



Hybrid Capture[®] 2

GC-ID DNA Test

Οδηγίες Χρήσης

Δοκιμασία *digene*[®] HC2 GC-ID DNA

Μια *in vitro* μέθοδος υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων σε μικροπλακίδιο με ενίσχυση σήματος και χρήση χημειοφωταύγειας μικροπλακιδίου για την ποιοτική ανίχνευση του DNA *Neisseria gonorrhoeae* (GC) σε τραχηλικά δείγματα.

Για χρήση με τον παρακάτω εξοπλισμό:

digene[®] HC2 DNA Collection Device
digene[®] HC Female Swab Specimen Collection Kit
Hologic PreservCyt[®] Solution

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΟΥ ΕΝΘΕΤΟΥ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ

1. Ενημερώθηκε το εμπορικό σήμα του προϊόντος
2. Αφαιρέθηκαν οι αναφορές και τα δεδομένα του αντανακλαστικού ελέγχου

Μόνο για επαγγελματική χρήση από εκπαιδευμένο και εξουσιοδοτημένο προσωπικό εργαστηρίου. Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες αυτές πριν χρησιμοποιήσετε τη δοκιμασία.



QIAGEN Gaithersburg, Inc.
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878 USA

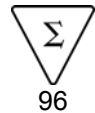


QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

©2011 QIAGEN



IVD



REF 5140-1330

L2172EL Rev. 3



Η ένδειξη CE υποδεικνύει ότι η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Οδηγίας 98/79/EC σχετικά με τις *In Vitro* Διαγνωστικές Ιατρικές Συσκευές.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ	1
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ	2
ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	3
ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ	4
ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ	5
ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ	5
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	6
ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ	7
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	8
ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	11
ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (STM)	11
ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ HOLOGIC PRESERVCYT	12
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	12
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕ ΥΨΗΛΟΥΣ ΡΥΘΜΟΥΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ RAPID CAPTURE SYSTEM	12
ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΤΟ ΧΕΡΙ	13
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ	13
Διαδικασία Προετοιμασίας Βαθμονομητων, Ελεγχων Ποιοτητας Και Δειγματων Σε Μεσο Μεταφορας Δειγματων (STM)	14
Διαδικασία Προετοιμασίας Δειγματων Σε Διαλυμα PreservCyt	16
Προαιρετικο Σημειο Διακοπης	19
ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ	20
ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ	21
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ	22
ΕΚΠΛΥΣΗ	22
Μεθοδος Συστηματος Αυτοματοποιημενης Έκπλυσης Μικροπλακιδιων	22
Μεθοδος Εκπλυσης Με Το Χερι	23
ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ	24
ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ	24
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΙΜΗΣ CUTOFF	26
ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	27
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	28
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ	28
ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ	29
ΘΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ	30
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RLU/CO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ hc2 GC-ID DNA	30
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	31
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑ	31
ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ	35
ΑΚΡΙΒΕΙΑ	37
Ακριβεια Στα Δειγματα Σε Διαλυμα PreservCyt	38
ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	39
Προσθετες Εκτιμησεις Για Τα Δειγματα Σε Διαλυμα PreservCyt	40
ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	42
ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ DNA	44
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ STM	44
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT	45
ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ CUTOFF ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ STM	45
ΙΣΤΟΡΙΚΟ	47
ΙΣΟΔΥΝΑΜΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΧΡΗΣΗΣ.....	50
ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ.....	55
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ QIAGEN	57
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA	58

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Η Δοκιμασία *digene*[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) GC-ID DNA είναι μια *In Vitro* δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων με ενίσχυση σήματος και με χρήση χημειοφωταύγειας μικροπλακιδίου για την ποιοτική ανίχνευση του DNA *Neisseria gonorrhoeae* σε τραχηλικά δείγματα που έχουν συλλεχθεί με *digene* HC2 DNA Collection Device (αποτελούμενο από τραχηλική βούρτσα και μέσο μεταφοράς δειγμάτων *digene* (Specimen Transport Medium [STM]) και σε δείγματα που έχουν συλλεχθεί με Hybrid Capture (HC) Female Swab Specimen Collection Kit (στυλεός Dacron[®] και μέσο μεταφοράς δειγμάτων) ή σε δείγματα που έχουν συλλεχθεί με τη χρήση δειγματολήπτη τύπου σαρώθρου και έχουν τοποθετηθεί σε διάλυμα Hologic PreservCyt[®]. Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA ενδείκνυται για τον προσδιορισμό συμπτωματικών ή μη συμπτωματικών γυναικών ως ένδειξη λοίμωξης με *Neisseria gonorrhoeae*.

Για έλεγχο με υψηλούς ρυθμούς επεξεργασίας δειγμάτων, μπορεί να εκτελεστεί η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA με τη χρήση της Εφαρμογής του Οργάνου Rapid Capture[®] System (RCS).

Για διαγνωστική χρήση *In Vitro*

IVD

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Οι *Neisseria gonorrhoeae* είναι μη κινητικοί, αρνητικοί κατά Gram διπλόκοκκοι, με αρκετά περίπλοκες απαιτήσεις ανάπτυξης. Είναι αερόβιοι, με βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης σε περιβάλλοντα με θερμοκρασίες 35-37°C με παρουσία 3-7% CO₂ και σχετική υγρασία \geq 70%. Η κατά τεκμήριο διάγνωση του *Neisseria gonorrhoeae* λαμβάνεται ιστορικά με απομόνωση των οργανισμών από καλλιέργειες κλινικών δειγμάτων και χρησιμοποιώντας μια χρώση Gram για μορφολογική εξέταση. Η οριστική διάγνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με εξέταση της καλλιέργειας θετική για οξειδάση ή/και καταλάση. Συμπληρωματική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων παρέχεται από εξετάσεις αποδόμησης υδατανθράκων, αιμοσυγκόλλησης και ζύμωσης. Πιο οριστικά, οι άμεσες εξετάσεις για *Neisseria gonorrhoeae* περιλαμβάνουν δοκιμασίες για την ανίχνευση αντιγόνων και ανιχνευτών νουκλεϊκών οξέων. Μια δοκιμασία που πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας προσδιορισμό ανοσοπροσρόφησης συνδεδεμένης με ένζυμο έχει διαπιστωθεί ότι παρέχει την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα με αυτήν που παρέχει η χρώση Gram για την ανίχνευση γονόκοκκων σε δείγματα ουρήθρας ανδρών και πρώτων πρωινών ούρων, εμφανίζει όμως μειωμένη ευαισθησία όταν εφαρμόζεται σε ενδοτραχηλικά δείγματα.^{1,2} Καθώς κατά τη δοκιμασία ανίχνευσης αντιγόνων είναι πιθανό να προκληθεί διασταυρούμενη αντίδραση με συμβιωτικούς οργανισμούς του *Neisseria* και κάποια σχετικά είδη³, η δοκιμασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για κατά τεκμήριο διάγνωση.³

Πιο πρόσφατα, οι εξετάσεις υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων έχουν χρησιμοποιηθεί για αξιολόγηση των κλινικών δειγμάτων για την ανίχνευση *Neisseria gonorrhoeae* σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου χρησιμοποιώντας τόσο ενδοτραχηλικά όσο και ουρηθρικά δείγματα ανδρών.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA που χρησιμοποιεί την τεχνολογία δέσμευσης υβριδίου *digene* Hybrid Capture 2 είναι μια δοκιμασία υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων με ενίσχυση σήματος η οποία χρησιμοποιεί τη μέθοδο ανίχνευσης με χημειοφωταύγεια μικροπλακιδίου. Δείγματα τα οποία περιέχουν το DNA-στόχο υβριδοποιούνται με ένα συγκεκριμένο Ανιχνευτή GC RNA. Τα υβρίδια RNA:DNA που προκύπτουν προσκολλώνται στην επιφάνεια ενός πηγαδίου του μικροπλακιδίου που είναι καλυμμένο με αντισώματα ειδικά για τα υβρίδια RNA:DNA. Τα ακινητοποιημένα υβρίδια αντιδρούν στη συνέχεια με συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αντισώματα, ειδικά για τα υβρίδια RNA:DNA και ανιχνεύονται με ένα υπόστρωμα χημειοφωταύγειας. Αρκετά μόρια αλκαλικής φωσφατάσης ενώνονται με κάθε αντίσωμα. Πολλαπλά συζευγμένα αντισώματα ενώνονται με κάθε δεσμευμένο υβρίδιο προκαλώντας σημαντική ενίσχυση σήματος. Καθώς το υπόστρωμα διαχωρίζεται από τη δεσμευμένη αλκαλική φωσφατάση, εκλύεται φως το οποίο μετρείται σε μονάδες μέτρησης σχετικής φωτεινότητας (RLU) από ένα λουμινόμετρο. Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός υποδηλώνει την παρουσία ή απουσία DNA-στόχου στο δείγμα.

Μια τιμή RLU ίση ή μεγαλύτερη από μια καθορισμένη αναλογία προς στη θετική τιμή Cutoff (CO) υποδηλώνει την παρουσία GC DNA στο δείγμα. Μια τιμή RLU μικρότερη από μια καθορισμένη αναλογία προς τη θετική τιμή Cutoff υποδηλώνει την απουσία GC DNA ή επίπεδα *or* GC DNA που βρίσκονται κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας.

Ο ανιχνευτής GC περιέχει ένα μίγμα ανιχνευτή ειδικά επιλεγμένο για να εξαλείφει ή να ελαχιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις με αλληλουχίες DNA από ανθρώπινα κύτταρα, από άλλα είδη βακτηρίων ή από είδη *Neisseria* διαφορετικά από το *Neisseria gonorrhoeae*. Ο ανιχνευτής GC που παρέχεται με το προϊόν hc2 GC-ID DNA είναι συμπληρωματικός σε περίπου 9.700 bp ή 0,5% του DNA του γονιδιώματος *Neisseria gonorrhoeae* ($1,9 \times 10^6$ bp).⁴ Ένας ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός σε 100% του κρυπτικού πλασμιδίου με 4200 bp.

Έλεγχος με υψηλούς ρυθμούς επεξεργασίας δειγμάτων με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ένα σύστημα μεταφοράς με πιπέττα διανομής και αραίωσης γενικής χρήσης το οποίο ονομάζεται Rapid Capture System (RCS). Το όργανο αυτό πραγματοποιεί επεξεργασία 352 δειγμάτων σε οκτώ ώρες, χρησιμοποιώντας μια εξειδικευμένη για τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA εφαρμογή. Για να είναι δυνατός ο έλεγχος με υψηλούς ρυθμούς επεξεργασίας δειγμάτων, όλα τα διαδικαστικά βήματα της δοκιμασίας εκτελούνται από το σύστημα RCS, με εξαίρεση την αποδιάταξη των δειγμάτων, την ανίχνευση σήματος με χημειοφωταύγεια και την αναφορά των αποτελεσμάτων.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Σε κάθε κιτ δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA περιλαμβάνονται 96 τεστ (REF 5140-1330). Ο αριθμός των αποτελεσμάτων ασθενών κυμαίνεται ανάλογα με τον αριθμό των χρήσεων ανά κιτ:

- 1 χρήση = 88 αποτελέσματα ασθενών
- 2 χρήσεις = 80 αποτελέσματα ασθενών
- 3 χρήσεις = 72 αποτελέσματα ασθενών
- 4 χρήσεις = 64 αποτελέσματα ασθενών

Χρωματικός Δείκτης INDIC Περιέχει αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 0,35 ml
Αντιδραστήριο Αποδιάταξης* REAG DENAT Διάλυμα αραιού υδροξειδίου του νατρίου (NaOH).	1 x 50 ml
Αραιωτής Ανιχνευτή* DIL PROBE Ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 5 ml
Ανιχνευτής GC PROBE GC Ανιχνευτής GC RNA σε ρυθμιστικό διάλυμα.	1 x 200 µl
Αρνητικός Βαθμονομητής CAL - DNA-φορέας σε Μέσο μεταφοράς δειγμάτων (STM) με αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 2 ml
Θετικός Βαθμονομητής GC (PC) CAL GC + 1.0 pg/ml κλωνοποιημένου GC DNA και DNA-φορέας σε STM με αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 1 ml
Έλεγχος ποιότητας CT (QC CT) QC CT 5,0 pg/ml κλωνοποιημένου CT DNA και DNA-φορέας σε STM με αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 1 ml
Έλεγχος ποιότητας GC (QC GC) QC GC 5,0 pg/ml κλωνοποιημένου GC DNA και DNA-φορέας σε STM με αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 1 ml
Μικροπλακίδιο δέσμησης PLATE CAPTURE Επικαλυμμένο με πολυκλωνικά αντισώματα αίγας έναντι υβριδίων RNA:DNA.	1 each
Αντιδραστήριο Ανίχνευσης 1 REAG DET 1 Συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αντισώματα έναντι υβριδίων RNA:DNA σε ρυθμισμένο διάλυμα με αζίδιο του νατρίου 0,05% w/v.	1 x 12 ml
Αντιδραστήριο Ανίχνευσης 2 REAG DET 2 CDP-Star® με Emerald II (υπόστρωμα χημειοφωταύγειας).	1 x 12 ml
Πυκνό Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης* BUF WASH X 30 Περιέχει αζίδιο του νατρίου 1,5% w/v.	1 x 100 ml

*Βλ. ενότητα Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις του παρόντος ενθέτου για πληροφορίες υγείας και ασφάλειας.

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Εξοπλισμός και εξαρτήματα του συστήματος δέσμωσης υβριδίου για διάγνωση *In Vitro*^A

Σύστημα *digene* Hybrid Capture 2 («*digene* HC2 System»), αποτελούμενο από ένα εγκεκριμένο από την QIAGEN λουμινόμετρο («λουμινόμετρο»), εγκεκριμένο από την QIAGEN ηλεκτρονικό υπολογιστή και περιφερειακά υπολογιστή (οθόνη, πληκτρολόγιο, ποντίκι, εκτυπωτής και καλώδιο εκτυπωτή), Λογισμικό Συστήματος *digene* HC2 («*digene* assay analysis software»), Πρωτόκολλα Προσδιορισμού Συστήματος *digene* HC2 για CT/GC, Λογισμικό LumiCheck Plate και το *Εγχειρίδιο Χρήσης Λογισμικού Συστήματος digene HC2*

Περιστροφικός Ανακινήτης I του Συστήματος Δέσμωσης Υβριδίου

Συσκευή Θέρμανσης Μικροπλακιδίου I του Συστήματος Δέσμωσης Υβριδίου

Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων του Συστήματος Δέσμωσης Υβριδίου

Vortexer 2 για σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων του Συστήματος Δέσμωσης Υβριδίου (προαιρετικά)^B

Στατώ μετατροπής και καπάκι στατώ (προαιρετικό ό για χειροκίνητη χρήση - απαιτείται κατά τη χρήση του Συστήματος Rapid Capture με δείγματα *digene* HC2 GC-ID DNA Test και δείγματα PreservCyt)

Στατώ δειγμάτων *digene* και καπάκι στατώ (προαιρετικό για χειροκίνητη χρήση – απαιτείται κατά τη χρήση του Συστήματος Rapid Capture με δείγματα *digene* HC2 GC-ID DNA Test και *digene* HC2 συλλεγμένα με το *digene* HC2 DNA Collection Device)

EXPAND-4™ Πιπέττα και Βάση (προαιρετικά)^C

Συσκευή συλλογής *digene* HC2 DNA Collection Device Kit δειγματοληψίας *digene* Hybrid Capture Female Swab (αποτελείται από 2 στυλεούς® και Μέσο Μεταφοράς Δειγμάτων *digene* (Specimen Transport Medium™))^D

Διανεμητής σφραγίσματος σωλήνων και κόφτης (προαιρετικά, χρησιμοποιείται με το Vortexer 2 για σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων)

Rapid Capture® System (προαιρετικό για έλεγχο με υψηλό όγκο δειγμάτων)^E

Συσκευή Έκπλυσης

Μικροπλακίδια υβριδισμού

Καπάκια μικροπλακιδίων

Κενές λωρίδες μικροπλακιδίου (διαθέσιμες από την Costar, Μοντέλο #2581). Προαιρετικά για χρήση με το σύστημα αυτοματοποιημένης έκπλυσης πλακιδίων I

Πολύ μακριά ρύγχη πιπέτας για την αφαίρεση δειγμάτων Σωλήνες δειγματοληψίας

Βιδωτά πώματα για σωλήνες δειγματοληψίας

Αναλώσιμα δοχεία φύλαξης αντιδραστηρίων

Μεμβράνη σφραγίσματος σωλήνων DuraSeal®

Γενικός εξοπλισμός και εξαρτήματα εργαστηριακής χρήσης

Υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 65 ± 2°C ικανού μεγέθους για να χωρά είτε 1 Στατώ μετατροπής (36 x 21 x 9 cm) ή δύο στατώ δειγμάτων *digene* (31,7 x 15,2 x 6,4 cm το καθένα)

Μικροφυγόκεντρος (προαιρετικά για φυγοκέντρηση φιαλιδίων ανιχνευτών για λήψη μέγιστου όγκου ανιχνευτή)

Μείκτης ισχυρής ανάδευσης με προσαρτημένο πώμα Μονοκάναλη μικροπιπέττα, μεταβλητές ρυθμίσεις για όγκους 20-200 µl και 200-1000 µl

Επαναληπτική πιπέτα θετικού εκτοπίσματος, όπως Eppendorf Repeater® Pipette ή αντίστοιχο

8-κάναλη πιπέττα: μεταβλητές ρυθμίσεις για όγκους 25-200 µl

Χρονόμετρο

Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου, 0,5% v/v τελική συγκέντρωση (λευκαντικού οικιακής χρήσης)

Parafilm® ή αντίστοιχο

Αναλώσιμα ρύγχη μικροπιπέτας με φραγμό αερολύματος για μονοκάναλη πιπέττα (20 έως 200 µl και 200-1000 µl)

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

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

Μαντηλάκια Kimtowels® ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι

Αναλώσιμο κάλυμμα πάγκου εργασίας

Γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας

Σωλήνες 5-ml ή/και 15-ml από πολυπροπυλένιο, με πώμα πίεσης, στρογγυλού πυθμένα (για αραίωση του ανιχνευτή)

Μικροσωλήνες φυγοκέντρησης από πολυπροπυλένιο των 2,0 ml με πώματα

Πρόσθετος εξοπλισμός και εξαρτήματα για επεξεργασία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt

Μηχανή φυγοκέντρησης ταλαντευόμενου κάδου έως 2900 ± 150 x g με υποδοχή κωνικών σωληναρίων φυγοκέντρησης των 10-ml ή 15 ml από πολυπροπυλένιο

Ορολογικές πιπέττες των 5 ml ή πιπέττες μετάγγισης Kit μετατροπής δειγματος *digene* HC2^A

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

Για τη διαδικασία στροβιλισμού με το χέρι:

Σωλήνες μετατροπής δειγματος *digene* HC2 (κωνικά των 15 ml)^F, κωνικά σωλήνες Sarstedt των 10 ml με πώματα ή σωλήνες φυγοκέντρησης των 15 ml από πολυπροπυλένιο με κωνικό πυθμένα και πώματα, μάρκας VWR® ή Corning®

Στατώ σωλήνων με δυνατότητα υποδοχής κωνικών σωλήνων των 10 ml ή 15 ml

Για τη διαδικασία Vortexer 2 σωλήνων πολλαπλών δειγμάτων

Σωλήνες μετατροπής δειγματος *digene* HC2 (κωνικά των 15 ml)^F

Vortexer 2 για Σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων

Στατώ Μετατροπής και καπάκι (ειδικό για κωνικά σωλήνες των 15 ml)

Διανεμητής σφραγίσματος σωλήνων και κόφτης

Μεμβράνη σφραγίσματος σωλήνων DuraSeal® (χρησιμοποιείται με το Vortexer 2 σωλήνων πολλαπλών δειγμάτων)

^A Η QIAGEN διαθέτει μόνο γνήσιο εξοπλισμό και εξαρτήματα που έχουν ελεγχθεί για τις δοκιμασίες *digene* HC2 CT/GC DNA.

^B Απαιτείται επίσης κατά την εκτέλεση της ημι-αυτοματοποιημένης εφαρμογής RCS.

^Γ Προσαρμόσιμο είδος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσαρμοσμένες επεκτάσιμες πολυκάναλες πιπέττες εφόσον η απόσταση των ρυγχών μετά την επέκταση φτάνει τα 3,2 cm. Διαφορετικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια μονοκάναλη πιπέττα με δυνατότητα μετάγγισης 75 μl.

^Δ Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA μετρήθηκαν μόνο με τα κιτ συλλογής που υποδεικνύονται.

^E Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης *Rapid Capture System* για οδηγίες σχετικά χρησιμοποιώντας αυτό το σύστημα για έλεγχο με υψηλό ρυθμό επεξεργασίας δειγμάτων με αυτή τη δοκιμασία.

