check Tm result(HPV: DNA Ανιχνεύθηκε Ελέγχετε το αποτέλεσμα της Tm) | Ένας ή περισσότεροι τύποι ανιχνεύονται με υπολογισμένο Ct. Ελέγχετε τα αποτελέσματα Tm για τον γονότυπο. |
| HPV: Check Bglobin Mix result (HPV: Ελέγχετε το αποτέλεσμα της Tm και του β-globin mix) | 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 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 και 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 "Bglobin:DNA Detected Tm out of range- Retest Sample" (Bglobin: DNA Ανιχνεύθηκε Tm εκτός εύρους - επανεξέταση δείγματος) ή "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 εκλούμιο ή μη επαρκής ποσότητα DNA στο δείγμα), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει εσφαλμένα αποτελέσματα. Όταν ο όγκος του εκλυόμενου δείγματος 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" (Εκχύλιση + Αντίδραση 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 HPV στην ανάλυση πρέπει να αντιστοιχούν στις κορυφές που εμφανίζονται στα διαγράμματα καμπύλης τήξης (βλ. πίνακα παρακάτω).

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 και η αποθήκευση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του δείγματος ως "Sample Report" (Εκθεση δείγματος) και "Track Report" (Εκθεση παρακολούθησης).

Πίνακας γονοτύπων ELITe InGenius®

| HR HPV PCR Mix | | |
|--------------------|----------------------|------|
| Τύπος HPV | Θερμοκρασία Τήξης °C | |
| | από | έως |
| HPV68 | 72,0 | 73,4 |
| 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 | 82,4 |
| HPV45 | 82,4 | 83,0 |
| HPV33 | 84,8 | 85,4 |
| HPV18 | 85,6 | 87,0 |
| pHR/LR HPV PCR Mix | | |
| Τύπος HPV | Θερμοκρασία Τήξης °C | |
| | από | έως |
| HPV26 | 74,5 | 75,6 |
| HPV42 | 76,0 | 77,1 |
| HPV69 | 77,2 | 78,0 |
| HPV53 | 78,1 | 78,9 |
| HPV6 | 79,0 | 79,9 |
| HPV82 | 80,0 | 80,8 |
| HPV11 | 80,9 | 81,8 |
| HPV73 | 82,0 | 83,0 |
| HPV84 | 84,6 | 85,7 |
| HPV81 | 88,0 | 89,1 |
| LR HPV PCR Mix | | |
| Τύπος HPV | Θερμοκρασία Τήξης °C | |
| | από | έως |
| HPV61 | 72,0 | 73,5 |
| HPV70 | 74,0 | 76,0 |
| HPV40 | 77,0 | 78,5 |
| HPV43 | 79,5 | 81,0 |
| HPV54 | 81,5 | 82,5 |
| HPV44 | 85,5 | 87,0 |
| β-globin PCR Mix | | |
| Στόχος | Θερμοκρασία Τήξης °C | |
| | από | έως |
| β-globin | 75,2 | 77,0 |

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 ("Θέση").