^{ΣΤ} Είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν οι σωλήνες μετατροπής δείγματος *digene* HC2 (μάρκας VWR ή Corning®), τα οποία διατίθενται από την QIAGEN, προκειμένου να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση της δοκιμασίας κατά την εφαρμογή της διαδικασίας Vortexer 2 σωλήνων πολλαπλών δειγμάτων.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΔΙΑΒΑΣΤΕ ΠΡΟΣΕΚΤΙΚΑ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΙΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΤΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

ΟΛΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά. Καμία γνωστή μέθοδος δοκιμασίας δεν παρέχει απόλυτη εξασφάλιση ότι τα δείγματα δεν μεταδίδουν λοίμωξη. Συνιστάται να χειρίζεστε τα ανθρώπινα δείγματα σύμφωνα με τις ισχύουσες εθνικές/τοπικές πρακτικές βιοασφάλειας.^{5,6,7,8} Χρησιμοποιήστε τις παραπάνω πρακτικές βιοασφάλειας με υλικά που περιέχουν ή είναι ύποπτα ότι περιέχουν λοιμώδεις παράγοντες. Οι προφυλάξεις αυτές περιλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται στις εξής:

1. Μην προβαίνετε σε αναρρόφηση δια στόματος.
2. Μην καπνίζετε, μην τρώτε και μην πίνετε σε χώρους όπου γίνεται χειρισμός και επεξεργασία αντιδραστηρίων ή δειγμάτων.
3. Κατά τον χειρισμό αντιδραστηρίων ή δειγμάτων φοράτε αναλώσιμα γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας. Πλύνετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά την εκτέλεση της δοκιμασίας.
4. Καθαρίστε και απολυμάνετε όλους τους λεκέδες από δείγματα χρησιμοποιώντας ένα φυματιοκτόνο απολυμαντικό, όπως υποχλωριώδες νάτριο 0,5% v/v ή άλλο κατάλληλο απολυμαντικό.^{9,10}
5. Απολυμαίνετε και απορρίπτετε όλα τα δείγματα, αντιδραστήρια και άλλα πιθανώς μολυσμένα υλικά σύμφωνα με τους εθνικούς και τοπικούς κανονισμούς.^{11,12}

Ορισμένα αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει αζίδια μολύβδου ή χαλκού στις σωληνώσεις εργαστηρίου. Αυτά τα αζίδια μπορεί να προκαλέσουν έκρηξη σε περίπτωση κρούσης, όπως χτύπημα με σφυρί. Για να αποφύγετε το σχηματισμό αζιδίων μολύβδου ή χαλκού ξεπλύνετε τις σωληνώσεις με άφθονο νερό μετά την απόρριψη διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Για να απολυμάνετε τις παλιές σωληνώσεις στις οποίες υπάρχει υποψία συσσώρευσης αζιδίων, το Εθνικό Ινστιτούτο Ασφάλειας και Υγιεινής στον Χώρο Εργασίας προτείνει τα εξής: (1) Αναρροφήστε τα υγρά από το σιφώνιο χρησιμοποιώντας ένα λαστιχένιο ή πλαστικό σωλήνα, (2) γεμίστε με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 10% v/v, (3) αφήστε το διάλυμα να δράσει για 16 ώρες και (4) ξεπλύνετε καλά με νερό.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Τα παρακάτω υλικά έχουν αξιολογηθεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις των Οδηγιών 2001/59/EC και 99/45/EC της Ευρωπαϊκής Κοινότητας.



T

Πυκνό Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης. Περιέχει αζίδιο του νατρίου: Τοξικό (T)

R25: Η ουσία αυτή είναι τοξική σε περίπτωση κατάποσης.

R52/53: Επιβλαβές για υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμα δυσμενή αποτελέσματα στο υδρόβιο περιβάλλον.

S36/37/39: Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου.

S45: Σε περίπτωση ατυχήματος ή αδιαθεσίας ζητήστε αμέσως συμβουλή ιατρού (αν είναι δυνατόν, δείξτε την ετικέτα του προϊόντος).



C

Αντιδραστήριο Αποδιάταξης. Περιέχει υδροξείδιο του νατρίου: Διαβρωτικό (C)

R35: Προκαλεί σοβαρά εγκαύματα.

S26: Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και αναζητήστε συμβουλή ιατρού.

S36/37/39: Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου.

S45: Σε περίπτωση ατυχήματος ή αδιαθεσίας ζητήστε αμέσως συμβουλή ιατρού (αν είναι δυνατόν, δείξτε την ετικέτα του προϊόντος).



Xi

Αραιωτής ανιχνευτή. Περιέχει BES και Οξείκο Οξύ: Ερεθιστικό (Xi)

R36/38: Ερεθιστικό για τα μάτια και το δέρμα.

S26: Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και ζητήστε συμβουλή ιατρού.

S36/37/39: Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστασία ματιών/προσώπου.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΚΤΑΚΤΗΣ ΑΝΑΓΚΗΣ 24ΩΡΗΣ ΒΑΣΗΣ


ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΚΤΑΚΤΗΣ ΑΝΑΓΚΗΣ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ, ΓΑΛΛΙΚΑ ΚΑΙ ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ ΔΙΑΤΙΘΕΝΤΑΙ 24 ΩΡΕΣ ΤΟ 24ΩΡΟ ΑΠΟ ΤΟ:

ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ MAINZ, ΓΕΡΜΑΝΙΑ


ΤΗΛ: +49-6131-19240

Ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήσης *Rapid Capture System* για επιπλέον προειδοποιήσεις και προφυλάξεις σχετικά με τη χρήση αυτού του συστήματος για έλεγχο με υψηλό ρυθμό επεξεργασίας δειγμάτων με αυτή τη δοκιμασία.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΧΕΙΡΙΣΜΟ

1. Μόνο για διαγνωστική χρήση *In Vitro*.
2. Η τραχηλική βούρτσα δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε εγκύους.
3. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται δίπλα από το σύμβολο  στην ετικέτα της εξωτερικής συσκευασίας.
4. Η εκτέλεση της δοκιμασίας εκτός των προβλεπόμενων ορίων χρόνου και θερμοκρασίας μπορεί να παράγει μη έγκυρα αποτελέσματα. Οι δοκιμασίες που δεν εμπίπτουν εντός των χρονικών και θερμοκρασιακών διαστημάτων που έχουν καθοριστεί είναι άκυρες και πρέπει να επαναλαμβάνονται.
5. Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA, τα κριτήρια επαλήθευσης βαθμονόμησης της δοκιμασίας, ο ποιοτικός έλεγχος και η διαδικασία ερμηνείας των αποτελεσμάτων των δειγμάτων πρέπει να τηρούνται λεπτομερώς προκειμένου να επιτευχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα των δοκιμασιών.
6. Είναι σημαντικό να μεταφέρετε τον ακριβή όγκο αντιδραστηρίου που ενδείκνυται και να αναμιγνύετε καλά μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου. Σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Η εμφάνιση των χρωματικών αλλαγών που σημειώνονται, επιβεβαιώνει την τήρηση αυτών των συνθηκών.
7. Τα επιμέρους στοιχεία έχουν δοκιμαστεί ως ενιαία μονάδα. **Μην** τα χρησιμοποιείτε εναλλακτικά με στοιχεία από άλλες πηγές ή από διαφορετικές παρτίδες.
8. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι πολύ ευαίσθητα στην περιβαλλοντική αποσύνθεση νουκλεάσης. Οι νουκλεάσες υπάρχουν στο ανθρώπινο δέρμα και στις επιφάνειες ή υλικά που μεταχειρίζονται οι άνθρωποι. Καθαρίστε και καλύψτε τις επιφάνειες εργασίας με ένα αναλώσιμο προστατευτικό κάλυμμα πάγκων εργασίας **και φοράτε γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας σε όλα τα βήματα των δοκιμασιών.**
9. Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας λάβετε τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή μόλυνσης του μικροπλακιδίου δέσμησης και του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 από εξωγενή αλκαλική φωσφατάση. Στις ουσίες που πιθανόν να περιέχουν αλκαλική φωσφατάση περιλαμβάνονται το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1, διάφορα βακτηρίδια, σίελος, τρίχες και έλαια του δέρματος. **Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να καλύπτεται το μικροπλακίδιο δέσμησης μετά την έκπλυση και κατά το στάδιο της επώασης στο Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2, δεδομένου ότι η εξωγενής αλκαλική φωσφατάση μπορεί να αντιδράσει με το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 και να παράγει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.**
10. Προστατεύστε το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 από την παρατεταμένη έκθεση στο άμεσο φως. Χρησιμοποιήστε το αντιδραστήριο στο χρονικό πλαίσιο που ενδείκνυται αμέσως μετά την κλασματοποίηση και αποφύγετε το άμεσο ηλιακό φως.
11. Η επαναληπτική πιπέτα πρέπει να γεμίζει πριν από την μεταφορά του αντιδραστηρίου και να ελέγχεται περιοδικώς για μεγάλες φυσαλίδες αέρα. Υπερβολικές ποσότητες από μεγάλες φυσαλίδες αέρος στο ρύγχος της επαναληπτικής πιπέτας μπορεί να προκαλέσουν ανακριβή διανομή και μπορούν να αποφευχθούν με γέμισμα της πιπέτας, διανομή όλου του υγρού και εκ νέου γέμισμα. Για λεπτομερέστερες οδηγίες χρήσης ανατρέξτε στα εγχειρίδια οδηγιών χρήσης της πιπέτας.
12. Η μετάγγιση με πολυκάναλη πιπέτα πρέπει να πραγματοποιείται με την τεχνική της ανάστροφης μετάγγισης (δείτε την ενότητα *Δέσμηση Υβριδίου*) για τη διανομή των Αντιδραστηρίων ανίχνευσης 1 και 2. Ελέγξτε το κάθε ρύγχος της πολυκάναλης πιπέτας για σωστή εφαρμογή και μετάγγιση.
13. Δίνετε ιδιαίτερη προσοχή κατά την έκπλυση ώστε να εξασφαλίζετε ότι κάθε μικροπηγαδάκι έχει πλυθεί σχολαστικά όπως υποδεικνύεται στις οδηγίες Χειροκίνητης έκπλυσης. Η ανεπαρκής έκπλυση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υπολειμμάτων και μπορεί να παράγει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Υπολείμματα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης στα πηγαδάκια μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μειωμένου σήματος ή περιορισμένη επαναληψιμότητα.
14. Περιμένετε τουλάχιστον 60 λεπτά προκειμένου η Συσκευή θέρμανσης μικροπλακιδίου I να σταθεροποιηθεί στους $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ξεκινώντας χωρίς προθέρμανση. Η μη-τήρηση αυτού του διαστήματος προθέρμανσης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την τήξη του μικροπλακιδίου υβριδισμού. Για λεπτομέρειες ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο χρήσης της Συσκευής Θέρμανσης Μικροπλακιδίου I.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

1. Μετά την παραλαβή, αποθηκεύστε το κιτ σε θερμοκρασία 2-8°C. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, το αντιδραστήριο αποδιάταξης και ο Χρωματικός δείκτης μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 2-30°C, κατά βούληση.
2. Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν μετά την ημερομηνία λήξης του που αναγράφεται δίπλα στο σύμβολο  στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας ή την ημερομηνία λήξης των παρασκευασμένων αντιδραστηρίων (βλ. παρακάτω).
3. Όλα τα παρεχόμενα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση με εξαίρεση το αντιδραστήριο αποδιάταξης, το μείγμα ανιχνευτή GC και το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.

Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης Rapid Capture System* για την παρασκευή του μείγματος ανιχνευτή GC, του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης, του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 και του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 καθώς αυτές οι οδηγίες παρέχονται ειδικά για τη χρήση αυτού του συστήματος για έλεγχο με υψηλούς ρυθμούς επεξεργασίας δειγμάτων.

Μέθοδος παρασκευής αντιδραστήριου

<p>Αντιδραστήριο Αποδιάταξης</p>	<p>ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ: Προσθέστε 5 σταγόνες χρωματικού δείκτη στη φιάλη του Αντιδραστήριου αποδιάταξης και αναμείξτε καλά. Το Αντιδραστήριο αποδιάταξης πρέπει να αποκτήσει ένα ομοιόμορφο σκούρο μοβ χρώμα.</p> <p>Μετά την παρασκευή του, το Αντιδραστήριο αποδιάταξης διατηρείται σταθερό για τρεις μήνες σε θερμοκρασία 2-8°C. Επικολλήστε μια ετικέτα με τη νέα ημερομηνία λήξης του. Εάν ξεθωριάσει το χρώμα, προσθέστε 3 επιπλέον σταγόνες χρωματικού δείκτη και αναμείξτε καλά πριν από τη χρήση.</p> <p>Προειδοποίηση: Το Αντιδραστήριο αποδιάταξης είναι διαβρωτικό. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστατευτικά ματιών/προσώπου. Προσοχή απαιτείται κατά το χειρισμό.</p>																		
<p>Μίγμα ανιχνευτή GC (παρασκευασμένο από αντιδραστήρια ανιχνευτών και αραιωτών ανιχνευτών GC)</p>	<p>ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΖΕΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΩΑΣΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ:</p> <p>ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: ΣΕ ΟΡΙΣΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ Ο ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΠΑΓΙΔΕΥΕΤΑΙ ΣΤΟ ΚΑΠΑΚΙ ΤΟΥ ΦΙΑΛΙΔΙΟΥ.</p> <p>Σημείωση: Απαιτείται εξαιρετική προσοχή κατά το βήμα αυτό για να αποφύγετε την μόλυνση του ανιχνευτή και του μίγματος ανιχνευτή από ριβονουκλεάση. Χρησιμοποιήστε ρύγχη πιπέττας με φραγμό αερολύματος για την αναρρόφηση του ανιχνευτή. Ο αραιωτής ανιχνευτή είναι κολλώδης. Να είστε προσεκτικοί κατά την παρασκευή των ανιχνευτών GC για τη σωστή και πλήρη ανάμειξη. Κατά τη διαδικασία της ανάμειξης πρέπει να σχηματιστεί ένας εμφανής στρόβιλος στο υγρό. Η ατελής ανάμειξη μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο σήμα.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Φυγοκεντρήστε το φιαλίδιο με τον ανιχνευτή GC ώστε το υγρό να πέσει στον πυθμένα του φιαλιδίου. Χτυπήστε ελαφρά το σωλήνα ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάμειξη. • Ορίστε την ποσότητα του απαιτούμενου μείγματος ανιχνευτή που απαιτείται (25 μl/δοκιμασία). Συνιστάται η παρασκευή επιπλέον μείγματος ανιχνευτή ώστε να καλυφθεί ο όγκος που μπορεί να χαθεί στα ρύγχη της πιπέττας ή στα τοιχώματα του φιαλιδίου. Ανατρέξτε στους παρακάτω προτεινόμενους όγκους. Ο μικρότερος συνιστώμενος αριθμός των πηγαδιών για κάθε χρήση είναι 24. Αν επιθυμείτε λιγότερα των 24 πηγαδάκια, ο συνολικός αριθμός ανά δοκιμασία μπορεί να μειωθεί εξαιτίας περιορισμένων όγκων Ανιχνευτή και Αραιωτή του ανιχνευτή. • Μεταφέρετε την απαιτούμενη ποσότητα Αραιωτή ανιχνευτή σε ένα νέο αναλώσιμο δοχείο. Ανάλογα με τον αριθμό των τεστ, συνιστάται ένα σωλήνα από πολυπροπυλένιο χωρητικότητας 5 ml ή 15 ml με στρογγυλό πυθμένα και πώμα πίεσης. Παρασκευάστε το μείγμα ανιχνευτή αναμιγνύοντας τον ανιχνευτή GC με αραιωτή ανιχνευτή σε αναλογία 1:25. <table border="1" data-bbox="535 1344 1282 1575"> <thead> <tr> <th><u>Αριθμός τεστ/Strips</u></th> <th><u>Όγκος Αραιωτή ανιχνευτή*</u></th> <th><u>Όγκος ανιχνευτή*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 μl</td> </tr> <tr> <td>7/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 μl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 μl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 μl</td> </tr> <tr> <td>Ανά πηγαδάκι</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 μl</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Στις παραπάνω τιμές περιλαμβάνεται ο συνιστώμενος επιπλέον όγκος.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε με πιπέττα τον ανιχνευτή στον Αραιωτή ανιχνευτή τοποθετώντας το ρύγχος της πιπέττας στο εσωτερικό τοίχωμα του σωλήνα ακριβώς επάνω από την κυρτή επιφάνεια της στήλης του υγρού και εκβάλλοντας το περιεχόμενο. Μην βυθίζετε το ρύγχος στον Αραιωτή ανιχνευτή. • Στροβιλίστε για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα για τέλεια ανάμειξη. Πρέπει να δημιουργηθεί ένας εμφανής στρόβιλος. Επικολλήστε μια ετικέτα με την ένδειξη "μείγμα ανιχνευτή GC" και φυλάξτε το μείγμα σε ένα καθαρό, κλειστό δοχείο μέχρι να είναι έτοιμο για χρήση. Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο μείγμα ανιχνευτών. 	<u>Αριθμός τεστ/Strips</u>	<u>Όγκος Αραιωτή ανιχνευτή*</u>	<u>Όγκος ανιχνευτή*</u>	96/12	4,0 ml	160,0 μl	7/9	3,0 ml	120,0 μl	48/6	2,0 ml	80,0 μl	24/3	1,0 ml	40,0 μl	Ανά πηγαδάκι	0,045 ml	1,8 μl
<u>Αριθμός τεστ/Strips</u>	<u>Όγκος Αραιωτή ανιχνευτή*</u>	<u>Όγκος ανιχνευτή*</u>																	
96/12	4,0 ml	160,0 μl																	
7/9	3,0 ml	120,0 μl																	
48/6	2,0 ml	80,0 μl																	
24/3	1,0 ml	40,0 μl																	
Ανά πηγαδάκι	0,045 ml	1,8 μl																	

**Ρυθμιστικό
διάλυμα
έκπλυσης**

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΕ ΤΟ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ:

Για το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων , το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μπορεί να παρασκευαστεί κατά τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω και να φυλαχτεί σε καλυμμένο δοχείο. Διαφορετικά, παρασκευάστε κάθε φορά 1 λίτρο ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και τοποθετήστε το στα δοχεία έκπλυσης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων. Ανατρέξτε στον παρακάτω πίνακα για τις αναλογίες ανάμειξης:

Για πρόσθετες οδηγίες φροντίδας και συντήρησης ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χρήσης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων .

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

Ποσότητα πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης	Ποσότητα απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού	Τελικός όγκος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης
33,3 ml	966,7 ml	1 L
66,6 ml	1.933,4 ml	2 L
100,0 ml	2.900,0 ml	3 L

Σημείωση: Είναι πολύ σημαντικό το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων να είναι μονίμως συνδεδεμένο με παροχή ρεύματος. Με τον τρόπο αυτό θα γίνεται έκπλυση συντήρησης μετά από 8 ώρες μη-χρήσης της μονάδας.

Πριν από κάθε δοκιμασία, βεβαιωθείτε ότι το δοχείο συλλογής αποβλήτων του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων είναι άδειο και το δοχείο συλλογής υγρών έκπλυσης γεμάτο με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Για οδηγίες πρόσθετης φροντίδας και συντήρησης ανατρέξτε στο Εγχειρίδιο Χρήσης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων.

Για τη μέθοδο έκπλυσης μικροπλακιδίου με το χέρι:

- Αναμείξτε καλά το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.
- Διαλύστε 100 ml πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 2,9 L απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό και αναμείξτε καλά (ο τελικός όγκος πρέπει να ανέρχεται σε 3 L).
- Σφραγίστε το δοχείο ώστε να αποφευχθεί πιθανή μόλυνση ή εξάτμιση.

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

Συνιστάται η συσκευή έκπλυσης και οι σωληνώσεις να καθαρίζονται με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5% και να ξεπλένονται καλά με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό κάθε τρεις μήνες προκειμένου να αποφευχθεί ενδεχόμενη μόλυνση από αλκαλική φωσφατάση, η οποία υπάρχει στα βακτήρια και τους υφομόκητες.