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

Αντιμετώπιση Προβλημάτων

| Τύπος Δείγματος | Πρόβλημα / Σφάλμα | Πιθανή Αιτία | Λύση |
|--------------------|--|---|---|
| Θετικός Μάρτυρας | Μη έγκυρη αντίδραση Θετικού Μάρτυρα | Σφάλμα ρύθμισης οργάνου. | Ελέγχετε τη θέση των μιγμάτων HPV PCR mixes και του θετικού μάρτυρα. Ελέγχετε τους όγκους των μιγμάτων HPV PCR mixes και του θετικού μάρτυρα. |
| | | Αποδόμηση θετικού μάρτυρα. | Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα θετικού μάρτυρα. |
| | | Αποδόμηση μίγματος PCR. | Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα μιγμάτων HPV PCR mixes. |
| | | Σφάλμα οργάνου. | Επικοινωνήστε με την Τεχνική Υπηρεσία της ELITechGroup. |
| Αρνητικός Μάρτυρας | Μη έγκυρη αντίδραση Αρνητικού Μάρτυρα | Σφάλμα ρύθμισης οργάνου. | Ελέγχετε τη θέση των μιγμάτων HPV PCR mixes και του αρνητικού μάρτυρα. Ελέγχετε τους όγκους των μιγμάτων HPV PCR mixes και του αρνητικού μάρτυρα. |
| | | Επιμόλυνση του αρνητικού μάρτυρα. | Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα MBG νερού. |
| | | Επιμόλυνση του μίγματος PCR. | Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα μιγμάτων HPV PCR mixes. |
| | | Επιμόλυνση της θέσης εκχύλισης, των στατώ των δοκιμαστικών σωλήνων (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 | Μή έγκυρη ή ασαφής αντίδραση Δείγματος | Σφάλμα ρύθμισης οργάνου. | Ελέγχετε τη θέση των μιγμάτων HPV PCR mixes και του δείγματος. Ελέγχετε τους όγκους των μιγμάτων HPV PCR mixes και του δείγματος. |
| | | Αποδόμηση μίγματος PCR. | Χρησιμοποιήστε μια νέα ποσότητα μιγμάτων HPV PCR mixes. |
| | | Παρεμβαλλόμενες ουσίες στο δείγμα. | Επαναλάβετε την ενίσχυση με αραίωση 1:2 σε MBG νερό του εκλουόμενου δείγματος σε μία ανάλυση "PCR only" (Μόνο PCR). |
| | | Μη επαρκής ποσότητα DNA στο δείγμα. | Επαναλάβετε την εκχύλιση και την ενίσχυση με ένα νέο κλάσμα του δείγματος σε μία ανάλυση "Extract + PCR" (Εκχύλιση + αντίδραση 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 εκλουόμενου δείγματος σε MBG νερό σε μία ανάλυση "PCR Only" (Μόνο PCR). |
| 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 εκλουόμενου δείγματος σε MBG νερό σε μία ανάλυση "PCR Only" (Μόνο PCR). |

Διαδικασία για HYRIS bCUBE™

Η διαδικασία χρήσης του HPV Selfy Extended – 30 HPV types με το HYRIS bCUBE™ αποτελείται από εννέα βήματα:

- A. απομόνωση νουκλεϊκού οξέος.
- B. Ρύθμιση "Recipe" (Σύνθεση).
- Γ. Ρύθμιση της ανάλυσης bAPP™.
- Δ. Ρύθμιση του φυσιγγίου.
- Ε. Παρασκευή των μιγμάτων ενίσχυσης PCR.
- Ζ. Συναρμολόγηση πλακών PCR.
- Η. Έναρξη της ανάλυσης.
- Θ. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών.
- Ι. 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 Extended – 30 HPV types.

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 υγρού κυτταρολογικού δείγματος τραχήλου της μήτρας από το αρχικό φιαλίδιο Thin Prep® σε σωληνάριο 1,5 mL. Σε περίπτωση δείγματος πλούσιου σε κυτταρικό υλικό, πάρτε το δείγμα από τη μεσαία φάση αποφεύγοντας την αναρρόφηση κυτταρικών σβώλων. Σε περίπτωση δείγματος φτωχού σε κυτταρικό υλικό, πάρτε το δείγμα από την κάτω φάση. Φυγοκεντρήστε το σωληνάριο στα >9.000 g για 9 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 9 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 επιχρισματος 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 Extended – 30 HPV types:

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Inc.; κωδικός #51304).
- 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 – UBM0025 – HPV Selfy 30».

Παράμετροι για τη ρύθμιση της σύνθεσης:

| Detection channel (Κανάλι ανίχνευσης) | Yes/No (Ναι/όχι) | Intensity (Ενταση) | Exposition (Εκθεση) | | |
|--|---|---|---------------------|------------------------------|--|
| FAM | Yes (Ναι) | 100% | 50% | | |
| Well type (Τύπος βοθρίου) | | | | | |
| Name (Όνομα) | | Description (Περιγραφή) | | | |
| HR HPV PCR Mix | | 14 HR HPV | | | |
| pHR/LR HPV PCR Mix | | 5 pHR and 5 LR HPV | | | |
| LR HPV PCR Mix | | 6 LR HPV | | | |
| β -globin PCR Mix | | β -globin | | | |
| Sample type (Τύπος δείγματος) | | | | | |
| Name (Όνομα) | | Description (Περιγραφή) | | | |
| PCHR | | Θετικός Μάρτυρας (HR HPV Mix και β -globin mix) | | | |
| PCpHRLR | | Θετικός Μάρτυρας (pHR/LR HPV Mix) | | | |
| PCLR | | Θετικός Μάρτυρας (LR HPV Mix) | | | |
| 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 ⁴ | | 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™.