Όγκοι αντιδραστηρίων έτοιμων για χρήση

Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 και Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2	ΑΜΕΣΩΣ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ: Αναμείξτε καλά το αντιδραστήριο και στη συνέχεια <u>μετρήστε</u> τον κατάλληλο όγκο Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 ή Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 μέσα σε ένα καθαρό δοχείο φύλαξης αντιδραστηρίων, ακολουθώντας τις παρακάτω οδηγίες. Για να αποφευχθεί ενδεχόμενη μόλυνση, αυτά τα αντιδραστήρια ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ να επανατοποθετούνται στις αρχικές φιάλες: Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο υλικό μετά τη χρήση. Αν δεν χρησιμοποιείται 8-κάναλη πιπέττα, μπορεί να αντικατασταθεί με κατάλληλη επαναληπτική πιπέττα. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να παρασκευαστούν κλάσματα του αντιδραστηρίου σε σωλήνα από πολυπροπυλένιο μεγέθους τέτοιου που να χωρά τον απαιτούμενο όγκο, όπως υποδεικνύεται παρακάτω.											
	<table><thead><tr><th>Αριθμός <u>τεστ/Strips</u></th><th>Όγκος Αντιδραστηρίου <u>ανίχνευσης 1 ή 2</u> περιεχόμενο φιάλης</th></tr></thead><tbody><tr><td>96/12</td><td>7,0 ml</td></tr><tr><td>72/9</td><td>5,0 ml</td></tr><tr><td>48/6</td><td>3,0 ml</td></tr><tr><td>24/3</td><td>0,125 ml</td></tr><tr><td>1 τεστ</td><td></td></tr></tbody></table>	Αριθμός <u>τεστ/Strips</u>	Όγκος Αντιδραστηρίου <u>ανίχνευσης 1 ή 2</u> περιεχόμενο φιάλης	96/12	7,0 ml	72/9	5,0 ml	48/6	3,0 ml	24/3	0,125 ml	1 τεστ
Αριθμός <u>τεστ/Strips</u>	Όγκος Αντιδραστηρίου <u>ανίχνευσης 1 ή 2</u> περιεχόμενο φιάλης											
96/12	7,0 ml											
72/9	5,0 ml											
48/6	3,0 ml											
24/3	0,125 ml											
1 τεστ												

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα μόνα δείγματα που συνιστώνται για χρήση με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA είναι τα τραχηλικά δείγματα που συλλέγονται και μεταφέρονται με τη χρήση του *digene* HC2 DNA Collection Device (αποτελούμενο από τραχηλική βούρτσα και μέσο μεταφοράς δειγμάτων *digene*) και του κιτ συλλογής δειγμάτων *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (στυλεός και μέσο μεταφοράς δειγμάτων *digene*) ή τα δείγματα που συλλέγονται με δειγματολήπτη τύπου σαρώθρου και τοποθετούνται σε διάλυμα Hologic PreservCyt Solution. Δείγματα τα οποία έχουν ληφθεί με άλλα μέσα δειγματοληψίας ή έχουν μεταφερθεί με άλλα μέσα μεταφοράς δεν είναι κατάλληλα για τη δοκιμασία αυτή. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης αυτού του κιτ μετρήθηκαν μόνο με τα κιτ συλλογής που υποδεικνύονται. Τα τραχηλικά δείγματα πρέπει να συλλέγονται πριν την εφαρμογή οξικού οξέος ή ιωδίου εάν πραγματοποιείται κολποσκοπική εξέταση. Για περισσότερες διαδικασίες συλλογής και χειρισμού δειγμάτων ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του *digene* HC2 DNA Collection Device

ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (STM)

Τα δείγματα σε Μέσο Μεταφοράς Δείγματος (STM) διατηρούνται έως 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου και μπορούν να αποσταλούν στο εργαστήριο χωρίς ψύξη. Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται σε μονωμένο δοχείο και να παραλαμβάνονται εντός δύο ημερών το αργότερο. Στο μικροβιολογικό εργαστήριο τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C εφόσον η δοκιμασία πρόκειται να πραγματοποιηθεί εντός μίας εβδομάδας. Αν η δοκιμασία πρόκειται να διεξαχθεί μετά από περισσότερο από μία εβδομάδα, αποθηκεύστε τα δείγματα σε θερμοκρασία -20°C για έως 3 μήνες. Στο Μέσον Μεταφοράς Δειγμάτων *digene* έχει προστεθεί συντηρητικό για καθυστέρηση της ανάπτυξης βακτηρίων και για διατήρηση της ακεραιότητας του DNA. Το συντηρητικό αυτό **δεν προορίζεται** για τη συντήρηση της βιωσιμότητας των οργανισμών και κυττάρων. Τα δείγματα που έχουν συλλεχθεί στο μέσο μεταφοράς δειγμάτων *digene* δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια με άλλες μεθόδους δοκιμασιών.

Η σταθερότητα των δειγμάτων σε μέσο μεταφοράς δειγμάτων (STM) για 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου και για μία επιπλέον εβδομάδα σε θερμοκρασία 2-8°C έχει διαπιστωθεί με βάση την προσομοίωση 90 κλινικών δειγμάτων. Αυτά τα 90 δείγματα περιελάμβαναν 40 δείγματα με χαμηλούς πληθυσμούς GC [στο όριο ή κοντά στο όριο της δοκιμασίας ανίχνευσης (LOD)], 35 δείγματα μεσαίας θετικότητας (περίπου 2-5 φορές επάνω από το όριο LOD), 5 δείγματα υψηλής θετικότητας που ξεπερνούσαν το LOD κατά 10 φορές. Τα εναπομένοντα 10 δείγματα ήταν αρνητικά ως προς GC: ωστόσο 5 από αυτά περιείχαν τον οργανισμό CT σε υψηλά επίπεδα. Οι εκτιμήσεις απόδοσης για την δοκιμασία

στηρίζονται σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2-8°C και εξετάστηκαν εντός 1-2 εβδομάδων από τη δειγματοληψία.

Σημειώσεις:

1. Ένα κλάσμα από καθένα από τα 90 δείγματα το οποίο δεν είχε υποστεί αποδιάταξη, υποβλήθηκε σε ακραίες θερμοκρασίες με σκοπό την προσομοίωση των συνθηκών αποθήκευσης και μεταφοράς (αποθήκευση στους -20°C για 3 ημέρες, έπειτα στους 50°C για 5 ημέρες και τέλος 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου). Παρά την απώλεια σήματος (RLU/CO) που παρατηρήθηκε μετά από 8 υπό τις συνθήκες αυτές, η ποιοτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν επηρεάστηκε. Έπειτα από την πρόσθετη περίοδο επώασης των δύο εβδομάδων σε θερμοκρασία δωματίου, παρατηρήθηκαν ποιοτικές διαφορές σε δείγματα που περιείχαν χαμηλούς πληθυσμούς του οργανισμού.
2. Για να αποφύγετε την απασφάλιση των σωλήνων δειγμάτων που αποστέλλονται ή καταψύχονται:
 - Καλύψτε τα πώματα με Parafilm® πριν αποστείλετε τα δείγματα τα οποία έχετε προηγουμένως καταψύξει. Τα δείγματα μπορούν να αποσταλούν κατεψυγμένα ή σε θερμοκρασία 20-25°C.
 - Κατά την αφαίρεση των δειγμάτων από τον καταψύκτη για την εξέτασή τους, αντικαταστήστε αμέσως τα πώματά τους με βιδωτά πώματα για δειγματοληπτικούς σωλήνες.
3. Το *digene* HC2 DNA Collection Device δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε εγκύους. Η δειγματοληψία από έγκυες πρέπει να πραγματοποιείται με το *digene* Female Swab Specimen Collection Kit μόνον.

ΤΡΑΧΗΛΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ HOLOGIC PRESERVACYT

Δείγματα τα οποία συλλέγονται με δειγματολήπτη τύπου σαρώθρου και τοποθετούνται σε διάλυμα Hologic PreservCyt για την δημιουργία αντικειμενοφόρων πλακών Hologic ThinPrep® Pap Test, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται κατά τον συνήθη τρόπο, και οι αντικειμενοφόροι ThinPrep Pap Test πρέπει να παρασκευάζονται σύμφωνα με τις οδηγίες της Hologic.

Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt μπορεί να διατηρηθούν έως και ένα μήνα σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) μετά τη συλλογή και πριν την επεξεργασία τους για τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt δεν καταψύχονται. Για την επεξεργασία αυτών των δειγμάτων ανατρέξτε στη Διαδικασία παρασκευής δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Τα δείγματα πιθανόν να περιέχουν μολυσματικούς παράγοντες και ο χειρισμός τους πρέπει να είναι ανάλογος. Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA μπορεί να πραγματοποιηθεί με το χέρι (όπως υποδεικνύεται στις παρούσες οδηγίες χρήσης) ή με τη χρήση του Rapid Capture System για έλεγχο με υψηλούς ρυθμούς επεξεργασίας δειγμάτων.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕ ΥΨΗΛΟΥΣ ΡΥΘΜΟΥΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ RAPID CAPTURE SYSTEM

Το Rapid Capture System είναι ένα σύστημα γενικής χρήσης αυτοματοποιημένης μεταφοράς και αραίωσης το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA για έλεγχο με υψηλούς ρυθμούς επεξεργασίας δειγμάτων. Το σύστημα αυτό μπορεί να χειρίζεται έως 352 δείγματα σε οκτώ ώρες, μεταξύ των οποίων και μία περίοδος 3,5 ωρών, κατά την οποία δεν απαιτείται παρέμβαση από το χρήστη. Έως και 704 αποτελέσματα μπορούν να παραχθούν εντός 13 ωρών. Η αποδιάταξη των δειγμάτων τα οποία προετοιμάζονται για δοκιμασία εκτελείται ανεξάρτητα από το RCS, στο βασικό σωλήνα συλλογής, όπως και στην περίπτωση της μεθόδου της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA με το χέρι που περιγράφεται παρακάτω, πριν από την τοποθέτηση στην πλατφόρμα RCS. Επιπλέον, η ανίχνευση του σήματος χημειοφωταύγειας και η αναφορά των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνται με τη χρήση του offline συστήματος λουμινόμετρου με έγκριση από την QIAGEN [Digene Microplate Luminometer 2000 (DML 2000™)] – αυτό ισχύει και στις δύο περιπτώσεις, τη μέθοδο με το χέρι και τη μέθοδο RCS. Τα βήματα της διαδικασίας της δοκιμασίας *digene* GC-ID DNA πραγματοποιούνται με την ίδια ακριβώς σειρά που ισχύει και για τη διαδικασία με το χέρι. Η εφαρμογή RCS επιτρέπει τη διαδοχική επεξεργασία έως 4 μικροπλακιδίων, με κάθε μικροπλακίδιο να περιέχει δείγματα και τους απαιτούμενους ποιοτικούς ελέγχους και βαθμονομητές.

Κατά τη χρήση του Rapid Capture System, ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης Rapid Capture System* το οποίο παρέχεται μαζί με το εργαλείο, καθώς και στις παρούσες οδηγίες χρήσης, για τις απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με διαδικασίες και περιγραφές.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΤΟ ΧΕΡΙ

Διαμόρφωση

1. Περιμένετε τουλάχιστον 60 λεπτά προκειμένου η Συσκευή θέρμανσης μικροπλακιδίου I να σταθεροποιηθεί στους $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ξεκινώντας χωρίς προθέρμανση. Για λεπτομέρειες ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης της Συσκευής Θέρμανσης Μικροπλακιδίου I*.
2. Βεβαιωθείτε ότι το υδατόλουτρο βρίσκεται στους 65°C και η στάθμη του νερού είναι αρκετά ψηλά ώστε να μπορείτε εμβαπτίζετε ολόκληρο τον όγκο στους σωλήνες των δειγμάτων.
3. Βγάλτε τα δείγματα και **όλα** τα απαιτούμενα αντιδραστήρια από το ψυγείο **πριν την έναρξη της δοκιμασίας**. Περιμένετε 15 έως 30 λεπτά προκειμένου να φτάσουν σε θερμοκρασία $20-25^{\circ}\text{C}$.
4. Δημιουργήστε μία διάταξη πλακιδίων χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης προσδιορισμού *digene* με πρωτόκολλα προσδιορισμού *digene* για GC. Ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο χρήσης λογισμικού για λεπτομέρειες
5. Για κάθε δοκιμασία, πρέπει να παρασκευάζονται **νέοι** αρνητικοί βαθμονομητές, θετικοί βαθμονομητές και υλικό ποιοτικού ελέγχου. Αναμίξτε καλά τους βαθμονομητές και τους ποιοτικούς ελέγχους. Εάν χρησιμοποιείτε το MST Vortexer 2, αφαιρέστε 500 μl από κάθε δείγμα σε άδειους δειγματοληπτικούς σωλήνες, προσθέτοντας τις κατάλληλες ετικέτες. Διαφορετικά αφαιρέστε 200 μl από καθένα σε σωλήνες από πολυπροπυλένιο των 2-ml χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο και τοποθετώντας τις κατάλληλες ετικέτες.
6. **Ο αρνητικός βαθμονομητής και ο θετικός βαθμονομητής πρέπει να εξεταστούν ΠΡΩΤΑ** εις τριπλούν για κάθε παρτίδα των εξεταζόμενων δειγμάτων. Οι Ποιοτικοί έλεγχοι και τα δείγματα πρέπει να εξετάζονται μεμονωμένα. Οι βαθμονομητές, οι ποιοτικοί έλεγχοι και τα δείγματα πρέπει να ελέγχονται σε μια διαμόρφωση στηλών με 8 μικροπηγάδια, με τρόπο ώστε: τα κλάσματα του αρνητικού βαθμονομητή (NC) να τοποθετηθούν στις θέσεις A1, B1, C1, ο θετικός βαθμονομητής (PC) στις θέσεις D1, E1, F1, το QC CT στη θέση G1, το QC GC στη θέση H1. Στη συνέχεια πρέπει να τοποθετηθούν τα δείγματα ξεκινώντας από τη θέση A2. Δείτε το παρακάτω παράδειγμα διάταξης. Συμβουλευθείτε το κατάλληλο εγχειρίδιο χρήσης του εγκεκριμένου από την QIAGEN λουμινομέτρου και το κατάλληλο εγχειρίδιο χρήσης λογισμικού ανάλυσης προσδιορισμού *digene*.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕ 24 ΜΙΚΡΟΠΗΓΑΔΑΚΙΑ:

Σειρά	Στήλη		
	1	2	3
A	NC	Δείγμα 1	Δείγμα 9
B	NC	Δείγμα 2	Δείγμα 10
Γ	NC	Δείγμα 3	Δείγμα 11
Δ	PC	Δείγμα 4	Δείγμα 12
E	PC	Δείγμα 5	Δείγμα 13
ΣΤ	PC	Δείγμα 6	Δείγμα 14
Z	QC CT	Δείγμα 7	Δείγμα 15
H	QC GC	Δείγμα 8	Δείγμα 16

ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ

Σημειώσεις:

- **Προσοχή:** Το Αντιδραστήριο αποδιάταξης είναι διαβρωτικό. Φοράτε κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστατευτικά ματιών/προσώπου. Κατά τον χειρισμό του απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή. Φοράτε γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας.
- **Σημαντικό:** Ορισμένα δείγματα μπορεί να περιέχουν αίμα ή άλλο βιολογικό υλικό το οποίο ενδεχομένως να συγκαλύψει τις χρωματικές αλλαγές μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου αποδιάταξης. Δείγματα τα οποία παρουσιάζουν σκούρο χρώμα πριν την προσθήκη του Αντιδραστηρίου αποδιάταξης πιθανόν να μην εμφανίσουν τη σωστή χρωματική αλλαγή σε αυτή τη φάση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αποτυχία εμφάνισης των σωστών χρωματικών αλλαγών δεν θα

επηρεάσει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Η σωστή ανάμειξη μπορεί να εξακριβωθεί με την παρακολούθηση των χρωματικών αλλαγών των βαθμονομητών και ποιοτικών ελέγχων.

- Κατά το στάδιο της αποδιάταξης βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού στο υδατόλουτρο είναι αρκετά υψηλή ώστε να βυθίζεται ολόκληρος ο όγκος που περιέχεται στο σωλήνα δειγμάτων.
- Τα δείγματα μπορούν να παρασκευαστούν κατά το στάδιο της αποδιάταξης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία 2-8°C για ένα εικοσιτετράωρο ή σε θερμοκρασία -20°C έως και για 3 μήνες. Επιτρέπονται το πολύ 3 κύκλοι ψύξης-τήξης με μέγιστη διάρκεια 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου για κάθε κύκλο τήξης. Αναμείξτε καλά πριν από τη χρήση.
- Οι βαθμονομητές και οι ποιοτικοί έλεγχοι μπορούν να παρασκευαστούν έως και το τέλος του σταδίου της αποδιάταξης και να φυλαχτούν ολονύχτια σε θερμοκρασία 2-8°C, **αλλά δεν πρέπει να καταψυχθούν**. Εάν οι βαθμονομητές και οι ποιοτικοί έλεγχοι έχουν καταψυχθεί, πρέπει να καταστραφούν.
- Μετά την αποδιάταξη και την επώαση, τα δείγματα δεν θεωρούνται πλέον λοιμογόνα.¹³ Ωστόσο, το προσωπικό του εργαστηρίου πρέπει να εξακολουθεί να τηρεί τα εθνικά/τοπικά μέτρα προφύλαξης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΩΝ, ΕΛΕΓΧΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (STM)

Σημειώσεις:

- Μην αφαιρείτε το δειγματολήπτη πριν από την αποδιάταξη.
 - Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, είναι σημαντικό όλα τα υλικά των βαθμονομητών, ποιοτικών ελέγχων και δειγμάτων σε μέσο μεταφοράς (STM) να έρθουν σε επαφή με το αντιδραστήριο αποδιάταξης. Η ανάμειξη μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου αποδιάταξης είναι πολύ σημαντικό βήμα: **Βεβαιωθείτε ότι το Multi-Specimen Tube Vortexer 2 έχει ρυθμιστεί σε ταχύτητα 100 (μέγιστη ταχύτητα) και ότι παρατηρείται ορατός στροβιλισμός του υγρού κατά τη διάρκεια της μίξης, τέτοιος ώστε να επιτρέπει στο υγρό να πραγματοποιεί έκπλυση ολόκληρης της εσωτερικής επιφάνειας του σωληναρίου. Εάν πραγματοποιείτε την ισχυρή ανάδευση με το χέρι, βεβαιωθείτε ότι κάθε βαθμονομητής, ποιοτικός έλεγχος και δείγμα αναμιγνύονται μεμονωμένα, στροβιλίζοντας το καθένα για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα, έτσι ώστε το υγρό να ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα αναστρέφοντάς το μια φορά.**
1. Αφαιρέστε και απορρίψτε τα πώματα από τα σωλήνες που περιέχουν τους βαθμονομητές, τους ποιοτικούς ελέγχους και τα δείγματα που βρίσκονται σε μέσο μεταφοράς δειγμάτων.
Σημείωση: Τα πώματα που αφαιρούνται από τους σωλήνες δειγμάτων θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά και πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους εθνικούς/τοπικούς κανονισμούς.
 2. Μεταφέρετε το Αντιδραστήριο αποδιάταξης με χρωματικό δείκτη σε κάθε βαθμονομητή, ποιοτικό έλεγχο ή δείγμα σε STM χρησιμοποιώντας μια επαναληπτική ή ρυθμιζόμενη πιπέττα. Φροντίστε να μην αγγίζετε τα τοιχώματα του σωληναρίου ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση των δειγμάτων. Ο απαιτούμενος όγκος Αντιδραστηρίου Αποδιάταξης πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος. Ο ακριβής όγκος για κάθε τύπο βαθμονομητή, ποιοτικό έλεγχο και δείγμα παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.
- **Διαλύετε το Αντιδραστήριο αποδιάταξης που απομένει πριν από την απόρριψη σύμφωνα με τις εθνικές/τοπικές εργαστηριακές διαδικασίες.**

Βαθμονομητής, Έλεγχος Ποιότητας ή Δείγμα	Απαιτούμενος όγκος Αντιδραστηρίου αποδιάταξης
Αρνητικός Βαθμονομητής, Θετικός Βαθμονομητής και Έλεγχος Ποιότητας, 200 μl	100 μl
Αρνητικός Βαθμονομητής, Θετικός Βαθμονομητής και Έλεγχος Ποιότητας, 500 μl	250 μl
Τραχηλικό δείγμα, 1 ml	500 μl

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

Μέθοδος Vortexer για Σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων

Σημείωση: Τα δείγματα QIAGEN που αναμιγνύονται με χρήση του MST Vortexer 2 **πρέπει** να υποβάλλονται σε υβριδισμό με χρήση της μεθόδου μικροπλακιδίου υβριδισμού και της Συσκευής Θέρμανσης μικροπλακιδίου I. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του MST Vortexer 2 για περαιτέρω λεπτομέρειες.

- α) Καλύψτε τους σωλήνες των βαθμονομητών, Ποιοτικών ελέγχων και των δειγμάτων σε STM με μεμβράνη σφραγίσματος σωλήνων DuraSeal[®] περνώντας την ταινία επάνω από τους σωλήνες που είναι τοποθετημένα στο στατώ.
- β) Τοποθετήστε το καπάκι του στατώ επάνω από τα καλυμμένα με ταινία σωλήνες και ασφαλίστε τα με τα δύο πλευρικά κλιπ. Κόψτε την ταινία με τον κόπτη.
- γ) Τοποθετήστε το στατώ επάνω στο Multi-Specimen Tube Vortexer 2 και ασφαλίστε το με το σφιγκτήρα. Βεβαιωθείτε ότι η ταχύτητα έχει ρυθμιστεί στο 100 (μέγιστη ταχύτητα) και στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του vortexer στη θέση ON. Στροβιλίστε τους σωλήνες για 10 δευτερόλεπτα.

Μέθοδος στροβιλισμού μεμονωμένων σωλήνων με το χέρι

- α) Καλύψτε πάλι τους σωλήνες βαθμονομητών και των ποιοτικών ελέγχων και των δειγμάτων σε STM με καθαρά βιδωτά πώματα για δειγματοληπτικούς σωλήνες.
 - β) Αναμείξτε καλά κάθε σωλήνα, στροβιλίζοντάς τον μεμονωμένα σε μέγιστη ταχύτητα και για 5 δευτερόλεπτα.
 - γ) Αναστρέψτε μία φορά κάθε σωλήνα προκειμένου να βραχεί το εσωτερικό του, το πώμα και το περιστόμιό του.
 - δ) Επανατοποθετήστε το σωλήνα στο στατώ.
4. Ανεξάρτητα από τη μέθοδο στροβιλισμού που εφαρμόζεται, **κατά την ανάμιξη πρέπει να δημιουργηθεί ένας εμφανής στρόβιλος στο εσωτερικό κάθε σωληναρίου, έτσι ώστε το υγρό να ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου.** Οι βαθμονομητές, ποιοτικοί έλεγχοι και τα δείγματα πρέπει να αποκτήσουν μοβ χρώμα.
5. Επώαστε των σωλήνων στο στατώ σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία $65 \pm 2^\circ\text{C}$ για 45 ± 5 λεπτά (ποιοτικοί έλεγχοι, βαθμονομητές και δείγματα τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να εξεταστούν άμεσα. Οι βαθμονομητές και ποιοτικοί έλεγχοι μπορούν να φυλαχτούν σε θερμοκρασία $2-8^\circ\text{C}$ για ένα εικοσιτετράωρο, όπως περιγράφεται στις **Σημειώσεις** παραπάνω). Για τη φύλαξη των δειγμάτων, ανατρέξτε στην ενότητα *Προαιρετικό σημείο διακοπής*. Παρασκευάστε το μείγμα ανιχνευτή GC κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης. Ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου*.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVACYT

Σημειώσεις:

- Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης του προϊόντος *digene* HC2 Sample Conversion Kit (Κιτ μετατροπής δείγματος).
- Η επεξεργασία κλάσματος 4-ml του διαλύματος PreservCyt επαρκεί για 2 τεστ, όταν η διαδικασία διεξάγεται με το χέρι. Ο ελάχιστος όγκος που μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία είναι 4 ml. Ανατρέξτε στο εδάφιο “Ισοδυναμία μεταξύ δειγμάτων σε STM και δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt” για λεπτομέρειες σχετικά με τον ελάχιστο όγκο υπολείμματος.
- Ετοιμάστε τα δείγματα του διαλύματος PreservCyt σε παρτίδες των 36 ή λιγότερων. Σε αντίθετη περίπτωση, τα δισκία μπορεί να αποσπαστούν κατά τη μεταφορά του υπερκείμενου υγρού. Αυτό είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού δισκίου στο στάδιο της μεταφοράς με πιπέττα. Αν προετοιμάζετε επιπλέον φιαλίδια διαλύματος PreservCyt, μην αρχίσετε την προετοιμασία τους μέχρι να ολοκληρώσετε την προετοιμασία της πρώτης παρτίδας.