⁴ 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 – UBM0025 – HPV Selfy 30.
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 βιθρία που προορίζονται για τους Θετικούς Μάρτυρες (ένα για κάθε μίγμα) και με το μπλε χρώμα τα βιθρία που προορίζονται για τους Αρνητικούς Μάρτυρες (ένα για κάθε μίγμα).

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

Ε. Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR

Αποφύγετε 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 τέσσερις σωληνάρια πολυπροπυλενίου 1,5 ml, τα οποία θα περιέχουν το μίγμα HR HPV PCR Mix, το μίγμα pHRLR HPV PCR Mix, το μίγμα LR HPV PCR Mix και το μίγμα β-globin PCR Mix αντίστοιχα- επισημάνετε τα σωληνάρια με ανεξίτηλο σημάδι.

Προετοιμάστε το μίγμα HR HPV PCR Mix, το μίγμα pHRLR HPV PCR Mix, το μίγμα LR 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 Θετικούς μάρτυρες και τον 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 (DNA) | 12,00 µL | 13,20 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 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 | - |
| pHR/LR PCR Mix | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για "n" δείγματα συν 2 μάρτυρες |
| Reaction Mix (DNA) | 12,00 µL | 13,20 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 0,60 µL | 0,66 x (n + 2) µL |
| pHR/LR HPV mix | 5,40 µL | 5,94 x (n + 2) µL |
| Συνολικός Όγκος | 18,00 µL | - |
| LR HPV PCR Mix | | |
| Αντιδραστήριο | Όγκος ανά δείγμα ή μάρτυρα | Όγκος για "n" δείγματα συν 2 μάρτυρες |
| Reaction Mix (DNA) | 12,00 µL | 13,20 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 0,60 µL | 0,66 x (n + 2) µL |
| LR 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 (DNA) | 12,00 µL | 13,20 x (n + 2) µL |
| MgCl ₂ 25mM διάλυμα | 0,60 µL | 0,66 x (n + 2) µL |
| β-Globin mix | 5,40 µL | 5,94 x (n + 2) µL |
| Συνολικός Όγκος | 18,00 µL | - |

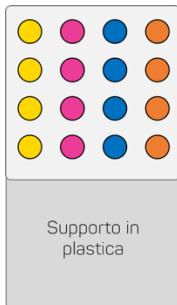
Στο τέλος, αναμείξτε αργά περιστρέφοντας το σωληνάριο τουλάχιστον 10 φορές, αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων.

Z Συναρμολόγηση πλάκας PCR

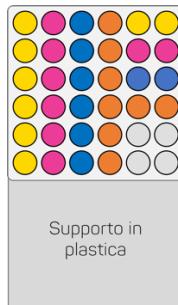
Γεμίστε 18 μL μίγματος HR HPV PCR, 18 μL μίγματος pHR/LR HPV PCR, 18 μL μίγματος LR HPV PCR και 18 μL μίγματος PCR β-σφαιρίνης για κάθε δείγμα σε τέσσερις ξεχωριστά κοιλώματα.

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

A



B



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 bAPP™ 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 |
| pHR/LR HPV PCR Mix | 10.000 5.000 |
| LR 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 bCUBE™» στην επόμενη σελίδα.

Πίνακας ερμηνείας για το HYRIS bCUBE™

| Ct όποιος HPV PCR Mix | Ct β-globin PCR Mix | Tm όποιος 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 - 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 - 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 - 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 ρυθμίστει η υποβοηθούμενη ερμηνεία των αποτελεσμάτων ώστε το σύστημα να ερμηνεύει τις τιμές Ct των δειγμάτων και των μαρτύρων, καθώς και τις καμπύλες τίξης, και να προσδιορίζει ένα αποτέλεσμα που ερμηνεύεται όπως:

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

Για να ρυθμίστε 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.