Χρησιμοποιήστε το Αντιδραστήριο αποδιάταξης (DNR) που παρέχεται με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA (βλ. ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου*) ή το DNR που παρέχεται με το κιτ μετατροπής δείγματος *digene* HC2 Sample Conversion Kit. Για την προετοιμασία του DNR που παρέχεται με το κιτ μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2 Sample Conversion Kit, προσθέστε 3 σταγόνες Χρωματικού Δείκτη στη φιάλη του DNR και αναμίξτε καλά. Το διάλυμα πρέπει να αποκτήσει ένα ομοιόμορφο σκούρο μοβ χρώμα. Για τον προσδιορισμό των απαιτήσεων όγκου, χρησιμοποιήστε τον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Απαιτήσεις όγκου: Παρασκευή Αντιδραστηρίου.

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

1. Επικολλήστε ετικέτα με την ταυτότητα του δείγματος επάνω στο σωλήνα μετατροπής δείγματος *digene* HC2, σε ένα κωνικό σωλήνα Sarstedt χωρητικότητας 10 ml ή σε ένα κωνικό σωλήνα μάρκας VWR ή Corning χωρητικότητας 15 ml.
2. Χειρισμός ενός δείγματος τη φορά:
 - α. Ανακινήστε δυνατά κάθε φιαλίδιο με διάλυμα PreservCyt μέχρι τα κύτταρα να εμφανίζονται ομοιογενώς κατανεμημένα.
 - β. Επειδή τα κύτταρα κατακάθονται πολύ γρήγορα, Μεταφέρετε με πιπέττα αμέσως τον κατάλληλο όγκο δείγματος PreservCyt στο σωλήνα με την ανάλογη ετικέτα. Μεταφέρετε με πιπέττα το διάλυμα PreservCyt στον πάτο του κωνικού σωληναρίου ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση κυτταρικού υλικού στο εσωτερικό του σωληναρίου.
3. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο Ρυθμιστικού Διαλύματος Μετατροπής Δείγματος σε κάθε σωλήνα (βλ. Πίνακα 1).
4. Επανατοποθετήστε το πώμα και ανακινήστε σχολαστικά το περιεχόμενο κάθε σωλήνα χρησιμοποιώντας ένα μείκτη ισχυρής ανάδευσης με προσαρτημένο πώμα.

Σημείωση: Η διαδικασία MST Vortexer 2 δεν έχει επικυρωθεί για τον στροβιλισμό δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt με Ρυθμιστικό Διάλυμα Μετατροπής Δείγματος πριν από τη φυγοκέντρηση και συνεπώς δεν πρέπει να εφαρμόζεται σε αυτό το στάδιο.

5. Φυγοκεντρήστε τους σωλήνες σε συσκευή φυγοκέντρησης ταλαντευόμενου κάδου στα $2.900 \pm 150 \times g$ για 15 ± 2 λεπτά.
6. Κατά τη φυγοκέντρηση παρασκευάστε το μείγμα του Μέσου Μεταφοράς Δείγματος *digene* + Αντιδραστηρίου αποδιάταξης (STM/DNR) σε αναλογία 2:1, σύμφωνα με τον Πίνακα 2.

Σημείωση: Το μείγμα Μέσου Μεταφοράς Δείγματος + Αντιδραστηρίου αποδιάταξης (STM/DNR) πρέπει να παρασκευάζεται φρέσκο κάθε ημέρα εκτέλεσης δοκιμασίας.

- a. Για τον προσδιορισμό του απαιτούμενου ολικού όγκου του μίγματος STM/DNR, χρησιμοποιήστε τον αρχικό όγκο του διαλύματος δειγμάτων PreservCyt ως οδηγό και κατόπιν πολλαπλασιάστε τους όγκους STM και το DNR “ανά σωλήνα” επί τον αριθμό των δειγμάτων που πρόκειται να επεξεργαστείτε (βλ. Πίνακα 2).

Πίνακας 2. Απαιτήσεις όγκου: STM/DNR.

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

* Οι όγκοι που καταγράφονται σε αυτές τις στήλες δεν πρέπει να προστίθενται απευθείας στο σωλήνα δείγματος.

- b. Αναμίξτε καλά το μείγμα με ισχυρή ανάδευση (στροβιλισμό).
7. Αφαιρέστε τους σωλήνες από τη συσκευή φυγοκέντρησης ένα προς ένα και τοποθετήστε τα σε στατώ ή στατώ μετατροπής (Conversion Rack). Στη βάση κάθε σωλήνα πρέπει να υπάρχει ένα ροζ/πορτοκαλί σφαιρίδιο.

Σημείωση: Δείγματα στα οποία δεν υπάρχει εμφανές δισκίο μετά τη φυγοκέντρηση δεν ενδείκνυνται για τη δοκιμασία και πρέπει να απορρίπτονται.

8. Χειρισμός μεμονωμένων σωλήνων:
 - a. Αφαιρέστε το πώμα και τοποθετήστε το επάνω σε ένα καθαρό χαρτομάντιλο με ελάχιστο χνούδι.
 - β. Αδειάστε προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό.
 - γ. Διατηρήστε το σωλήνα σε ανεστραμμένη θέση, στυπώστε το προσεκτικά (χτυπώντας περίπου 6 φορές) σε απορροφητικά χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι μέχρι να μην στάζει υγρό από το σωλήνα. Χρησιμοποιείτε μια καθαρή πλευρά του χαρτομάντιλου κάθε φορά. **Μην** αφήνετε τα δισκία των κυττάρων να ολισθήσουν προς τα κάτω κατά το στύπωμα.

Σημειώσεις:

- Μην στυπώνετε δύο φορές στο ίδιο σημείο του απορροφητικού χαρτομάντιλου με ελάχιστο χνούδι.

- Είναι σημαντικό να αφαιρεθεί η μέγιστη ποσότητα διαλύματος PreservCyt με το στύπωμα. Ωστόσο, είναι φυσιολογικό να υπάρχουν υπολείμματα διαλύματος PreservCyt μετά το στύπωμα.
- δ. Τοποθετήστε το σωλήνα σε στατώ ή στο Στατώ Μετατροπής.

Στροβιλισμός και αποδιάταξη

Διαδικασία στροβιλισμού με το χέρι

1. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο μείγματος Μέσου Μεταφοράς Δείγματος + Αντιδραστηρίου αποδιάταξης σε κάθε σφαιρίδιο (βλ. Πίνακα 2). Επανατοποθετήστε το πώμα και εναιωρήστε τα δισκία στροβιλίζοντας κάθε σωλήνα μεμονωμένα για τουλάχιστον 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Αν η εναιώρηση κάποιου δισκίου είναι δύσκολη, στροβιλίστε για επιπλέον 10-30 δευτερόλεπτα ή έως ότου το σφαιρίδιο αποδεσμευτεί από τη βάση του σωληναρίου. Σε περίπτωση που κάποιο δισκίο παραμείνει αδιάλυτο μετά τον πρόσθετο στροβιλισμό (μέγιστης συνολικής διάρκειας 2 λεπτών), σημειώστε την ταυτότητα του δείγματος και προχωρήστε στο επόμενο βήμα.
2. Τοποθετήστε τους σωλήνες σε στατώ.
3. Τοποθετήστε το στατώ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $65 \pm 2^\circ\text{C}$ για 15 ± 2 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού είναι αρκετά υψηλή ώστε να καλύπτει όλο το υγρό που περιέχεται στους σωλήνες.
4. Απομακρύνετε το στατώ με τα δείγματα από το υδατόλουτρο και στροβιλίστε κάθε δείγμα για 15-30 δευτερόλεπτα.
Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι όλα τα δισκία έχουν εναιωρηθεί πλήρως σε αυτό το στάδιο. Δείγματα τα οποία εξακολουθούν να περιέχουν ορατά δισκία δεν ενδείκνυνται για τη δοκιμασία και πρέπει να απορριφθούν.
5. Επαναφέρετε το στατώ στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας $65 \pm 2^\circ\text{C}$ και συνεχίστε την αποδιάταξη για άλλα 30 ± 3 λεπτά.
6. Προχωρήστε στο *Βήμα υβριδισμού*, όπως περιγράφεται παρακάτω, ή ανατρέξτε στην ενότητα *Προαιρετικό σημείο διακοπής* για πληροφορίες σχετικά με τη φύλαξη και το χειρισμό των δειγμάτων που έχουν υποστεί αποδιάταξη.

Διαδικασία Vortexer 2 σωλήνων πολλαπλών δειγμάτων (MST)

Σημειώσεις:

- Η διαδικασία Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 έχει επικυρωθεί για την επεξεργασία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt ύστερα από φυγοκέντρηση και μετάγγιση του υπερκείμενου υγρού.
 - Μόνο το MST Vortexer 2 είναι ειδικά σχεδιασμένο για την επεξεργασία δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt.
 - Το Στατώ Μετατροπής και το Καπάκι είναι ειδικά σχεδιασμένα να χωράν σωλήνες μετατροπής *digene* HC2 (κωνικοί σωλήνες 15-ml των εταιριών VWR ή Corning). Ο χρήστης πρέπει να χρησιμοποιεί μόνο έναν τύπο σωλήνων στο Στατώ Μετατροπής κάθε φορά. Άλλες μάρκες δεν έχουν επικυρωθεί για χρήση.
 - Απαιτείται αυστηρή τήρηση των προκαθορισμένων χρόνων στροβιλισμού για το Στατώ Μετατροπής και το Καπάκι.
 - Το Στατώ Μετατροπής και το Καπάκι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το στροβιλισμό των βαθμονομητών ή ποιοτικών ελέγχων της δοκιμασίας *digene* HC2 DNA. Το ύψος των σωλήνων STM εμποδίζει την επαρκή ανάδευση όταν χρησιμοποιείται το Στατώ Μετατροπής και το Καπάκι.
1. Μετά τη στύπωση καθενός από τους σημειωμένους κωνικούς σωλήνες 15-ml, τοποθετήστε καθένα στη σωστή του θέση στο Στατώ Μετατροπής.

2. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο μείγματος Μέσου Μεταφοράς Δείγματος + Αντιδραστηρίου αποδιάταξης σε κάθε σφαιρίδιο (Πίνακας 2).
3. Καλύψτε τους κωνικούς σωλήνες 15-ml με μεμβράνη σφραγίσματος σωλήνων DuraSeal περνώντας τη μεμβράνη πάνω από τους σωλήνες στο στατώ.
4. Τοποθετήστε το καπάκι του στατώ επάνω από τα καλυμμένα με ταινία σωλήνες και ασφαλίστε τα με τους δύο πλευρικούς σφιγκτήρες. Έχοντας ασφαλίσει το καπάκι, κόψτε τη μεμβράνη με τον κόπτη.
5. Μετακινήστε την κόκκινη λαβή προς τα επάνω, ώστε να βρίσκεται σε οριζόντια θέση.
6. Τοποθετήστε το Στατώ Μετατροπής και το Καπάκι στο MST Vortexer 2 κατά τρόπο ώστε η μεγαλύτερη διαγώνια γωνία του Στατώ Μετατροπής να βρίσκεται στη δεξιά μπροστινή γωνία. Τοποθετήστε το στατώ και το καπάκι στην πλατφόρμα του MST Vortexer 2, κατά τρόπο ώστε να εφαρμόζει με ασφάλεια ανάμεσα στους οδηγούς. Ασφαλίστε το στατώ πιέζοντας την κόκκινη λαβή προς τα κάτω στην κάθετη θέση. Με την κίνηση αυτή το στατώ θα κλειδώσει.
7. Βεβαιωθείτε ότι η ταχύτητα του κινητήρα είναι ρυθμισμένη στο 100 (μέγιστη ταχύτητα) και ότι το περιστροφικό κουμπί παλμών βρίσκεται στη θέση OFF.
8. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση ON. **Στροβιλίστε τους σωλήνες για 30 δευτερόλεπτα.**
9. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση OFF.
10. Αφαιρέστε το Στατώ Μετατροπής και το καπάκι από το MST Vortexer 2 τραβώντας την κόκκινη λαβή προς τα επάνω.
11. Τοποθετήστε το στατώ σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $65 \pm 2^\circ\text{C}$ για 15 ± 2 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι η στάθμη του νερού καλύπτει πλήρως όλο το υγρό σε όλοι οι σωλήνες.
12. Μετά την επώαση διάρκειας 15 λεπτών, αφαιρέστε το στατώ με τα δείγματα από το υδατόλουτρο.
13. Για να αποφύγετε τυχόν παφλασμό, στεγνώστε το στατώ από το περιττό νερό πριν το τοποθετήσετε στο MST Vortexer 2.
14. Ασφαλίστε το Στατώ Μετατροπής και καπάκι στο MST Vortexer 2 όπως περιγράφεται στο *Βήμα 6*.
15. Βεβαιωθείτε ότι η ρύθμιση της ταχύτητας είναι 100 και στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση ON. **Στροβιλίστε τους σωλήνες για 1 λεπτό.**
16. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση OFF.
Σημείωση: Η διαδικασία MST Vortexer 2 τυποποιεί την ταχύτητα, τους χρόνους και τη διαδικασία μίξης, εξαλείφοντας την ανάγκη οπτικού ελέγχου των κυτταρικών σφαιριδίων, ο οποίος απαιτείται κατά την εφαρμογή της διαδικασίας μη-αυτόματου στροβιλισμού.
17. Επαναφέρετε το στατώ στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας $65 \pm 2^\circ\text{C}$ και συνεχίστε την αποδιάταξη για 30 ± 3 λεπτά.
18. Αφαιρέστε το στατώ από το υδατόλουτρο, στεγνώστε το και ασφαλίστε το στο vortexer.
19. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση ON. **Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα.**
20. Στρέψτε το διακόπτη λειτουργίας του Vortexer στη θέση OFF. Αφαιρέστε το στατώ.
21. Αφαιρέστε αμέσως το καπάκι του στατώ και τη μεμβράνη σφραγίσματος σωλήνων DuraSeal από τα δείγματα.
22. Προχωρήστε στο *Βήμα υβριδισμού*, όπως περιγράφεται παρακάτω, ή ανατρέξτε στην ενότητα *Προαιρετικό σημείο διακοπής* για πληροφορίες σχετικά με τη φύλαξη και το χειρισμό των δειγμάτων που έχουν υποστεί αποδιάταξη.

ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Μετά την αποδιάταξη, τα δείγματα STM και τα τροποποιημένα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt μπορούν να φυλαχτούν σε θερμοκρασία $2 - 8^\circ\text{C}$ για διάστημα μίας ημέρας ή σε θερμοκρασία -20°C για μέγιστο διάστημα 3 μηνών. Σε περίπτωση ημερήσιας κατάψυξης, τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν στο Στατώ Μετατροπής, αφού τοποθετήσετε καθαρή μεμβράνη DuraSeal και καθαρό καπάκι στατώ. Πριν από τη φύλαξη σε θερμοκρασία -20°C , πρέπει να αφαιρεθεί το καπάκι και η μεμβράνη DuraSeal και να τοποθετηθούν πώματα στους σωλήνες. Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα πρέπει να εξισορροπηθούν σε θερμοκρασία $20 - 25^\circ\text{C}$ και να υποβληθούν σε στροβιλισμό πριν προχωρήσετε στο βήμα υβριδισμού.

Σημείωση: Μην φυλάσσετε και μην αποστέλλετε σε ξηρό πάγο δείγματα που έχουν υποστεί αποδιάταξη.

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

ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Σημειώσεις:

- Το μείγμα ανιχνευτή GC είναι κολλώδες. Φροντίστε για τη σωστή ανάμειξή του και για την πλήρη διανομή της απαιτούμενης ποσότητας στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου υβριδισμού. Ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου*.
- Σε περίπτωση όπου το δείγμα το οποίο υπέστη αποδιάταξη έχει αποθηκευτεί σε θερμοκρασία -20°C , περιμένετε ώσπου το δείγμα τηχθεί σε θερμοκρασία $20-25^{\circ}\text{C}$ και στροβιλίστε το επαρκώς πριν προχωρήσετε στον υβριδισμό.
- Προθερμάνετε τη Συσκευή θέρμανσης μικροπλακιδίου I σε θερμοκρασία $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον 60 λεπτά πριν από τη χρήση. Για περαιτέρω οδηγίες ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής θέρμανσης μικροπλακιδίου I*.

1. Πάρτε ένα Μικροπλακίδιο Υβριδισμού και επικολλήστε σε αυτό μια ετικέτα.
2. Αφαιρέστε τους βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και τα δείγματα από το υδατόλουτρο μετά την επώασή τους. Εάν χρησιμοποιείτε το Vortexer 2 για Σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων, στροβιλίστε ολόκληρο το στατώ με τα δείγματα STM για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα. Για τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt, στροβιλίστε ολόκληρο το στατώ μετατροπής για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Διαφορετικά, στροβιλίστε κάθε σωλήνα ξεχωριστά για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα.
3. Μεταφέρετε 75 μl από κάθε βαθμονομητή, ποιοτικό έλεγχο ή δείγμα στον **πυθμένα** ενός κενού πηγαδιού μικροπλακιδίου υβριδισμού, ακολουθώντας τη διάταξη που δημιουργήσατε στην ενότητα *Ρύθμιση*. Αποφύγετε την επαφή με τα τοιχώματα των πηγαδιών και περιορίστε το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα. Σε κάθε μεταφορά, χρησιμοποιήστε ένα καθαρό και μεγάλο μεγέθους ρύγχος πιπέττας προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση των βαθμονομητών, των ποιοτικών ελέγχων ή των δειγμάτων. Για τα δείγματα σε μέσο μεταφοράς (STM) δεν είναι απαραίτητο να αφαιρέσετε το δειγματολήπτη από το σωλήνα μεταφοράς δείγματος. Δείγματα τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να σφραγιστούν με βιδωτά πώματα για σωλήνες δειγματοληψίας και να φυλαχτούν μαζί με τις συσκευές δειγματοληψίας στους σωλήνες. Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt τα οποία έχουν υποστεί αποδιάταξη μπορούν να καλυφθούν με τα αρχικά τους πώματα.

Σημειώσεις:

- **Είναι πιθανό να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα εάν τα κλάσματα των δειγμάτων δεν μεταφερθούν προσεκτικά. Κατά τη μεταφορά των δειγμάτων, φροντίζετε να μην ακουμπά το ρύγχος της πιπέττας στο εσωτερικό του σωλήνα όταν αφαιρείτε το κλάσμα των 75 μl.**
4. Μετά τη μεταφορά του τελευταίου δείγματος, καλύψτε το πλακίδιο με καπάκι και **Επώαστε του μικροπλακιδίου υβριδισμού για 10 λεπτά σε θερμοκρασία $20-25^{\circ}\text{C}$.**
 5. Λάβετε κλάσματα από το παρασκευασμένο και καλά στροβιλισμένο μείγμα ανιχνευτή σε ένα αναλώσιμο δοχείο φύλαξης αντιδραστηρίων. Μεταφέρετε προσεκτικά 25 μl του μείγματος ανιχνευτών σε κάθε πηγαδάκι το οποίο περιέχει βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα, χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα και καθαρά ρύγχη για κάθε σειρά. Διανείμετε τον όγκο του μείγματος ανιχνευτή σε κάθε πηγαδάκι υβριδισμού, αποφεύγοντας τον ανάδρομο παφλασμό. Αποφύγετε την επαφή με τα τοιχώματα του πηγαδιού.
- Σημείωση:** Για το παραπάνω βήμα χρησιμοποιήστε μια 8-κάναλη πιπέττα με ρύγχη των 25-200 μl και δυνατότητα μεταφοράς με πιπέττα 25-75 μl. Για μικρό αριθμό πηγαδιών χρησιμοποιήστε μια μονοκάναλη πιπέττα (με ρύγχη των 25-200 μl) αντί μιας 8-κάναλης.

6. Καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού με ένα κάλυμμα μικροπλακιδίου. Ανακινήστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού στον Περιστροφικό Ανακινήτηρα I, ο οποίος έχει ρυθμιστεί στα 1100 ± 100 rpm για 3 ± 2 λεπτά. *Οι Βαθμονομητές, οι Ποιοτικοί έλεγχοι και τα δείγματα πρέπει να αποκτούν κίτρινο χρώμα μετά την ανάδευση.* Πηγαδάκια τα οποία διατηρούν το μοβ χρώμα πιθανόν να μην έχουν δεχτεί την κατάλληλη ποσότητα μείγματος ανιχνευτή. Προσθέστε επιπλέον 25 μl μείγματος ανιχνευτών στα δείγματα τα οποία παραμένουν μοβ και ανακινήστε ξανά. Εάν τα πηγαδάκια παραμείνουν μοβ μετά τη διαδικασία αυτή, επανεξετάστε τα δείγματα.
7. Επώαστε για 60 ± 5 λεπτά στην προθερμασμένη και σταθεροποιημένη σε θερμοκρασία $65 \pm 2^\circ\text{C}$ Συσκευή Θέρμανσης Μικροπλακιδίου I.

Σημειώσεις:

- Κατά την τοποθέτηση του μικροπλακιδίου υβριδισμού στη Συσκευή Θέρμανσης Μικροπλακιδίου I, φροντίστε ώστε να μη δημιουργηθεί παφλασμός.
- Μετά την ανακίνησή τους, τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt πρέπει να αποκτήσουν ροζ και όχι κίτρινο χρώμα.

ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ

1. Αφαιρέστε όλα τα περιττά πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμησης από το πλαίσιο πλακιδίου. Επανατοποθετήστε τα αχρησιμοποίητα μικροπηγαδάκια στην αρχική συσκευασία και ξανασφραγίστε τη. Με ένα μαρκαδόρο αριθμήστε κάθε στήλη 1, 2, 3. . . και βάλτε την κατάλληλη ετικέτα στο μικροπλακίδιο. Τα δείγματα προστίθενται στα πηγαδάκια σύμφωνα με το παράδειγμα διάταξης που παρουσιάστηκε στην ενότητα *Διαμόρφωση*.
2. Αφαιρέστε προσεκτικά το μικροπλακίδιο υβριδισμού που περιέχει βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα από τη Συσκευή Θέρμανσης Μικροπλακιδίου I. Αφαιρέστε αμέσως το καπάκι του πλακιδίου και τοποθετήστε το επάνω σε καθαρή επιφάνεια.
3. Μεταφέρετε ολόκληρο το περιεχόμενο (περίπου 100 μl) των βαθμονομητών, ποιοτικών ελέγχων και δειγμάτων από τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου υβριδισμού στο κάτω μέρος του αντίστοιχου μικροπηγαδιού δέσμησης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα. Για κάθε μεταφερόμενη στήλη χρησιμοποιήστε νέα ρύγχη στην 8-κάναλη πιπέττα και περιμένετε έως ότου κάθε ρύγχος να στραγγίξει τελείως ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης μεταφορά του δείγματος. Εάν θέλετε, μπορείτε να σταθεροποιήσετε την πιπέττα τοποθετώντας το **κέντρο** του ρύγχους στο επάνω άκρο του μικροπηγαδιού δέσμησης (βλ. Σχήμα 1).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: ΣΩΣΤΗ ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ ΜΕ ΠΙΠΕΤΤΑ



4. Καλύψτε το μικροπλακίδιο με το κάλυμμά του και ανακινήστε με τον Περιστροφικό Ανακινήτηρα I σε ταχύτητα 1100 ± 100 rpm, στους $20-25^\circ\text{C}$, για 60 ± 5 λεπτά.
5. Κατά τη διάρκεια της επώασης, παρασκευάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και εάν ισχύει στην περίπτωση, ελέγξτε τα δοχεία συλλογής υγρών έκπλυσης και συλλογής αποβλήτων του συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων. Ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίου*.

6. Όταν ολοκληρωθεί η δέσμευση, αφαιρέστε το μικροπλακίδιο δέσμευσης από τον Περιστροφικό Ανακινητήρα I και αφαιρέστε προσεκτικά το κάλυμμα του πλακιδίου. Αφαιρέστε το υγρό από τα πηγαδάκια αδειάζοντάς το σε ένα νεροχύτη: αναποδογυρίστε τελείως το πλακίδιο επάνω από το νεροχύτη και ανακινήστε το δυνατά με κινήσεις προς τα κάτω. Προσέχετε να μη δημιουργηθεί ανάδρομος παφλασμός, που θα μπορούσε να προκληθεί εάν κάνετε αυτή την εργασία πολύ κοντά στην κάτω επιφάνεια του νεροχύτη. Μην επαναφέρετε το πλακίδιο στην αρχική του θέση. Στυπώστε χτυπώντας σταθερά 2-3 φορές επάνω σε καθαρά μαντηλάκια Kimtowels® ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα υγρά έχουν αφαιρεθεί από τα πηγαδάκια και ότι το επάνω μέρος του πλακιδίου είναι στεγνό.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΒΡΙΔΙΟΥ

Σημειώσεις:

- Κάνετε προσθήκες κατά πλάτος του μικροπλακιδίου και με κατεύθυνση από αριστερά προς δεξιά χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα.
 - Συνιστάται η εφαρμογή της τεχνικής ανάδρομης αναρρόφησης για καλύτερη συνοχή στη διανομή του αντιδραστήριου. Με την τεχνική αυτή, τα ρύγχη της πιπέττας αρχικά υπερπληρούνται με χρήση του δεύτερου αναστολέα ελέγχου αναρρόφησης/διανομής της πιπέττας (εμβολέας). Δείτε την παρακάτω διαδικασία. Καθαρίστε τα ρύγχη στο δοχείο φύλαξης αντιδραστηρίων ή με ένα καθαρό χαρτομάντηλο με ελάχιστο χνούδι ώστε να αφαιρέσετε την περίσσεια αντιδραστήριου πριν τη διανομή του στο πλακίδιο.
 - Εάν θέλετε, μπορείτε να σταθεροποιήσετε την πιπέττα τοποθετώντας το κέντρο των ρυγχών της πιπέττας στο επάνω άκρο των μικροπηγαδίων. Προσέχετε ώστε να μην αγγίξετε τα τοιχώματα των μικροπηγαδίων καθώς είναι πιθανό να προκληθεί επιμόλυνση των δειγμάτων. Ανατρέξτε στο Διάγραμμα 1 παραπάνω.
1. Δημιουργήστε κλάσμα με τον κατάλληλο όγκο Αντιδραστήριου ανίχνευσης 1 σε ένα δοχείο φύλαξης αντιδραστηρίων (για οδηγίες ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστήριου*). Μεταφέρετε με πιπέττα προσεκτικά 75 μl Αντιδραστήριου ανίχνευσης 1 σε κάθε πηγαδάκι του Μικροπλακιδίου δέσμευσης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα και την τεχνική ανάδρομης μεταφοράς με πιπέττα που περιγράφεται παρακάτω.

Τεχνική ανάδρομης μεταφοράς με πιπέττα:

- α) Τοποθετήστε ρύγχη σε μια 8-κάναλη πιπέττα. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα ρύγχη εφαρμόζουν σωστά.
- β) Πιέστε το έμβολο της πιπέττας πραγματοποιείπερνώντας την πρώτη θέση στοπ και καταλήγοντας στη δεύτερη.
- γ) Βυθίστε τα ρύγχη στο διάλυμα του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 1.
- δ) Απελευθερώστε αργά το έμβολο και περιμένετε έως ότου γεμίσουν τα ρύγχη με το διάλυμα.
- ε) Διαμοιράστε το διάλυμα στα μικροπηγαδάκια (75 μl) πιέζοντας το έμβολο έως την πρώτη θέση στοπ. Μην απελευθερώνετε το έμβολο έως ότου τα ρύγχη της πιπέττας ξαναβυθιστούν στο διάλυμα Αντιδραστήριου ανίχνευσης 1.
- στ) Ξαναγεμίστε τα ρύγχη και επαναλάβετε τη διαδικασία έως ότου γεμίσουν όλα τα πηγαδάκια. Γεμίστε τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου από τα αριστερά προς τα δεξιά. *Βεβαιωθείτε ότι όλα τα πηγαδάκια έχουν γεμίσει με ακρίβεια παρατηρώντας την ένταση του ροζ χρώματος. Σε όλα τα πηγαδάκια πρέπει να παρατηρείται παρόμοια ένταση χρώματος.*

2. Καλύψτε το πλακίδιο με το κάλυμμά του και επώαστε στους 20-25°C για 30-45 λεπτά.

ΕΚΠΛΥΣΗ

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

ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΈΚΠΛΥΣΗΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΩΝ

Σημείωση: Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων του Συστήματος Δέσμευσης Υβριδίου Να βεβαιώνετε πάντα ότι το δοχείο συλλογής υγρών έκπλυσης είναι γεμάτο και το δοχείο συλλογής αποβλήτων είναι άδειο. Το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων πραγματοποιεί μηχανική έκπλυση για τον καθαρισμό του συστήματος. Για περισσότερες οδηγίες ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο Χρήσης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων*.

ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΧΡΗΣΗ:

- Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο έκπλυσης είναι γεμάτο τουλάχιστον μέχρι την ένδειξη 1 L με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Εάν δεν είναι, παρασκευάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστήριου.
- Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο συλλογής υγρών έκπλυσης είναι γεμάτο με απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- Βεβαιωθείτε ότι το δοχείο συλλογής αποβλήτων είναι άδειο και ότι το πώμα είναι καλά κλεισμένο.
- Το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων γεμίζει αυτόματα πριν από κάθε έκπλυση και καθαρίζεται μετά από κάθε έκπλυση¹.

1. Αφαιρέστε το καπάκι του μικροπλακιδίου και τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στην πλατφόρμα του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων.
2. Βεβαιωθείτε ότι το σύστημα έχει τεθεί σε λειτουργία και ότι στην οθόνη υπάρχει η ένδειξη "Digene Wash Ready." ή "P1".

Σημείωση: Εάν χρησιμοποιείται μόνο έναν τμήμα του στριπ των πηγαδιών δέσμευσης, πρέπει να τοποθετηθούν κενά πηγαδάκια μικροπλακιδίων στο πλακίδιο δέσμευσης ώστε να συμπληρωθεί η στήλη πριν την έκπλυση. Βλ. *Βοηθητικός εξοπλισμός* για πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες.

3. Επιλέξτε τον αριθμό των στριπ προς έκπλυση πατώντας το πλήκτρο "Rows" και κατόπιν "+" ή "-" για να προσαρμόσετε τον αριθμό. Πατήστε το πλήκτρο "Rows" για να επαναφέρετε την ένδειξη "Digene Wash Ready." ή "P1".
4. Πατήστε "Start/Stop" για να ξεκινήσει η λειτουργία.
5. Το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων πραγματοποιεί έξι κύκλους πλήρωσης και μεταφοράς με πιπέττα σε διάστημα περίπου 10 λεπτών. Κατά τη διάρκεια του προγράμματος θα υπάρξει μια σύντομη παύση κατά την οποία δεν πρέπει να αφαιρέσετε το πλακίδιο. Μόλις το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων ολοκληρώσει την έκπλυση, στην οθόνη θα εμφανιστεί η ένδειξη "Digene Wash Ready." ή "P1".
6. Αφαιρέστε το μικροπλακίδιο από τη συσκευή μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος. Το πλακίδιο πρέπει να εμφανιστεί λευκό χωρίς να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα μικροπηγαδάκια.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΧΕΡΙ

Σημείωση: Η ανεπαρκής έκπλυση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δημιουργία υπολειμμάτων και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (εξαιτίας υπολειμμάτων αλκαλικής φωσφατάσης). Για να διασφαλίσετε την αποτελεσματική έκπλυση χρησιμοποιώντας τη συσκευή έκπλυσης, η συσκευή έκπλυσης πρέπει να τοποθετηθεί τουλάχιστον στα 61 cm και όχι περισσότερο από 91 cm πάνω από την περιοχή έκπλυσης ώστε το πλακίδιο να βρίσκεται μεταξύ 61 και 91 cm κάτω από τη συσκευή έκπλυσης κατά τη διαδικασία έκπλυσης. Η κάνουλα της συσκευής έκπλυσης πρέπει να βρίσκεται σε θέση πλήρους ανοίγματος όταν χρησιμοποιείται και σε θέση κλεισίματος όταν δεν χρησιμοποιείται. Κατά τη διάρκεια της χρήσης, η συσκευή έκπλυσης πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 1,0 L ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ώστε να εξασφαλίζεται η επαρκής πίεση.

1. Αφαιρέστε το Αντιδραστήριο Ανίχνευσης 1 από τα πηγαδάκια τοποθετώντας καθαρά μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι επάνω στο πλακίδιο αναστρέφοντάς το προσεκτικά. Πριν την αναστροφή, βεβαιωθείτε ότι το χαρτί εφάπτεται σε όλη την επιφάνεια του πλακιδίου. Αφήστε το πλακίδιο να στραγγίξει για 1-2 λεπτά. Στυπώστε καλά σε καθαρά μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή σε αντίστοιχα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι. Απορρίψτε προσεκτικά τα χρησιμοποιημένα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι προκειμένου να αποφύγετε τη μόλυνση με αλκαλική φωσφατάση σε μετέπειτα στάδια.
2. Πλύνετε το πλακίδιο 6 φορές με το χέρι χρησιμοποιώντας τη Συσκευή Έκπλυσης. Κάθε πηγαδάκι πρέπει να ξεπλένεται ώστε να προκαλείται υπερχειλίση και να διασφαλίζεται η έκπλυση μέχρι τα χείλη

των πηγαδιών. Η διαδικασία έκπλυσης ξεκινά με το πηγαδάκι A1 και συνεχίζεται με ελικοειδή κατεύθυνση προς τα δεξιά και προς τα κάτω. Αφού έχουν γεμίσει όλα τα πηγαδάκια, αδειάστε το υγρό στο νιπτήρα με δυνατή κίνηση προς τα κάτω. Η δεύτερη έκπλυση ξεκινά από το πηγαδάκι H12 και συνεχίζεται με ελικοειδή κατεύθυνση προς τα αριστερά και προς τα επάνω. Η ακολουθία των 2 πλύσεων επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές ώστε να καταλήξετε στις 6 συνολικά πλύσεις ανά πηγαδάκι.

3. Μετά την έκπλυση στυπώστε το πλακίδιο αναστρέφοντάς το σε καθαρά μαντηλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή σε αντίστοιχα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι και χτυπώντας το σταθερά 3-4 φορές. Αντικαταστήστε τα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι και σκουπίστε ξανά. Αφήστε το πλακίδιο να στραγγίξει σε ανάστροφη θέση για 5 λεπτά. Στυπώστε το πλακίδιο άλλη μία φορά.
4. Το πλακίδιο πρέπει να εμφανίζεται λευκό και να μην υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα μικροπηγαδάκια.

ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Σημειώσεις:

- Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό ζευγάρι γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας για το χειρισμό του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2.
 - Δημιουργήστε κλάσμα στο δοχείο φύλαξης αντιδραστηρίων **μόνο** με την ποσότητα αντιδραστηρίου που απαιτείται για την εκτέλεση της δοκιμασίας ώστε να αποφευχθεί πιθανή μόλυνση του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2. Ανατρέξτε στην ενότητα *Προετοιμασία και αποθήκευση αντιδραστηρίων*. **ΜΗΝ επανατοποθετείτε το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 στην αρχική φιάλη. Απορρίψτε το αχρησιμοποίητο υλικό μετά τη χρήση.**
 - Η προσθήκη του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 πρέπει να γίνεται χωρίς διακοπή. Ο χρόνος επώασης όλων των πηγαδιών πρέπει να συμπίπτει όσο το δυνατόν περισσότερο.
 - Φροντίστε να μην αγγίξετε τα τοιχώματα του μικροπηγαδιού και να μην προκαλέσετε ανάδρομο παφλασμό του αντιδραστηρίου στα ρύγχη, καθώς αυτό μπορεί να προκαλέσει αλληλομόλυνση των δειγμάτων (Βλ. Διάγραμμα 1).
1. Μεταφέρετε με πιπέττα προσεκτικά 75 μl Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 σε κάθε πηγαδάκι του Μικροπλακιδίου Δέσμευσης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα και την τεχνική ανάδρομης μεταφοράς με πιπέττα που περιγράφεται παραπάνω. *Όλα τα πηγαδάκια πρέπει να αποκτήσουν ένα κίτρινο χρώμα.* Βεβαιωθείτε ότι όλα τα πηγαδάκια έχουν γεμίσει με ακρίβεια παρατηρώντας την ένταση του χρώματος. Σε όλα τα πηγαδάκια πρέπει να παρατηρείται παρόμοια ένταση χρώματος.
 2. Καλύψτε το μικροπλακίδιο με ένα κάλυμμα ή με καθαρό Parafilm (ή ανάλογο υλικό) και Επώαστε στους 20-25°C για 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως.
 3. Διαβάστε τις ενδείξεις του μικροπλακιδίου στο εγκεκριμένο από την QIAGEN λουμινόμετρο μετά την πάροδο των 15 λεπτών της επώασης (και όχι αργότερα από 30 λεπτά έπειτα από την επώαση).
 4. Το λογισμικό ανάλυσης προσδιορισμού *digene* επιτρέπει την καταχώριση σχετικών με τη δοκιμασία πληροφοριών απευθείας στο λογισμικό.
 5. Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο γεμάτο μικροπλακίδιο, αφαιρέστε τα χρησιμοποιημένα μικροπηγαδάκια από τη βάση μικροπλακιδίων, ξεπλύνετε καλά τη βάση με απιονισμένο νερό, στεγνώστε την και φυλάξτε την για επόμενη δοκιμασία.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Η επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας πραγματοποιείται με σκοπό να διασφαλίζεται ότι τα αντιδραστήρια και τα προσφερόμενα υλικά βαθμονομητών και ποιοτικών ελέγχων λειτουργούν σωστά, επιτρέποντας τον ακριβή προσδιορισμό της τιμής cutoff της δοκιμασίας. Τα κριτήρια επαλήθευσης υπολογίζονται αυτόματα και επαληθεύονται ως έγκυρα ή μη έγκυρα από το λογισμικό ανάλυσης προσδιορισμού *digene*). Η δοκιμασία hc2 GC-ID DNA απαιτεί βαθμονόμηση σε κάθε εκτέλεση. Συνεπώς είναι αναγκαίο να επαληθεύεται κάθε δοκιμασία χρησιμοποιώντας τα παρακάτω κριτήρια. Αυτή η διαδικασία επαλήθευσης δεν υποκαθιστά τον εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο.

1. Αρνητικός βαθμονομητής

Ο αρνητικός βαθμονομητής πρέπει να ελέγχεται εις τριπλούν σε κάθε δοκιμασία. Η μέση τιμή RLU του αρνητικού βαθμονομητή πρέπει να είναι μεταξύ ≥ 10 και ≤ 150 RLU για να προχωρήσετε. Ο συντελεστής απόκλισης (%CV) των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων του αρνητικού βαθμονομητή πρέπει να είναι $\leq 25\%$. Εάν η τιμή %CV είναι $>25\%$, το λογισμικό θα απορρίψει το επαναλαμβανόμενο αποτέλεσμα με την τιμή RLU που είναι πιο απομακρυσμένη από τη μέση τιμή, ως μη αξιόπιστο για τον υπολογισμό της μέσης τιμής και θα υπολογίσει εκ νέου τη μέση τιμή και την τιμή %CV χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα δύο επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα. Η τιμή %CV που υπολογίζεται εκ νέου πρέπει να είναι $\leq 25\%$. Διαφορετικά, **η επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας δεν είναι έγκυρη και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί για όλα τα δείγματα ασθενών. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δειγμάτων των ασθενών δεν πρέπει να ανακοινωθούν.**

2. Θετικός βαθμονομητής

Ο θετικός βαθμονομητής πρέπει να εξετάζεται εις τριπλούν σε κάθε δοκιμασία. Οι επαναλαμβανόμενες τιμές %CV για το θετικό βαθμονομητή πρέπει να είναι $\leq 20\%$. Εάν η τιμή %CV είναι $> 20\%$, το λογισμικό απορρίπτει το επαναλαμβανόμενο αποτέλεσμα με την τιμή RLU που είναι πιο απομακρυσμένη από τη μέση τιμή, ως μη αξιόπιστο για τον υπολογισμό της μέσης τιμής και υπολογίζει εκ νέου τη μέση τιμή και την τιμή %CV χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα δύο επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα. Η τιμή %CV που υπολογίζεται εκ νέου πρέπει να είναι $\leq 20\%$. Διαφορετικά, **η επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας δεν είναι έγκυρη και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί για όλα τα δείγματα ασθενών. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δειγμάτων των ασθενών δεν πρέπει να ανακοινωθούν.**

3. Λόγος μέσης τιμής θετικού βαθμονομητή (PC)/αρνητικού μάρτυρα (NC)

Ο μέσος όρος των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων του θετικού βαθμονομητή (μέσος όρος PC) και ο μέσος όρος του αρνητικού βαθμονομητή (μέσος όρος NC) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του λόγου μέσος όρος PC/μέσος όρος NC. Το λογισμικό θα υπολογίσει το λόγο μέσης τιμής PC/μέση τιμή NC. Πρέπει να επιβεβαιώνεται ότι ο λόγος αυτός ανταποκρίνεται στα κριτήρια επαλήθευσης βαθμονόμησης της δοκιμασίας **πριν από την ανακοίνωση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων.** Εάν ο λόγος είναι εντός των ορίων $\geq 2,0$ και ≤ 20 , το λογισμικό προχωρεί στον υπολογισμό της τιμής cutoff. Εάν ο λόγος είναι $< 2,0$ ή > 20 , **η επαλήθευση βαθμονόμησης της δοκιμασίας δεν είναι έγκυρη και η δοκιμασία πρέπει να επαναληφθεί για όλα τα δείγματα ασθενών. Συνεπώς, τα αποτελέσματα των δειγμάτων των ασθενών δεν πρέπει να ανακοινωθούν.**

Σημείωση: Προκειμένου να προσδιορισθεί η επαναληψιμότητα των βαθμονομητών για τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA, συλλέχθηκαν αποτελέσματα χρησιμοποιώντας το το λουμινομετρο *digene* Microplate Luminometer 2000 κατά τη διάρκεια εσωτερικών μελετών. Κατά τις μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν 62 δοκιμασίες χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Rapid Capture System και 43 δοκιμασίες χρησιμοποιώντας τη μέθοδο με το χέρι (Πίνακας 3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μέσος όρος του %CV για το θετικό βαθμονομητή για αυτές τις 105 δοκιμασίες ήταν ίσος ή μικρότερος από 6,5% και ο μέσος όρος του %CV για τον αρνητικό βαθμονομητή ήταν ίσος ή μικρότερος από 14,6%. Όπως έδειξε η μέση τιμή RLU 43 της μέσης τιμής των αρνητικών μαρτύρων που ελήφθη χρησιμοποιώντας τη χειροκίνητη μέθοδο, σε σχέση με τη μέση τιμή 54 που ελήφθη χρησιμοποιώντας την εφαρμογή RCS, η εφαρμογή RCS απέδωσε τιμές NC RLU ελαφρώς αυξημένες σε σχέση με αυτές της χειροκίνητης μεθόδου. Έχει διαπιστωθεί ότι η αύξηση αυτή δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας που παράγονται χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε από τις δύο προαιρετικές μεθόδους. Η μέσος όρος κατωφλίου RLU για τον αρνητικό βαθμονομητή ορίστηκε στα 250 RLU με βάση το στατιστικό υπολογισμό $\pm 3SD$ πάνω στο μέσο όρο RLU για τον αρνητικό βαθμονομητή που παρατηρήθηκε στο σύστημα της Δοκιμασίας *digene* HC2 CT/GC DNA κατά τη διάρκεια παρατεταμένης δοκιμασίας κατά την ανάπτυξη της εφαρμογής RCS. Το ανώτατο όριο αυτού του εύρους τιμών $\pm 3SD$ επεκτάθηκε κατά ένα επιπλέον 20% ώστε να διασφαλιστεί ότι το κατώφλι NC RLU θα μπορεί να επιτευχθεί με τις συνηθισμένες κλινικές πρακτικές.