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 Extended - 30 HPV types επιτρέπει τη διάκριση 30 τύπων HPV, ήτοι: HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 81, 82, 84, μέσω της ανάλυσης της θερμοκρασίας τήξης (Tm) του ενισχυμένου αναλύτη DNA. Στη δοκιμή HPV Selfy Extended - 30 HPV types, κάθε μίγμα επιτρέπει την ταυτοποίηση και τη διαφοροποίηση του στοχευόμενου τύπου HPV, δεδομένου ότι κάθε γονότυπος χαρακτηρίζεται από μία μοναδική Tm στη συγκεκριμένη ομάδα:

- Το HR HPV PCR Mix ανιχνεύει και διαφοροποιεί τους ακόλουθους τύπους HPV: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 και 68;
- Το pHR/LR HPV PCR Mix ανιχνεύει και διαφοροποιεί τους ακόλουθους τύπους HPV: HPV 6, 11, 26, 42, 53, 69, 73, 81, 82 and 84;
- Το LR HPV PCR Mix ανιχνεύει και διαφοροποιεί τους ακόλουθους τύπους HPV: HPV 40, 43, 44, 54, 61 and 70.

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.

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 συσχετιστούν 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 |
| pHR/LR HPV PCR Mix | | |
| Τύπος HPV | Θερμοκρασία τήξης °C | |
| | από | έως |
| HPV26 | 74,00 | 75,50 |
| HPV42 | 75,60 | 77,10 |
| HPV69 | 77,11 | 77,60 |
| HPV53 | 77,61 | 78,90 |
| HPV6 | 78,91 | 79,70 |
| HPV82 | 79,71 | 80,50 |
| HPV11 | 80,70 | 81,70 |
| HPV73 | 81,71 | 82,90 |
| HPV84 | 84,50 | 85,50 |
| HPV81 | 87,50 | 88,60 |
| LR HPV PCR Mix | | |
| Τύπος HPV | Θερμοκρασία τήξης °C | |
| | από | έως |
| HPV61 | 72,00 | 73,70 |
| HPV70 | 73,80 | 75,50 |
| HPV40 | 76,70 | 78,30 |
| HPV43 | 79,10 | 80,40 |
| HPV54 | 80,80 | 82,30 |
| HPV44 | 85,30 | 86,60 |
| 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 τρεις Θετικοί Μάρτυρες για κάθε εκτέλεση ενίσχυσης PCR. Ο Αρνητικός Μάρτυρας χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί ότι κανένα συστατικό δεν έχει επιμολυνθεί με νουκλεϊκά οξέα κατά την προετοιμασία των αντιδράσεων ενίσχυσης. Οι Θετικοί Μάρτυρες χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόδοσης της ανάλυσης. Η ανάλυση θεωρείται έγκυρη όταν πληρούνται όλες ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Ο Θετικός Μάρτυρας HPV HR χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο HR HPV PCR Mix και β-globin PCR Mix.
- Ο Θετικός Μάρτυρας (HPV42+53) χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο pHRLR HPV PCR Mix.
- Ο Θετικός Μάρτυρας (HPV40+54) χαρακτηρίζεται από καμπύλες ενίσχυσης στο LR HPV PCR Mix.
- Ο Αρνητικός Μάρτυρας χαρακτηρίζεται από μη ύπαρξη καμπυλών ενίσχυσης σε κανένα από τα μίγματα HPV PCR mix, ούτε στο β-globin PCR Mix.

Για μια σωστή ανάλυση γονότυπου, είναι απαραίτητο να ανιχνευθούν οι ακόλουθες κορυφές εύρους θερμοκρασίας τήξης των θετικών μαρτύρων που πρέπει να επαληθεύονται (δοκιμάζονται με κάθε μίγμα PCR) εντός των περιοχών θερμοκρασίας 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 |
| pHR/LR HPV PCR Mix | HPV42 | 75,60 | 77,10 |
| | HPV53 | 77,61 | 78,90 |
| LR HPV PCR Mix | HPV40 | 76,70 | 78,30 |
| | HPV54 | 80,80 | 82,30 |
| β-globin PCR Mix | β-globin | 74,00 | 77,00 |