Η μέση τιμή RLU του NC πρέπει να παρατηρείται κατά κανόνα σε ≤ 150 και η τιμή CV σε $\leq 25\%$. Κάθε εργαστήριο πρέπει να παρακολουθεί το ποιοτικό έλεγχο και την απόδοση της βαθμονόμησης σύμφωνα με το έγγραφο C24-2A της National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Η μέση τιμή RLU με τη χρήση της εφαρμογής RCS μπορεί κατά περίπτωση να υπερβαίνει το 150, πιθανόν με

αντίστοιχη μείωση του λόγου PC/NC, που, σύμφωνα με τον Πίνακα 3 διαπιστώθηκε ότι παράγει μέση τιμή κατόπιν βαθμονόμησης της τάξης του 8,29. Στην περίπτωση αυτή, τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά εφόσον το NC RLU παραμένει ≤ 250 και ο λόγος PC/NC είναι $\geq 2,0$. Αν το NC RLU υπερβεί την τιμή 250 ή το PC/NC μειωθεί κάτω από 2,0 η αυξηθεί πάνω από το 20, η δοκιμασία είναι άκυρη.

Πίνακας 3. Στατιστική σύνοψη τιμών αρνητικού βαθμονομητή και θετικού βαθμονομητή για την εφαρμογή RCS και για δοκιμασίες που χρησιμοποιούν τη μέθοδο με το χέρι.

Μέθοδος	Αριθμός πλακιδίων	Υπολογιζόμενες τιμές μέσου όρου PC/NC				Ποιοτικοί έλεγχοι του κιτ Δοκιμασίας (Μέση τιμή RLU/CO)	
		Μέση Τιμή	Ενδιάμεση	Ελάχιστη	Μέγιστη	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0.22	4.73
Με το χέρι	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0.23	4.07

Μέθοδος	Βαθμονομητής	Υπολογιζόμενες τιμές μέσου όρου RLU				Τρεις επαναλήψεις υπολογιζόμενου %CV
		Μέση Τιμή	Ενδιάμεση	Ελάχιστη	Μέγιστη	
RCS	Αρνητικό	54	46	24	127	14,4
	Θετικά	399	405	179	606	6,5
Με το χέρι	Αρνητικό	43	36	16	120	14,6
	Θετικά	295	309	167	415	4,7

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΙΜΗΣ CUTOFF

Εφόσον μια δοκιμασία έχει επαληθευτεί σύμφωνα με τα προαναφερθέντα κριτήρια, τα έγκυρα αποτελέσματα του θετικού βαθμονομητή χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των τιμών cutoff RLU για τον εντοπισμό θετικών δειγμάτων. Οι τιμές Cutoff RLU υπολογίζονται ως εξής:

Τιμή cutoff RLU = μέση τιμή θετικού βαθμονομητή RLU

Παράδειγμα υπολογισμού Cutoff:

	Τιμές NC RLU	Τιμές RLU θετικού βαθμονομητή (PC)
	97	312
	101	335
	91	307
Μέση τιμή	96	318
%CV	4.9	4,7
Μέση τιμή PC/μέση τιμή NC	N/A	3,31

Συνεπώς, η τιμή cutoff RLU είναι (η μέση τιμή του θετικού βαθμονομητή) = 318

Όλες οι τιμές RLU των δειγμάτων θα μετατραπούν σε λόγο προς την κατάλληλη τιμή cutoff (CO) RLU από το λογισμικό ανάλυσης προσδιορισμού *digene*. Για παράδειγμα, όλες οι δοκιμασίες πρέπει να εκφράζονται ως λόγος RLU δείγματος/τιμής CO.

Σημείωση: οι τιμές RLU/CO και τα θετικά/αρνητικά αποτελέσματα για όλα τα δείγματα που έχουν υποβληθεί στη δοκιμασία παρατίθενται στην αναφορά ανάλυσης δεδομένων του λογισμικού ανάλυσης προσδιορισμού *digene*.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA παρέχονται δείγματα ποιοτικού ελέγχου. Συμβουλευθείτε το σχετικό εγχειρίδιο χρήσης λογισμικού ανάλυσης του προσδιορισμού *digene* για οδηγίες σχετικά με την εισαγωγή των αριθμών παρτίδας και των ημερομηνιών λήξης των ποιοτικών ελέγχων. Αυτοί οι έλεγχοι πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε δοκιμασία και η τιμή RLU/CO κάθε ποιοτικού ελέγχου πρέπει να βρίσκεται εντός των παρακάτω επιτρεπτών ορίων ώστε η δοκιμασία να θεωρηθεί έγκυρη. **Εάν οι Ποιοτικοί έλεγχοι δεν εμπίπτουν στα όρια αυτά, η δοκιμασία δεν είναι έγκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.** Συνεπώς δεν πρέπει να ανακοινώνονται αποτελέσματα ασθενών τα οποία προκύπτουν από μη έγκυρες δοκιμασίες.

	QC CT	QC GC
Ελάχιστη τιμή RLU/CO	0	1,0
Μέγιστη τιμή RLU/CO	0,9999	20,00
Μέγιστη τιμή %CV	20,00	20,00

1. Οι Ποιοτικοί έλεγχοι που παρέχονται στο kit είναι κλωνοποιημένοι στόχοι CT και GC DNA, οι οποίοι αποτελούνται από την ίδια δομή πλασμιδίου για κάθε μεμονωμένο οργανισμό (ένας για CT και ένας για GC), όπως συμβαίνει και με το θετικό βαθμονομητή που παρέχεται με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA.
2. Αυτό το υλικό ποιοτικού ελέγχου δεν είναι το ίδιο με αυτό των οργανισμών GC στο μοντέλο δειγμάτων και δεν θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το μέσο μεταφοράς δειγμάτων *digene* ή το διάλυμα PreservCyt.
3. Ο θετικός βαθμονομητής χρησιμοποιείται για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων με τον ορισμό της τιμής cutoff RLU. Οι ποιοτικοί έλεγχοι που παρέχονται με αυτό το kit πρέπει να χρησιμοποιούνται για εσωτερικούς ποιοτικούς ελέγχους. Πρόσθετοι ποιοτικοί έλεγχοι μπορούν να δοκιμάζονται σύμφωνα με οδηγίες ή απαιτήσεις τοπικών, κρατικών ή/και εθνικών κανονισμών ή οργανισμών πιστοποίησης.
4. Για τη δοκιμασία της αποτελεσματικότητας της κυτταρικής λύσης και αποδιάταξης του δείγματος, τα εργαστήρια πρέπει περιοδικώς να δημιουργούν μάρτυρες δημιουργίας δειγμάτων προθέτοντας ≥ 5000 CFU/ml *Neisseria gonorrhoeae* (αυξότυπος 1, 5 ή στέλεχος τύπου ATCC) σε ένα καινούργιο σωλήνα STM. Επωάστε το δείγμα για τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τον έλεγχο με τον ίδιο τρόπο όπως για ένα συνηθισμένο κλινικό δείγμα. Εάν το δείγμα έχει δεχθεί σωστή επεξεργασία, πρέπει να λάβετε την τιμή $\geq 2,50$ για το λόγο RLU/CO. Εναλλακτικά, για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ομάδες δειγμάτων δοκιμών που περιέχουν οργανισμούς GC και διατίθενται στο εμπόριο.
5. Τα αποδεκτά όρια των Βαθμονομητών και των Ποιοτικών ελέγχων έχουν καθιερωθεί μόνο για τα εγκεκριμένα από την QIAGEN λουμιμόμετρα. Ο Αρνητικός βαθμονομητής και οι ποιοτικοί έλεγχοι παρακολουθούν για ουσιαστική αστοχία αντιδραστήριου και δεν εξασφαλίζουν την ακρίβεια της δοκιμασίας.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σύμφωνα με τα κριτήρια της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA:

1. Δείγματα με λόγους RLU/CO $\geq 2,50$ θεωρούνται ως “Θετικά για *Neisseria gonorrhoeae* DNA.” Η βιωσιμότητα των οργανισμών ή/και η μολυσματικότητα δεν είναι δυνατό να συναχθούν, καθώς το DNA-στόχος μπορεί να είναι ανθεκτικό στην απουσία βιώσιμων οργανισμών.
2. Δείγματα με λόγο RLU/CO $< 1,00$ δεν περιέχουν *Neisseria gonorrhoeae* DNA ή περιέχουν DNA σε επίπεδα κάτω από το όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας. Αυτά τα δείγματα ερμηνεύονται ως “Αρνητικά ως προς *Neisseria gonorrhoeae* DNA”. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την ύπαρξη λοίμωξης *Neisseria gonorrhoeae* καθώς τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τη συλλογή κατάλληλων δειγμάτων και την ύπαρξη επαρκούς DNA για την ανίχνευση.
3. Δείγματα με αναλογίες τιμής RLU/CO $\geq 1,00$ και $< 2,50$ θεωρούνται αμφιλεγόμενα. Τα αποτελέσματα μπορούν να θεωρηθούν κατά τεκμήριο θετικά για DNA *Neisseria gonorrhoeae*. Ωστόσο, συνιστάται η επανάληψη της δοκιμασίας σε ένα νέο δείγμα του ασθενούς ή πρόσθετη δοκιμασία με εναλλακτική διαδικασία δοκιμασίας, λόγω της μειωμένης διαγνωστικής αξίας ενός θετικού αποτελέσματος με αυτές τις τιμές Cutoff/RLU.*
4. Συνιστάται τα θετικά αποτελέσματα να επιβεβαιώνονται και με μία άλλη μέθοδο, εάν η πιθανότητα λοίμωξης με *Neisseria gonorrhoeae* είναι αβέβαιη ή αμφισβητήσιμη, με βάση κλινικά ή άλλα εργαστηριακά ευρήματα. Αναλυτικές μελέτες για αυτές τις δοκιμασίες έδειξαν περιορισμένη διασταυρούμενη δραστηριότητα σε κάποιες άλλες αλληλουχίες DNA, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Βλ. Ειδικότητα ανάλυσης για πρόσθετες πληροφορίες.

* Κατά την κλινική αξιολόγηση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA, τα 3 από τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα αποδείχθηκαν θετικά στη δοκιμασία της καλλιέργειας GC. Τα υπόλοιπα 14 ήταν φαινομενικά ψευδώς θετικά. Σε μεταγενέστερη αξιολόγηση, παρατηρήθηκαν 5 δείγματα με αρχική τιμή RLU/CO μεταξύ 1,00 και 2,50, τρία από τα οποία βρέθηκαν θετικά στην καλλιέργεια GC. Η επανάληψη της διπλής δοκιμασίας σε αυτά τα δείγματα με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA απέδωσε αποτελέσματα $>1,00$ RLU/CO. Τα υπόλοιπα 2 δείγματα βρέθηκαν αρνητικά στην καλλιέργεια και επίσης αρνητικά με διπλή επανάληψη της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Ανατρέξτε στο *Εγχειρίδιο χρήσης Rapid Capture System* για επιπλέον περιορισμούς της διαδικασίας σχετικά με τη χρήση αυτού του συστήματος για έλεγχο με υψηλό ρυθμό επεξεργασίας δειγμάτων.

- Μόνο για διαγνωστική χρήση *In Vitro*.
- Οι διαδικασίες της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA, του ποιοτικού ελέγχου και της ερμηνείας των αποτελεσμάτων των δειγμάτων πρέπει να τηρούνται πιστά προκειμένου να επιτυγχάνονται αξιόπιστα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες.

- Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο με τραχηλικά δείγματα που έχουν συλλεχθεί με τη χρήση του *digene* HC2 DNA Collection Device και έχουν τοποθετηθεί σε STM, με δείγματα που έχουν συλλεχθεί με το *digene* Female Swab Specimen Collection Kit και τοποθετηθεί σε STM, ή με δείγματα που έχουν συλλεχθεί με δειγματολήπτη τύπου σαρώθρου και έχουν τοποθετηθεί σε διάλυμα Hologic PreservCyt.
- Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας πρέπει να ερμηνεύονται μόνο σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την κλινική αξιολόγηση του ασθενούς και με άλλες διαδικασίες.
- Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA παρέχει ποιοτικά αποτελέσματα. Η αριθμητική τιμή (λόγος) πάνω από την τιμή cutoff που έχει προσδιοριστεί για το δείγμα του ασθενούς δεν έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζεται με την ποσότητα του GC DNA που περιέχεται στο δείγμα του ασθενούς.
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την πιθανότητα λοίμωξης *Neisseria gonorrhoeae* καθώς η ανίχνευση εξαρτάται από τον αριθμό των οργανισμών που περιέχονται στο δείγμα και μπορεί να επηρεαστεί από τις μεθόδους δειγματοληψίας, από παράγοντες σχετικούς με τους ασθενείς, από το στάδιο της λοίμωξης ή/και από τα λοιμογόνα στελέχη *Neisseria gonorrhoeae*.
- Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA δεν προορίζεται για τον προσδιορισμό της επιτυχούς θεραπευτικής μεθόδου.
- Η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA έχει πιστοποιηθεί για χρήση μόνο με το Σύστημα Αυτόματης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων I χρησιμοποιώντας τις ρυθμίσεις που ορίζονται στις οδηγίες της δοκιμασίας. Η μελέτη πιστοποίησης πραγματοποιήθηκε εσωτερικά στη QIAGEN και τα δεδομένα υποστήριξης της χρήσης της φυλάσσονται σε αρχείο της QIAGEN . Άλλα συστήματα έκπλυσης ή άλλες ρυθμίσεις πλακιδίων έκπλυσης δεν είναι αποδεκτές για χρήση με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA.
- Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA, είναι απαραίτητο το προσωπικό του εργαστηρίου το οποίο εκτελεί τη δοκιμασία να διαθέτει υψηλό επίπεδο τεχνικής ειδικότητας. Σε κάθε εργαστήριο πρέπει επίσης να παρακολουθείται το επίπεδο ειδικότητας σε σχέση με τη δοκιμασία. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, συνιστάται να ελέγχονται κατά περιόδους επιλεγμένες ομάδες δειγμάτων δοκιμών που διατίθενται στο εμπόριο και περιέχουν οργανισμούς GC ή GC DNA, σύμφωνα με τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου του κάθε εργαστηρίου.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ

Ο επιπολασμός των θετικών δειγμάτων ως προς *Neisseria gonorrhoeae* διαφέρει ανάλογα με τα πληθυσμιακά χαρακτηριστικά, όπως ηλικία, φύλο και άλλους παράγοντες κινδύνου. Ο επιπολασμός των *Neisseria gonorrhoeae* που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της κλινικής μελέτης με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA κυμαίνεται μεταξύ 1,1% και 13,0%. Ο επιπολασμός υπολογίστηκε με δεδομένο ότι τα 17 δείγματα αμφιλεγόμενου αποτελέσματος στην μελέτη ήταν θετικά για GC DNA (Πίνακας 4). Οκτώ από τα 17 αυτά δείγματα επιβεβαιώθηκε ότι ήταν θετικά στην καλλιέργεια GC ή στην εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Πίνακας 4. Επιπολασμός των θετικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA ανά ερευνητικό κέντρο.

Περιοχή Ελέγχου	Αρ. θετικών/Αρ. εξεταζόμενων	Επιπολασμός %
1	60/460	13,0
2	34/302	11,3
3	23/324	7,1
4	10/390	2,6
5	4/349	1,1
Σύνολο	131/1825	7,2

ΘΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Οι υποθετικές θετικές και αρνητικές προγνωστικές τιμές (PPV και NPV) για τα διάφορα ποσοστά επιπολασμού με χρήση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA υπολογίστηκαν με χρήση της συνολικής ευαισθησίας και ειδικότητας για δείγματα που συλλέχθηκαν με το *digene* HC2 DNA Collection Device (τραχηλική βούρτσα) και για τα δείγματα που συλλέχθηκαν με το *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (στυλεός). Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι υποθετικές θετικές και αρνητικές διαγνωστικές τιμές (PPV και NPV) των δειγμάτων που συλλέχθηκαν με την τραχηλική βούρτσα (συνολική ευαισθησία 92,6% και ειδικότητα 98,5%) ενώ στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι υποθετικές θετικές και αρνητικές διαγνωστικές τιμές (PPV και NPV) των δειγμάτων που συλλέχθηκαν με τον στυλεό (συνολική ευαισθησία 93,0% και ειδικότητα 98,8%).

Πίνακας 5. Υποθετικές προγνωστικές τιμές της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA με διάφορα ποσοστά επιπολασμού (Βούρτσα).

Ποσοστό επιπολασμού (%)	Ευαισθησία(%)	Ειδικότητα(%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,60

Πίνακας 6. Υποθετικές προγνωστικές τιμές της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID με διάφορα ποσοστά επιπολασμού (Στυλεός).

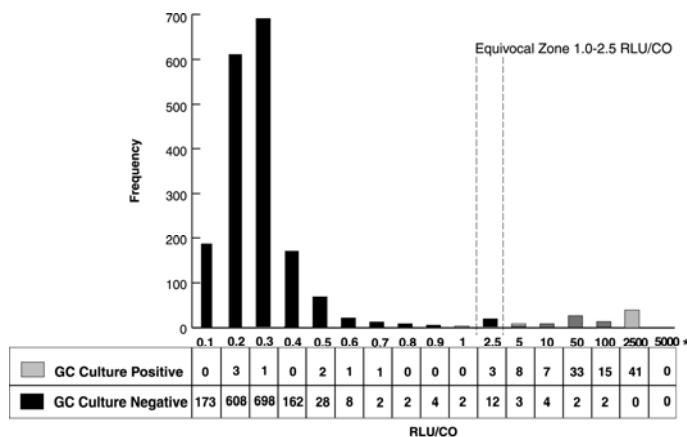
Ποσοστό επιπολασμού (%)	Ευαισθησία(%)	Ειδικότητα(%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΩΝ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RLU/CO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ *digene* HC2 GC-ID DNA

Παρακάτω παρατίθεται η κατανομή των λόγων RLU/CO που προέκυψαν από τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA η οποία πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια μιας πολυκεντρικής κλινικής μελέτης (Εικόνα 1). Τα δεδομένα αυτά περιλαμβάνουν όλα τα δείγματα για τα οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και για τα οποία υπήρχαν διαθέσιμα αποτελέσματα καλλιέργειας GC (n=1826). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια. Τα δείγματα με τιμές RLU/CO < 1,00 θεωρήθηκαν αρνητικά. Τα δείγματα με τιμές RLU/CO ≥ 2,5 θεωρήθηκαν θετικά. Τα δείγματα με τιμές RLU/CO ≥ 1,00 και < 2,50 θεωρήθηκαν αμφιλεγόμενα.

Παρατηρείται σαφής διαχωρισμός των τιμών RLU/CO μεταξύ των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Το ενενήντα εννέα τοις εκατό (99%) των αρνητικών αποτελεσμάτων της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA παρουσιάζουν τιμές RLU/CO μεταξύ 0,0 και 0,5. Πέντε (5/1690) από τα αρνητικά αποτελέσματα σύμφωνα με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA Test έδωσαν τιμή RLU/CO μεταξύ 0,6 και 0,8. Συνολικά, λιγότερο από το 1% (< 0,9%, 17/1825) των αποτελεσμάτων για τα δείγματα έπεσαν στην αμφιλεγόμενη ζώνη της δοκιμασίας, 47% (8/17) εκ των οποίων ήταν θετικά σύμφωνα με την καλλιέργεια GC ή τη μέθοδο PCR. Το ογδόντα εννέα τοις εκατό (93/104) των θετικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA σημείωσαν τιμές RLU/CO μεταξύ RLU/CO 10-2500.

Εικόνα 1. Κατανομή συχνότητων των αποτελεσμάτων RLU/CO που λαμβάνονται με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA.



*Υποδεικνύει την υψηλότερη αναλογία, συμπεριλαμβανομένης της τιμής που αναφέρθηκε.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑ

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA προσδιορίστηκαν με βάση τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας με αποτελέσματα καλλιέργειας *Gonorrhoea*. Συλλέχθηκαν χίλια οκτακόσια εικοσιπέντε (1825) δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν αργότερα, από ασθενείς προερχόμενους από πέντε διαφορετικές κατηγορίες συμπεριλαμβανομένων STD (σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων), οικογενειακού προγραμματισμού και κλινικές OB/GYN (μειωτικής/γυναικολογίας). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος PCR στα δείγματα που ήταν θετικά σύμφωνα με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και αρνητικά σύμφωνα με την καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA ΔΕΝ ξεκαθαρίστηκαν από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας PCR και συνεπώς ο έλεγχος PCR δεν είχε επίπτωση στους υπολογισμούς των χαρακτηριστικών απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA. Τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμασίας για τα δείγματα που συλλέχθηκαν με χρήση του *digene* HC2 DNA Collection Device (τραχηλική βούρτσα) παρατίθενται στον Πίνακα 7 και τα δείγματα που συλλέχθηκαν με το κιτ δειγματοληψίας *digene* Female Swab Specimen (στυλεός Dacron) παρατίθενται στον Πίνακα 8.

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας και την τιμή cutoff 1,0 και την τιμή cutoff 2,5, χωρίς να ληφθούν υπόψη τα κατά τεκμήριο θετικά δείγματα που ανήκουν στην αμφιλεγόμενη περιοχή που περιγράφηκε στην ενότητα Ερμηνεία Αποτελεσμάτων Δοκιμασιών στις παρούσες οδηγίες χρήσης. Ως εκ τούτου, η απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA μπορεί να διαφέρει στο εργαστήριό σας, ανάλογα με την κατανομή των τιμών που εμπίπτουν στην αμφιλεγόμενη περιοχή και τα επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα που θα ληφθούν από την επανάληψη της δοκιμασίας των δειγμάτων που ερμηνεύθηκαν ως κατά τεκμήριο θετικά (αμφιλεγόμενη περιοχή). Ως σημείο αναφοράς, λιγότερο από 0,9% των δειγμάτων (17/1825) που ελέγχθηκαν κατά τη διάρκεια μιας πολυκεντρικής κλινικής μελέτης και που χρησιμοποιήθηκαν για να εξακριβωθεί η απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA έπεσαν σε αυτό το διάστημα. Δείτε την Κατανομή Συχνοτήτων των αποτελεσμάτων RLU/CO στην ενότητα Αναμενόμενα αποτελέσματα στις παρούσες οδηγίες χρήσης για περισσότερες πληροφορίες.

Δεν παράχθηκαν επαρκή δεδομένα προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια εάν η ευαισθησία και η θετική διαγνωστική αξία της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA χρησιμοποιώντας το κιτ δειγματοληψίας *digene* Female Swab Specimen είναι ανάλογη με την ευαισθησία και τη θετική διαγνωστική αξία που παρατηρήθηκε στα δείγματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας το *digene* HC2 DNA Collection Device. Επειδή η χρήση του *digene* HC2 DNA Collection Device δεν ενδείκνυται για συλλογή τραχηλικών δειγμάτων σε εγκύους, η δυνατότητα της δοκιμασίας να ανιχνεύσει την παρουσία GC DNA μπορεί να είναι μειωμένη σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών ή στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε στυλεός για τη συλλογή δείγματος.

Οι εκτιμήσεις απόδοσης για την δοκιμασία στηρίζονται σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2-8°C και εξετάστηκαν εντός 1-2 εβδομάδων από τη δειγματοληψία.

Η κλινική ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA Test για την ανίχνευση σε αυτούς τους ασθενείς κλινικά ενεργής λοίμωξης, η οποία μπορεί να μεταδοθεί στους συντρόφους ή να προκαλέσει αλληλουχίες σχετικές με GC, δεν έχει προσδιοριστεί συγκριτικά με όλες τις μεθόδους Ενίσχυσης Νουκλεϊκών οξέων (NAA) που διατίθενται στο εμπόριο για την ανίχνευση GC DNA. Σε κλινικές μελέτες, ο έλεγχος που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τροποποιημένες δοκιμασίες NAA που διατίθενται στο εμπόριο έδειξε θετικότητα σε ορισμένα δείγματα θετικά χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και αρνητικά ως προς την καλλιέργεια. Η υπολογιζόμενη ευαισθησία βασίζεται στον αριθμό των αποτελεσμάτων που βρέθηκαν θετικά για *Neisseria gonorrhoeae* χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και αρνητικά ως προς την καλλιέργεια. Ως εκ τούτου, η ευαισθησία της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA μπορεί μόνο να συναχθεί σχετικά με την θετικότητα της καλλιέργειας, της οποίας η ευαισθησία μπορεί να είναι 60-85%.

Πίνακας 7. Σύγκριση αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και την καλλιέργεια GC για δείγματα που συλλέχθηκαν με βούρτσα. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης που υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τιμές RLU/CO cutoff 1,0 και 2,5 παρουσιάζονται παρακάτω. Οι τιμές που εμφανίζονται σε παρένθεση αντιπροσωπεύουν την απόδοση θεωρώντας τιμή RLU/CO Cutoff 2,5. Στα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% συμπεριλήφθηκαν και οι δύο τιμές για την περίπτωση όπου τα σημεία υπολογισμού διέφεραν σε κάθε υπολογιζόμενη τιμή cutoff RLU/CO.

		<i>digene</i> HC2 GC-ID: Καλλιέργεια: n=	Θετικό Θετικό	Θετικό ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ Θετικό	ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Ευαισθησία	Ευαισθησία PPV	Ειδικότητα	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Καλλιέργεια- PCR ¹⁺
Συμπτωματικοί	Κέντρο ²										
1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00) 83,1-99,9	84,78 (92,68) 80,1-98,5	97,75 (99,04) 97,2-99,8	99,67 (99,35) 98,2-100	5/7 (2/3)	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	2	188	13	2	169	76,47 50,1-93,2	86,67 59,5-98,3	98,83 95,8-99,9	97,69 94,2-99,4	1/2	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	3	233	14	6 (3)	212 (215)	93,33 68,1-99,8	70,00 (82,35) 56,6-96,2	97,25 (98,62) 96,0-99,7	99,54 97,4-100	0 ³ /6	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	4	163	4	0	159	100,00 39,8-100	100,00 39,8-100	100,00 97,7-100	100,00 97,7-100	N/A	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	Όλες	935	70 (69)	15 (8)	6 (7)	92,11 (90,79) 83,6-97,1	82,35 (89,61) 80,1-95,4	98,25 (99,07) 98,2-99,6	99,29 (99,18) 98,5-99,7	6³/15	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95% Ασυμπτωματικοί	1	101	10 (9)	2	0 (1)	100,00 (90,00) 69,2-100	83,33 (81,82) 51,6-97,9	97,80 92,3-99,7	100,00 (98,89) 95,9-100	2/2	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	2	12	2	0	10	100,00 15,8-100	100,00 15,8-100	100,00 69,2-100	100,00 69,2-100	N/A	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	3	84	1 (0)	0	0 (1)	100,00 (0,00) 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 95,7-100	100,00 (98,81) 95,7-100	N/A	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	4	226	4	2 (0)	219 (221)	80,00 28,4-99,5	66,67 (100,00) 39,8-100	99,10 (100,00) 98,3-100	99,55 97,5-100	1/2 (Δ/Ι)	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	5	1	0	0	0	N/A	N/A	100,00 2,5-100	100,0 2,5-100	N/A	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	Όλες	424	17 (15)	4 (2)	1 (3)	94,44 (83,33) 72,7-99,9	80,95 (88,24) 63,6-98,5	99,01 (99,51) 98,2-99,9	99,75 (99,26) 98,6-100	3/4 (2/2)	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95% ΟΛΑ	1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	98,00 (94,00) 89,4-100	84,48 (90,38) 79,0-96,8	97,76 (98,76) 97,1-99,6	99,75 (99,25) 98,6-100	7/9 (4/5)	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	2	200	15	2	4	78,95 54,4-94,0	88,24 63,6-98,5	98,90 96,1-99,9	97,81 94,5-99,4	1/2	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50) 69,8-99,8	71,43 (82,35) 56,6-96,2	98,01 (99,00) 97,1-99,8	99,66 (99,33) 98,1-100	0 ³ /6
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89 51,8-99,7	80,00 (100,00) 63,1-100	99,47 (100,00) 99,0-100	99,74 98,5-100	1/2 (Δ/Ι)
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	5	1	0	0	0	1	N/A	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	N/A	
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	Όλες	1359	87 (84)	19 (10)	7 (10)	92,55 (89,36) 85,3-97,0	82,08 (89,36) 81,3-94,8	98,50 (99,21) 98,6-99,6	99,44 (99,21) 98,9-99,8	9³/19	

¹ Οι πληροφορίες αυτές παρέχονται μόνο για ενημερωτικούς σκοπούς. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων δεν αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη διαδικασία PCR.

² Στην κέντρο 5 δεν υπήρχαν δείγματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας τη βούρτσα από συμπτωματικούς ασθενείς.

³ Σε δύο περιπτώσεις η διαδικασία PCR δεν εφαρμόστηκε.

ΔΙ = Δεν ισχύει

Πίνακας 8. Σύγκριση αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και την καλλιέργεια GC για δείγματα που συλλέχθηκαν με στυλεό.

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης, τα οποία υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις τιμές cutoff RLU/CO 1,0 και 2,5, παρατίθενται παρακάτω. Οι τιμές εντός παρενθέσεων αντιπροσωπεύουν την απόδοση η οποία υπολογίστηκε με βάση την τιμή Cutoff RLU/CO 2,5. Στα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% συμπεριλήφθηκαν και οι δύο τιμές για την περίπτωση όπου τα σημεία υπολογισμού διέφεραν σε κάθε υπολογιζόμενη τιμή cutoff RLU/CO.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID:										<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Καλλιέργεια- PCR ¹⁺
	Κέντ ρο ²	Καλλιέργεια: n=	Θετικό Θετικό	Θετικό ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ Θετικό	ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Ευαισθησία	Ευαισθησία PPV	Ειδικότητα	NPV	
Συμπτωματικοί											
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18) 81,34-99,32	94,44 (91,18) 81,34-99,32	99,37 (99,06) 97,75-99,92	99,37 (98,44) 97,75-99,92	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86 66,1-99,8	86,67 (100) 75,3-100	97,44 (100) 95,4-100	98,70 (98,73) 93,2-100	0/2
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	3	5	2	0	0	3	100 15,8-100	100 15,8-100	100 29,2-100	100 29,2-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	N/A	0,00 2,5-100	98,15 (99,38) 96,6-100	100 97,7-100	1 ³ /3
Διάστημα εμπιστοσύνης 95% Άσυμπτωματικοί	Όλες	613	49 (46)	7 (4)	3 (6)	554 (557)	94,23 (88,46) 84,05-98,79	87,50 (92,00) 75,93-94,82	98,75 (99,29) 97,45-99,50	99,46 (98,93) 98,43-99,89	1³/5
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	1	61	1	0	1	59	50,00 1,26-98,74	100 2,50-100	100 93,94-100	98,33 91,06-99,96	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	2	10	2	0	0	8	100 15,8-100	100 15,8-100	100 63,1-100	100 63,1-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	3	2	0	0	0	2	N/A	N/A	100 15,8-100	100 15,8-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100 2,5-100	100 2,5-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	5	186	1	0	0	185	100 2,5-100	100 2,5-100	100 98,0-100	100 98,0-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95% ΟΛΑ	Όλες	260	4	0	1	255	80,00 28,36-99,49	100 39,76-100	100 98,56-100	99,61 97,84-99,99	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21) 78,62-98,34	87,50 (91,43) 73,20-95,81	98,67 (99,20) 96,93-99,57	99,20 (98,42) 97,68-99,83	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75 69,8-99,8	88,24 (100) 63,6-100	97,67 (100) 91,9-100	98,82 (98,85) 93,6-100	0/2
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	3	7	2	0	0	5	100 15,8-100	100 15,8-100	100 47,8-100	100 47,8-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100 2,5-100	100 2,5-100	N/A
Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100 2,5-100	25,00 (50,00) 1,3-98,7	99,14 (99,71) 98,4-100	100 98,9-100	1 ³ /3
Διάστημα εμπιστοσύνης 95% ΟΛΑ	Όλες	873	53 (50)	10 (4)	4 (7)	806 (812)	92,98 (87,72) 83,00-98,05	84,13 (92,59) 72,74-92,12	98,77 (99,51) 97,76-99,41	99,51 (92,59) 98,74-99,87	1³/5

¹ Οι πληροφορίες αυτές παρέχονται μόνο για ενημερωτικούς σκοπούς. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων δεν αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη διαδικασία PCR.

² Στην κέντρο 4 δεν υπήρχαν δείγματα που συλλέχθηκαν με χρήση στυλεού από συμπτωματικούς ασθενείς.

³ Σε δύο περιπτώσεις η διαδικασία PCR δεν εφαρμόστηκε.

ΔΙ = Δεν ισχύει

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Ως μέρος της πολυκεντρικής κλινικής δοκιμασίας, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη επαναληψιμότητας με σκοπό να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα μεταξύ των επιμέρους δοκιμασιών, των ημερών και των τοποθεσιών, καθώς και η συνολική επαναληψιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA χρησιμοποιώντας μια ομάδα αποτελούμενη από στόχους *Neisseria gonorrhoeae* DNA καθώς και θετικά κατά *digene* HC2 GC-ID DNA και αρνητικά κατά *digene* HC2 GC-ID DNA κλινικά δείγματα.

Μια ομάδα 10 μελών, καλυμμένων κλινικών και μη κλινικών δειγμάτων που είχαν υποβληθεί σε αποδιάταξη, αποτελούμενη από 8 θετικά δείγματα και 2 αρνητικά δείγματα, ελέγχθηκαν σε έξι επαναληπτικούς κύκλους, με δοκιμασίες δύο φορές την ημέρα για διάστημα τριών ημερών σε κάθε μία από τις 4 τοποθεσίες (σε 3 εξωτερικά κέντρα και στην QIAGEN). Κάθε κέντρο παρήγαγε 36 σημεία δεδομένων για κάθε εξεταζόμενο στόχο. Όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αποδιάταξη και αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη πριν από τη δοκιμασία. Διαπιστώθηκε 100% συμφωνία για τα 1.152 αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα (1152/1152) και 100% συμφωνία για τα 288 αναμενόμενα αρνητικά αποτελέσματα (288/288). Συνολικά διαπιστώθηκε 100% συμφωνία (1440/1440) με διάστημα εμπιστοσύνης 95%, 99,7-100 και $kappa = 1,00$. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική μεταβλητότητα ανάμεσα σε δοκιμασίες, ημέρες ή ερευνητικά κέντρα. Επομένως, τα δεδομένα όλων των δοκιμασιών σε κάθε κέντρο συνδυάστηκαν και παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Επαναληψιμότητα της πολυκεντρικής δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA

Στόχος Αριθμός	Κέντρο 1		Κέντρο 2		Κέντρο 3		Κέντρο 4		Σύνολο Παρατηρού μενα/Αναμε νόμενα αποτελέσμα τα		
	\bar{X} RL U/C O	% συμφ ωνία	\bar{X} RLU /CO	% συμφ ωνία	\bar{X} RLU /CO	% συμφ ωνία	\bar{X} RLU /CO	% συμφ ωνία	\bar{X} RLU /CO	αποτελέσμα τα	% συμφων ία
1	2.5	100	2.1	100	2.7	100	2.6	100	2.5	144/144	100
2	4.8	100	4.2	100	5.0	100	5.2	100	4.8	144/144	100
3	29.4	100	23.3	100	30.1	100	30.4	100	28.3	144/144	100
4	51.5	100	43.0	100	52.1	100	54.1	100	50.2	144/144	100
5	2.5	100	2.0	100	2.5	100	2.5	100	2.4	144/144	100
6	4.7	100	3.5	100	4.9	100	4.8	100	4.5	144/144	100
7	14.0	100	10.6	100	13.9	100	14.1	100	13.2	144/144	100
8	16.7	100	12.7	100	17.4	100	18.2	100	16.3	144/144	100
9	0.2	100	0.2	100	0.2	100	0.2	100	0.2	144/144	100
10	0.2	100	0.2	100	0.2	100	0.2	100	0.2	144/144	100
ΣΥΝΟΛΟ									1440/1440	100	

Μια δεύτερη μελέτη καταλληλότητας/επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας ολόκληρους οργανισμούς *Neisseria gonorrhoeae* (GC) οι οποίοι διοχετεύθηκαν σε ένα πλαστικό κλινικό μοντέλο επιθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε τρεις εξωτερικά κέντρα. Τα δείγματα που εξετάστηκαν περιείχαν αντιπροσωπευτικά αρνητικά δείγματα, καθώς και δείγματα χαμηλής (κοντά στο όριο ανίχνευσης) και μέτριας θετικότητας με 2 ορροποικιλίες GC, ανάμικτες μολύνσεις με *Chlamydia trachomatis* (CT) και δείγματα που περιείχαν αίμα. Δώδεκα δείγματα αναμένονταν θετικά και δεκατρία αναμένονταν αρνητικά. Η ποσοστιαία συμφωνία μεταξύ των παρατηρούμενων και των αναμενόμενων αποτελεσμάτων της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA στις τρεις μεμονωμένες τοποθεσίες δοκιμασίας και σε όλες τις τοποθεσίες μαζί παρατίθενται στον Πίνακα 10. Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η συμφωνία και οι τιμές $kappa$ για κάθε κέντρο παρατίθενται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 10. Ποσοστιαία συμφωνία δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA ανά κέντρο.

Κέντρο	Παρατηρούμενα/αναμ ενόμμενα αποτελέσματα	% Συμφωνία*
1	25/25	100% (86,28%-100%)
2	25/25	100% (86,28%-100%)
3	25/25	100% (86,28%-100%)
Συνδυασμός τοποθεσιών	75/75	100% (95,20%-100%)

* Οι αριθμοί εντός παρενθέσεων υποδεικνύουν 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της στατιστικής σύνοψης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA (τιμή Cutoff 1,0).

Στατιστική Μέτρηση	Κέντρο 1	Κέντρο 2	Κέντρο 3	Σύνολο
Ευσαιθησία	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Ειδικότητα	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Συμφωνία	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (95,20%-100%)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

* Οι αριθμοί εντός παρενθέσεων υποδεικνύουν 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Σε συνηθισμένες δοκιμασίες καταλληλότητας, τα 12 αμφιλεγόμενα δείγματα που παρατίθενται στον Πίνακα 10, τα οποία περιείχαν όλα χαμηλές συγκεντρώσεις σε οργανισμούς GC (~5x10⁴ οργανισμοί/ml), ερμηνεύονται ως κατά τεκμήριο θετικά σύμφωνα με την ενότητα Ερμηνεία αποτελεσμάτων δοκιμασιών που περιλαμβάνεται στις παρούσες οδηγίες χρήσης. Συνεπώς, η δοκιμασία απέδειξε τη δυνατότητα ανίχνευσης GC DNA σε δείγματα με ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις του οργανισμού ή συγκεντρώσεις κοντά στο όριο ανίχνευσης της δοκιμασίας. Πρόσθετες αποδείξεις για τα παραπάνω διαπιστώθηκαν κατά τον έλεγχο μιας διαθέσιμης ομάδας, η οποία περιελάμβανε δείγματα που περιείχαν τους οργανισμούς σε χαμηλή ποσότητα σε όρια τιμών που θα μπορούσαν να ανιχνευθούν από τις δοκιμασίες ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων. Δοκιμασίες σε τρία εξωτερικά κέντρα και στην QIAGEN απέδωσαν 100% θετικά (ή κατά τεκμήριο θετικά) αποτελέσματα στο δείγμα της ομάδας που περιείχε οργανισμούς GC. Σε δύο περιπτώσεις, οι τιμές RLU/CO έπεσαν στην αμφιλεγόμενη περιοχή της δοκιμασίας (βλ. Πίνακα 12 παρακάτω).

Πίνακας 12. Αποτελέσματα ομάδας δειγμάτων CT και GC.