Εάν ανιχνευθεί σήμα ενίσχυσης που υπερβαίνει την κατώτατη τιμή για οποιοδήποτε από τα μίγματα 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 για το HYRIS bCUBETM

| 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 σωστές. |
| | | Σφάλμα κατά την εισαγωγή του φυσιγγίου. | Βεβαιωθείτε ότι έχετε εισαγάγει σωστά το φυσίγγιο στο bCUBE TM στη σωστή πλευρά. |
| | | Φυσαλίδες στην αντιδραση 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 δειγμάτων. Προσέξτε όταν διανέμετε αντιδραστήρια στα βοθρία της μικροπλάκας(microplate0. |
| | | Σφάλμα σύνθεσης μίγματος PCR. | Βεβαιωθείτε ότι έχετε εκτελέσει σωστά τις οδηγίες που περιγράφονται στην παράγραφο «Προετοιμασία του μίγματος ενίσχυσης PCR ». |
| | | Σφάλμα στεγανοποίησης των πλακών. | Προσέχετε όταν στεγανοποιείτε την πλάκα και ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή. |
| | | Ακατάλληλο δείγμα. | Επαληθεύστε τη συμβατότητα και την επάρκεια του δείγματος. |
| Βιολογικό Δείγμα | Αναποτελεσματικός γονοτυπικός προσδιορισμός - Μη έγκυρη δοκιμή: Εκτός του εύρους του "Πίνακα γονοτύπων" | Ακατάλληλη συλλογή, αποθήκευση ή μεταφορά δειγμάτων. | Επαναλάβετε την απομόνωση DNA ή τη συλλογή του δείγματος. |
| | | Ακατάλληλη απομόνωση DNA. Χημική επιμόλυνση. | Επαληθεύστε τη συμβατότητα της απομόνωσης DNA. Επαναλάβετε την απομόνωση DNA. |
| | | Σφάλμα κατά την εισαγωγή του φυσιγγίου. | Βεβαιωθείτε ότι έχετε εισαγάγει σωστά το φυσίγγιο στο bCUBE TM στη σωστή πλευρά. |
| | | Φυσαλίδες στην αντιδραση PCR. | Επαναλάβετε τη δοκιμή διασφαλίζοντας ότι θα αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στο βοθρίο. |
| | | 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 νουκλεϊκού οξέος. | Επαληθεύστε τη συμβατότητα της απομόνωσης DNA. Επαναλάβετε την απομόνωση DNA. |
| | Μη έγκυρη δοκιμή: καμία καμπύλη ενίσχυσης στο HR HPV PCR mix και καμία καμπύλη ενίσχυσης στο β-globin PCR Mix ή καμπύλη ενίσχυσης με Ct > 30 | Αποτυχία PCR. | Βεβαιωθείτε ότι οι παράμετροι του οργάνου είναι σωστές. |
| | | Σφάλμα κατά την εισαγωγή του φυσιγγίου. | Βεβαιωθείτε ότι έχετε εισαγάγει σωστά το φυσίγγιο στο bCUBE TM στη σωστή πλευρά. |
| | | Φυσαλίδες στην αντιδραση 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. |

4. Όρια

To HPV Selfy Extended - 30 HPV types ανιχνεύει το DNA 14 τύπων HPV υψηλού κινδύνου (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), 5 τύπων HPV πιθανώς υψηλού κινδύνου (HPV26, 53, 69, 73, 82) και 11 τύπων HPV χαμηλού κινδύνου (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 81, 84). Αυτή η εξέταση δεν ανιχνεύει DNA άλλων τύπων HPV. Το HPV Selfy Extended - 30 HPV types παρέχει ποιοτικό αποτέλεσμα.

Το HPV Selfy Extended - 30 HPV types 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 αποτέλεσματα 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 αποτέλεσματα. Ο σχεδιασμός του προϊόντος μπορεί να περιορίσει τις διασταυρούμενες επιμολύνσεις, ωστόσο, αυτές μπορούν να αποφευχθούν μόνο με ορθές εργαστηριακές πρακτικές και με την τήρηση των παρόντων οδηγιών χρήσης.

Η παρουσία αίματος μπορεί να επηρεάσει το HPV Selfy Extended - 30 HPV types.

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 αποτέλεσματα των αναλύσεων μπορεί να επηρεαστούν από ακατάλληλη συλλογή δειγμάτων, τεχνικά σφάλματα ή ανάμειξη 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 αλλοιώσης υψηλού βαθμού (HSIL) ή προκαρκινικής ενδοεπιθηλιακής αλλοιώσης (CIN), ούτε συνεπάγεται ότι θα αναπτυχθεί αλλοιώση 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 αλλοιώσης υψηλού βαθμού (HSIL) ή προκαρκινικής ενδοεπιθηλιακής αλλοιώσης CIN2/3 ή καρκίνος. Ένα μικρό ποσοστό τέτοιων αλλοιώσεων και όγκων εμφανίζεται σε γυναίκες που βρέθηκαν αρνητικές ως προς τον HPV με βάση τις διαθέσιμες τεχνολογίες.

Το HPV Selfy Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types 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 AriaDx Real-time PCR System (Agilent Technologies, Inc.), στο ELITe InGenius® (ELITechGroup S.p.A.) και στο 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 Extended - 30 HPV types προσδιορίστηκε με την προσθήκη πλασμιδίων HPV πλήρους γονιδιώματος σε γνωστή συγκέντρωση. Το LoD του HPV Selfy Extended - 30 HPV types είναι 100 αντίγραφα/αντίδραση για όλους τους τύπους HPV, εκτός από τους HPV 6, 11, 26, 42, 53, 69, 73, 81, 82, 84 (500 αντίγραφα), HPV 40, 43, 51, 54, 61 (1.000 αντίγραφα/αντίδραση) και τους HPV 44, 70 (3.000 αντίγραφα/αντίδραση).

Αναλυτική εξειδίκευση (διασταυρούμενη αντιδραστικότητα)

Η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της ανάλυσης HPV Selfy Extended - 30 HPV types αξιολογήθηκε μέσω δοκιμής μιας ομάδας 17 βακτηρίων, ιών και μυκήτων, και ανθρώπινου DNA. Δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε αυτή την ομάδα παθογόνων.

| Οργανισμός | Συγκέντρωση | Αποτέλεσμα Ct |
|---|---------------------------------------|-----------------|
| Καμπυλοβακτήριο της νήστιδας (<i>Campylobacter jejuni</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Ωίδιο το λευκάζον (<i>Candida albicans</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Χλαμύδια του τραχώματος (<i>Chlamydia trachomatis</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Κυτταρομεγαλοϊός (<i>Cytomegalovirus</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Αιμόφιλος του κόλπου (<i>Gardnerella vaginalis</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Απλός ερπητοϊός τύπου 1 (<i>Herpes Simplex 1</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Απλός ερπητοϊός τύπου 2 (<i>Herpes Simplex 2</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| HIV-1 (dsDNA gag-env-pol) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA (Human genomic DNA) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Μυκόπλασμα των γεννητικών οργάνων (<i>Mycoplasma genitalium</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Μυκόπλασμα Hominis (<i>Mycoplasma hominis</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| <i>Neisseria flava</i> | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Ναϊσσέρια της γονόρροιας (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Ναϊσσέρια της μηνιγγίτιδας (<i>Neisseria meningitidis</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Ωχρά σπειροχαλτή ή Τρεπόνημα το ωχρόν (<i>Treponema pallidum</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| Τριχομονάδα του κόλπου (<i>Trichomonas vaginalis</i>) | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| <i>Ureaplasma parvum</i> | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | 10 ⁴ αντίγραφα / αντίδραση | Αρνητικό |

Παρεμβολές

Το HPV Selfy Extended - 30 HPV types χρησιμοποιεί καθιερωμένες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης 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 Extended - 30 HPV types χρησιμοποιείται σε απευθείας λειτουργία PCR μετά από προεξεργασία 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 Extended - 30 HPV types 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 επαναλήψιες διαφορετικών πλασμιδίων HPV πλήρους γονιδιώματος αραιωμένων σε 1.000 αντίγραφα / αντίδραση, τα οποία αναλύθηκαν στην ίδια ανάλυση PCR. Όλοι οι συντελεστές CV είναι χαμηλότεροι από 5%.

Κλινική επίδοση

Η κλινική επίδοση του HR HPV PCR Mix 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 HR HPV PCR Mix μετά από εκχύλιση με το σύστημα ReliaprepTM Blood gDNA Miniprep System (Promega, Corp., κωδικός #A5082). Η σχετική ευαισθησία (relative sensitivity) του HR HPV PCR Mix 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 HR HPV PCR Mix έναντι 81/98 HC2), ενώ η σχετική ειδικότητα (relative specificity) είναι 0,92 (680/791 HR HPV PCR Mix 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 HR HPV PCR Mix - η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 100%.

119 αυτοσυλλεγόμενα κολπικά επιχρίσματα που προέρχονταν από γυναίκες με CIN2+ και 791 ζεύγη αυτοσυλλεγόμενα κολπικά επιχρίσματα 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 και αναλύθηκαν με HR HPV PCR Mix. Το HR HPV PCR Mix 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).

Η κλινική επίδοση του pHR/LR PCR Mix αξιολογήθηκε σε 46 υπόλοιπα αυτοσυλλεγόμενων κολπικών δειγμάτων, σε συνδυασμό με το kit Ulisse Faster DNA direct (Ulisse BioMed DNA, κωδ. UBM0014). Η εξέταση αναφοράς έγινε με CLART® HPV4 (Genomica, SAU- κωδικός #CS-0215-48). Από τα 17 θετικά δείγματα, τα 16 ήταν θετικά και στο pHR/LR PCR Mix - από τα 29 αρνητικά δείγματα, τα 26 ήταν αρνητικά στο pHR/LR PCR mix. Συνολικά, υπολογίσαμε ολική συμφωνία 91,3% (Συντελεστής καρρα του Cohen - Cohen's kappa: 0,81, σχεδόν τέλεια συμφωνία) - η σχετική ευαισθησία ήταν 94,1% και η ειδικότητα ήταν 89,6%.

Η κλινική επίδοση του LR HPV PCR Mix αξιολογήθηκε σε 58 υπόλοιπα αυτοσυλλεγόμενων κολπικών δειγμάτων, σε συνδυασμό με το kit Ulisse Faster DNA direct (Ulisse BioMed DNA, κωδ. UBM0014). Η εξέταση αναφοράς έγινε με CLART® HPV4 (Genomica, SAU- κωδικός #CS-0215-48)- σε περίπτωση ασυμφωνίας, έγινε ανάλυση της αλληλουχίας των δειγμάτων (sequenced). Από τα 27 θετικά δείγματα, τα 26 ήταν θετικά για LR HPV PCR mix - από τα 32 αρνητικά δείγματα, τα 31 ήταν αρνητικά για το LR HPV PCR Mix, με συνολική συμφωνία 96,6% (Cohen's kappa: 0,932, σχεδόν

τέλεια συμφωνία)- η σχετική διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα είναι 96,3% και 96,8%, αντίστοιχα.

Δυνατότητα γονοτύπωσης

Για να αξιολογηθεί η ικανότητα γονοτυπικού προσδιορισμού του HPV Selfy Extended - 30 HPV types, 59 τυχαία επιλεγμένα δείγματα με θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή HPV Selfy Extended - 30 HPV types 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 Extended - 30 HPV types. 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 ό,τι η HPV Selfy Extended - 30 HPV types, ενώ η HPV Selfy Extended - 30 HPV types εντόπισε λιγότερες λοιμώξεις HPV59 και HPV66. Επαναλάβαμε το HPV Selfy Extended - 30 HPV types στα ίδια δείγματα για να εκτιμήσουμε την αναπαραγωγιμότητα της γονοτύπωσης 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 Extended - 30 HPV types 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 | Επεξήγηση |
|-----------|--|
| IVD | <i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν |
| LOT | Παρτίδα |
| REF | Αριθμός καταλόγου |
| | Χρήση έως την ημερομηνία |
| | Εύρος θερμοκρασίας |
| CONTROL + | Θετικός Μάρτυρας (PC) |
| CONTROL - | Αρνητικός Μάρτυρας (NC) |
| | Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης |
| | Κατασκευαστής |
| | Περιέχει επαρκή ποσότητα για <η> 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.



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

Υποστήριξη πελατών & τεχνική υποστήριξη: support@ulissebiomed.com

Για περισσότερες πληροφορίες επισκεφθείτε την ιστοσελίδα www.ulissebiomed.com