Αποτελέσματα δοκιμασίας <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA			
Κέντρο	RLU/CO	Ερμηνεία	Αναμενόμενο αποτέλεσμα
1	0,12	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	10,45	Θετικό	Θετικό
	10,26	Θετικό	Θετικό
	9,74	Θετικό	Θετικό
	0,14	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
2	0,09	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	9,31	Θετικό	Θετικό
	9,93	Θετικό	Θετικό
	9,69	Θετικό	Θετικό
	0,09	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
3	0,11	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	11,00	Θετικό	Θετικό
	12,08	Θετικό	Θετικό
	9,45	Θετικό	Θετικό
4	0,10	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	0,07	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
	8,54	Θετικό	Θετικό
	7,27	Θετικό	Θετικό
	8,09	Θετικό	Θετικό
	0,08	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη ακρίβειας σε τρία ερευνητικά κέντρα για να προσδιοριστεί η ακρίβεια εντός της δοκιμασίας και η συνολική ακρίβεια της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA χρησιμοποιώντας μια ομάδα προσομοίωσης θετικών και αρνητικών, καλυμμένων επεξεργασμένων, κλινικών δειγμάτων σε μέσο μεταφοράς (STM). Επιπλέον, η εντός και μεταξύ οργάνων ακρίβεια που παρατηρείται με δύο διαφορετικά λουμιόμετρα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την ίδια ομάδα. Τα δύο μοντέλα λουμιόμετρων περιελάμβαναν τη συσκευή DML 2000, το οποίο αποτελεί ένα από τα προτεινόμενα λουμιόμετρα για χρήση με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID NA και το λουμιόμετρο MLX. Το MLX ήταν ένα από τα μοντέλα λουμιόμετρων που χρησιμοποιήθηκαν για την κλινική αξιολόγηση αλλά δεν είναι πλέον διαθέσιμο. Σε ένα από τα τρία ερευνητικά κέντρα παρουσιάστηκαν δυσκολίες με άλλες δοκιμασίες *digene* HC2 DNA διεξαγόμενες ως τμήμα της μελέτης αυτής και αποδιδόμενες κατά πάσα πιθανότητα σε ακατάλληλη ή ανεπαρκή εκπαίδευση στην τεχνική της δοκιμασίας. Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα του ελέγχου της ακρίβειας για τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA δεν επηρεάστηκαν, ο τεχνικός που διεξήγαγε τον έλεγχο επανεκπαιδεύτηκε στη σωστή τεχνική της δοκιμασίας.

Ο Πίνακας 13 δείχνει την απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA για όλα τα ερευνητικά κέντρα (μεταξύ των οποίων και το κέντρο στο οποίο εκδηλώθηκαν τα τεχνικά προβλήματα πριν από την επανεκπαίδευση του τεχνικού στην κατάλληλη τεχνική της δοκιμασίας). Η δοκιμασία παρουσίασε ισοδύναμη ακρίβεια μετά από επανεκπαίδευση των τεχνικών. Ωστόσο, για το μέλος 3 της ομάδας (το οποίο περιείχε χαμηλές συγκεντρώσεις του οργανισμού GC), οι τιμές RLU/CO που παρατηρήθηκαν ήταν εντός ή κοντά στην αμφιλεγόμενη ζώνη 1,0-2,5 της δοκιμασίας. Με σκοπό την ανάλυση αυτών των δεδομένων, όλες οι τιμές RLU/CO οι οποίες εμπίπτουν στη ζώνη διφορούμενων αποτελεσμάτων ή υπερβαίνουν το 2,5 ερμηνεύτηκαν ως θετικές. Αν και δεν είναι εμφανές σε αυτόν τον πίνακα, τα αποτελέσματα σχετικά με την ποιότητα παρουσίασαν 100% (54/54) (93,4%-100% 95%CI) συμφωνία με τα αναμενόμενα αποτελέσματα στα 7τρία ερευνητικά κέντρα.

Πίνακας 13. Εντός οργάνων, μεταξύ οργάνων, εντός δοκιμασιών, εκτιμήσεις ακρίβειας για RLU/CO ανά δοκιμασία και στόχο.

Μέλος σχεδίου	n	Μέση Τιμή RLU/CO	Εσωτερικά στο Εργαλείο		Μεταξύ εργαλείων		της δοκιμασίας Εντός δοκιμασιών		Σύνολο	
			Τυπική απόκλιση (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	0,0974	0,0104	10,6818	0,0017	1,7328	0,0275	28,2556	0,0275	28,1978
2	54	0,0967	0,0111	11,5031	0,0015	1,5618	0,0338	34,9362	0,0342	35,4230
3	54	3,2335	0,1502	4,6462	0,0356	1,0997	0,3520	10,8869	0,3866	11,9551
4	54	3,8407	0,2078	5,4092	0,0525	1,3671	0,3401	8,8541	0,3487	9,0802
5	54	16,1676	1,0507	6,4986	0,1122	0,6940	2,1788	13,4766	2,1437	13,2589
6	54	18,0704	1,0539	5,8321	0,3456	1,9124	2,3701	13,1158	2,3316	12,9027

Για τους σκοπούς αυτής της ανάλυσης δεδομένων, όλες οι τιμές RLU/CO που έπεσαν στην αμφιλεγόμενη περιοχή ή ήταν μεγαλύτερες από την τιμή 2,5 ερμηνεύτηκαν ως θετικές. Μια πρόσθετη μελέτη ακρίβειας πραγματοποιήθηκε στην QIAGEN προκειμένου να προσδιοριστεί η συνολική ακρίβεια της Δοκιμασίας *digene* HC2 CT-ID DNA χρησιμοποιώντας το DML 2000. Παρασκευάστηκε μια παρτίδα ακριβείας έξι μελών με χρήση ενός προσομοιωμένου μοντέλου κλινικών δειγμάτων αποτελούμενου από καλλιιεργημένα επιθηλιακά κύτταρα τοποθετημένα σε μέσο μεταφοράς δειγμάτων *digene* (STM) και από δύο αρνητικά δείγματα, δύο δείγματα χαμηλής θετικότητας και δύο μεσαίας θετικότητας. Όλα τα δείγματα περιείχαν το δειγματολήπτη που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή τους. Κάθε ομάδα ελέγχθηκε τρεις φορές, με δύο ομάδες ανά πλακίδιο, από δύο ειδικούς και για διάστημα πέντε ημερών. Σε κάθε πλακίδιο χρησιμοποιήθηκε μια προσφάτως αποδιατεταγμένη ομάδα. Πραγματοποιήθηκε συγκέντρωση των αποτελεσμάτων συνολικής ακρίβειας της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA και για τις πέντε ημέρες της δοκιμασίας, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 15. Παρά το ότι αυτό δεν είναι εμφανές στους πίνακες, η ποιοτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων παρουσιάζει συμφωνία 100% με το αναμενόμενο αποτέλεσμα (120/120, 96,7%-100% Διάστημα εμπιστοσύνης 95%) όταν χρησιμοποιείται RLU/CO με τιμή 1,0.

Πίνακας 14. Συνολική ακρίβεια δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA.

Μέλος σχεδίου	n	Μέση RLU/CO	SD	CV%	Μέση Τιμή - 2xSD	Μέση Τιμή +2xSD
1	120	0,11	0,0361	32,28	0,04	0,18
2	120	0,11	0,0283	26,45	0,05	0,16
3	120	3,03	0,3212	10,62	2,38	3,67
4	120	4,06	0,4151	10,23	3,23	4,89
5	120	14,41	2,2239	15,44	9,96	18,85
6	120	13,34	1,7298	12,97	9,88	16,80

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCT

Πραγματοποιήθηκε μια πολυκεντρική μελέτη προκειμένου να προσδιοριστεί η μεταξύ εργαστηρίων και ημερών ακρίβεια της δοκιμασίας κατά την εξέταση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt. Δύο τοποθεσίες, ανεξάρτητες της QIAGEN, εξέτασαν μια δωδεκαμελή ομάδα προσομοιωμένων δειγμάτων ασθενών τα οποία είχαν συλλεχθεί σε διάλυμα PreservCyt. Στη συνέχεια, κάθε εργαστήριο εξέτασε την ομάδα εις τριπλούν, δύο φορές ημερησίως και για διάστημα τριών ημερών χρησιμοποιώντας την ίδια παρτίδα αντιδραστηρίων. Η δωδεκαμελής ομάδα προσομοιωμένων δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt παρασκευάστηκε με διάφορες ποσότητες GC (Αυξότυπος 22, ATCC 27631) ώστε να δημιουργηθεί μια ομάδα όπως αυτή που παρουσιάζεται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Ακρίβεια ομάδας προσομοιωμένων δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt για τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA.

Σύνολο Δείγμα	Μέλη ομάδας*	Αναμενόμενο αποτέλεσμα δοκιμασίας <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA	Μέση τιμή RLU/CO
A	1Θ, 2Θ, 7Θ, 8Θ	Χαμηλό GC-θετικό	~5
B	3Θ, 4Θ, 9Θ, 10Θ	Ενδιάμεσο GC-θετικό	~10
Γ	5Α, 11Α	Αρνητικό	~0.20
Δ	6Α 12Α	Αρνητικό	~0.20

*Το χαρακτηριστικό των δειγμάτων υποδεικνύει τη γνωστή κατάσταση του *Neisseria gonorrhoeae* [θετικό (Θ) ή αρνητικό (Α)]

Για σκοπούς ανάλυσης δεδομένων, συνδυάστηκαν τα μέλη των ομάδων που προέκυψαν από την ίδια ομάδα δειγμάτων.

Πίνακας 16. Ποιοτικά αποτελέσματα κατά κύριο όγκο δείγματος – Διαδικασία δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA.

Συγκεντρώσεις ομάδων δειγμάτων	GC Θετικό n (%)	Διφορούμεν ο n (%)	Αρνητικό n (%)	Σύνολο
Αρνητικό (6Α, 12Α)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Αρνητικό (6Α, 12Α)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Σύνολο Αρνητικό	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Χαμηλό θετικό (1Θ, 2Θ, 7Θ, 8Θ)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Ενδιάμεσο θετικό (3Θ, 4Θ, 9Θ, 10Θ)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Σύνολο Θετικό	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

Πίνακας 17. Τυπική απόκλιση (SD) και συντελεστές μεταβλητότητας (CV) της ακρίβειας κατά εργαστήριο και ημέρα: Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA σε PreservCyt

Δείγμα	N	Μέση RLU/CO	Εντός Δοκιμασιών SD	Μεταξύ Δοκιμασιών SD	Μεταξύ Ημερών SD	Μεταξύ Τοποθεσιών SD	Σύνολο SD	%CV
Αρνητικό (6A, 12A)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Αρνητικό (6A, 12A)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
GC Ενδιάμεσο θετικό (3Θ, 4Θ, 9Θ, 10Θ)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
GC Χαμηλό θετικό (1Θ, 2Θ 7Θ, 8Θ)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

*Τα στοιχεία αρνητικής διακύμανσης ορίστηκαν στο μηδέν.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η αναλυτική ευαισθησία (όρια ανίχνευσης) της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA προσδιορίστηκε με απευθείας εξέταση σειριακών αραιώσεων μιας ομάδας δειγμάτων αποτελούμενης από 114 διαφορετικά απομονωμένα δείγματα *Neisseria gonorrhoeae*. Τα 114 απομονωμένα δείγματα αποτελούνταν από 13 αυξότυπους, 5 ορροποικιλίες, 10 στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, 6 απομονωμένα στελέχη χωρίς πλασμίδιο και 2 μη χαρακτηρισμένα απομονωμένα δείγματα που βρέθηκαν σε ασυμφωνία τη δοκιμασίαπολυκεντρική δοκιμασία. Ελέγχθηκαν σειρές τεσσάρων αραιώσεων από καθέναν από τις ορροποικιλίες και τους αυξότυπους με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA ώστε να προσδιοριστούν τα όρια της ανίχνευσης για τη δοκιμασία. Το όριο ανίχνευσης για κάθε *αυξότυπο Neisserria* παρατίθεται συνοπτικά στον Πίνακα 18. Οι τιμές ανιχνεύσιμου ορίου που αναφέρονται ήταν η αραιώση κάθε αυξότυπου που ανιχνεύτηκε εντός ή πλησίον της αμφιλεγόμενης περιοχής 1,0-2,5 RLU/CO.

Η ευαισθησία ανάλυσης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA κυμαινόταν από 25 έως 50.000 CFU/δοκιμασία στα 114 απομονωμένα δείγματα *Neisserria* που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένων των αυξότυπων, των ορροϊών, των στελεχών χωρίς πλασμίδιο και των στελεχών ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Μόνο ένα από τα έξι στελέχη χωρίς πλασμίδιο και μία στις πέντε ορροποικιλίες *Neisserria gonorrhoeae* τύπου IA-5 που εξετάστηκαν ανιχνεύτηκαν στα 50.000 CFU/δοκιμασία. Κανένα άλλο από τα υπόλοιπα 112 απομονωμένα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 5.000 CFU/δοκιμασία. Ο μέσος όρος ανιχνεύσιμου ορίου και για τα 114 απομονωμένα δείγματα κυμαινόταν από 974 έως 2.887 CFU/δοκιμασία, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις των απομονωμένων δειγμάτων που έπεσαν στην αμφιλεγόμενη περιοχή της δοκιμασίας και παρουσίασαν τιμή πάνω από 2,5 RLU/CO. Ο συνολικός μέσος όρος ορίου ανίχνευσης ήταν 1.931 CFU/δοκιμασία ($3,8 \times 10^4$ CFU/ml). Για τα κλινικά δείγματα τα οποία περιέχουν οργανισμούς εντός ή πλησίον του ορίου ανίχνευσης είναι πιθανό να πρέπει να πραγματοποιηθεί επαναληπτικός έλεγχος χρησιμοποιώντας μια εναλλακτική δοκιμασία ή σε ένα νέο δείγμα του ασθενούς, όπως προσδιορίζεται στην ενότητα Ερμηνεία αποτελεσμάτων αυτών των οδηγιών χρήσης.

Πίνακας 18. Περίληψη ανιχνεύσιμων ορίων ευαισθησίας για αυξότυπους GC, ορροποικιλίες, στελέχη χωρίς πλασμίδιο και στελέχη ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

Αυξότυπος	Ανιχνεύσιμη συγκέντρωση	
	CFU/ml	CFU/δοκιμασία
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος 12	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος 16	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος 22	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος 5	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος 9	5 x10 ⁴	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος AHU (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος Arg (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος AU (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος PAU (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος Pro (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Αυξότυπος Proto (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> ενδιάμεσα Σιπροφλοξασίνης (Cipl) (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> ανθεκτικά στη Σιπροφλοξασίνη (Cip R) (4 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Άλλα-5423	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Άλλα-5658	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁶	50 - 50,000
<i>N. gonorrhoeae</i> στελέχη χωρίς πλασμίδιο (6 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3,05 (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3,2	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ορροποικιλία I A-1 or IA-2 (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁶	500 - 50,000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ορροποικιλία I A-5 (4 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Ορροποικιλία I B-1 (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ορροποικιλία I B-4 or IB-15 (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> ανθεκτικά στη σπεκτινομυκίνη (SpecR)	10 ⁵	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG American (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Dutch (5 απομονωμένα δείγματα)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Type Strain	500-5000	25 - 250

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERV CYT

Οι μελέτες σχετικά με το όριο ανίχνευσης που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα για STM δεν επαναλήφθηκαν με τη χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt, διότι η αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας αναμένεται να είναι ανεξάρτητη από τον τύπο του διαλύματος όπου βρίσκονται τα δείγματα, STM ή PreservCyt, ιδιαίτερα διότι τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt υποβάλλονται σε διαδικασία μετατροπής (για λεπτομέρειες, ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του κιτ μετατροπής δειγμάτων της hc2) η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt να είναι παρόμοια σε σύνθεση με αυτά που βρίσκονται σε STM πριν από τη χρήση με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA.

Ωστόσο, δεδομένου ότι τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση κατά το στάδιο της μετατροπής, ήταν αναγκαίο να αξιολογηθεί ο πιθανός αντίκτυπος της φυγοκέντρησης στην αναλυτική ευαισθησία της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA. Για την αξιολόγηση των δυναμικών επιπτώσεων της φυγοκέντρησης στην αναλυτική ευαισθησία, προετοιμάστηκαν 88 ζεύγη δειγμάτων αρνητικών ως προς *Neisseria gonorrhoeae* DNA σε STM και διάλυμα PreservCyt με τις αντίστοιχες ποσότητες του οργανισμού *Neisseria gonorrhoeae* (στέλεχος NRL 33151 χωρίς πλασμίδια). Τα ζεύγη δειγμάτων εξετάστηκαν και εκτιμήθηκε η αναλυτική ευαισθησία με τη σύγκριση των ληφθέντων μέσων τιμών RLU/CO [(PreservCyt:STM) x 100].

Πίνακας 19. Σύγκριση αναλυτικής ευαισθησίας – Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA – Συζευγμένα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt και σε STM.

	Δοκιμασία <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Αριθμός δειγμάτων	88	88	-
Μέση RLU/CO	3,97	4,91	1,24
Διάμεση Τιμή RLU/CO	4,01	4,93	1,23
Τυπική απόκλιση	0,34	1,00	-
Ελάχιστη τιμή RLU/CO	3,06	2,30	-
Μέγιστη τιμή RLU/CO	4,77	7,10	-

Πραγματοποιήθηκε μια πρόσθετη, παρόμοια συγκριτική μελέτη με ζεύγη προσομοιωμένων δειγμάτων ασθενών. Τα δείγματα ασθενών που συλλέχθηκαν σε διάλυμα PreservCyt ελήφθησαν από κέντρο ανεξάρτητο της QIAGEN και εξετάστηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA προκειμένου να προσδιοριστούν τα θετικά δείγματα. Στη συνέχεια, αυτά τα θετικά δείγματα ασθενών συνδυάστηκαν προκειμένου να δημιουργηθεί ένα σύνολο 10 δοχείων συμπυκνωμένων δειγμάτων ασθενών σε διάλυμα PreservCyt. Από αυτές τις συγκεντρώσεις, δύο κλάσματα προετοιμάστηκαν και δέχθηκαν επεξεργασία ώστε να σχηματιστούν κυτταρικά δισκία. Τα κυτταρικά δισκία εναιωρήθηκαν αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Το κλάσμα Α παρασκευάστηκε με την προσθήκη του εναιωρημένου δισκίου στο STM και το κλάσμα Β παρασκευάστηκε με την προσθήκη του εναιωρημένου δισκίου στο διάλυμα PreservCyt. Τα δύο κλάσματα εξετάστηκαν με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA και παράγγααν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 21. Σύγκριση αναλυτικής ευαισθησίας της Δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA με ζεύγη προσομοιωμένων δειγμάτων ασθενών σε διάλυμα PreservCyt και σε STM.

	Δοκιμασία <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA		PC: STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Αριθμός δειγμάτων	10	10	-
Μέση RLU/CO	4,80	4,32	0,90
Διάμεση Τιμή RLU/CO	2,66	2,47	0,93
Τυπική απόκλιση	5,44	5,08	-
Ελάχιστη τιμή RLU/CO	1,16	1,02	-
Μέγιστη τιμή RLU/CO	18,97	17,26	-

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία σε μια σειρά από βακτηρίδια, ιούς, πλασμίδια και υλικό από ανθρώπινα κύτταρα ή προϊόντα αίματος τα οποία θα μπορούσαν να βρίσκονται στη γυναικεία πρωκτογεννητική οδό ώστε να προσδιοριστεί εάν θα μπορούσαν να συμβούν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Όλοι οι μικροοργανισμοί εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις 10^5 και 10^7 οργανισμών ή CFU ανά ml και στις περιπτώσεις όπου ήταν δυνατό σε συγκεντρώσεις 10^9 οργανισμών ή CFU ανά ml, εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό παρακάτω. Εξετάστηκαν καθαρά DNA ιών και πλασμιδίων σε ποικιλία συγκεντρώσεων όπως αναφέρεται παρακάτω.

Παρακάτω βλέπετε έναν κατάλογο των εξεταζομένων βακτηριδίων.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 απομονωμένα δείγματα) ^e
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 απομονωμένα δείγματα) ^f
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 απομονωμένα δείγματα)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 απομονωμένα δείγματα)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria species</i> ^g *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 απομονωμένα δείγματα) ^d
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (Ομάδα A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 απομονωμένα δείγματα) ^d
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 απομονωμένα δείγματα)	<i>Neisseria sicca</i> (6 απομονωμένα δείγματα)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 απομονωμένα δείγματα)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^b	<i>Neisseria subflava biovar perflava</i> (4 απομονωμένα δείγματα) ^h
<i>Chlamydia psittaci</i> ^a (2 στελέχη)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> ^b (ορροποικιλία B, Ba, E, J, L3) ^c	<i>Peptostreptococcus asaccharalyicus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (κλινικό απομονωμένο δείγμα) [†]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a
<i>Escherichia coli</i> (HB101) [†]	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Gemella heamolysans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Ομάδα B)
<i>Kingella denitrificans</i> ^d	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Ομάδα A)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> ⁱ
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	

Συγκεντρώσεις ελέγχου (οργανισμοί/ml ή CFU/ml για τα είδη *Neisseria*):

^a 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 8×10^4 , 8×10^6 , 8×10^8 , 9×10^4 , 9×10^6 , 9×10^8

^b 2×10^5 , 2×10^7 και 2×10^8

^c 1×10^5 , 1×10^7 και 1×10^8

^d 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8

^e $1,1 \times 10^5$, $1,1 \times 10^7$, $1,1 \times 10^9$

^f $9,7 \times 10^5$, $9,7 \times 10^6$, $9,7 \times 10^8$

^g 2×10^7 , 2×10^8 και 2×10^9

^h $4,8 \times 10^4$, $4,8 \times 10^6$, $4,8 \times 10^8$

ⁱ 1×10^5 και 1×10^6

† Εξετάστηκαν και τα δύο στελέχη κολοβακτηριδίων (HB101) που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια πλασμιδίων καθώς επίσης και ένα κλινικά απομονωμένο στέλεχος κολοβακτηριδίου (*E. Coli*).

*Στέλεχος ATCC *Neisseria* το οποίο διαθέτει χαρακτηριστικά *Neisseria gonorrhoeae* και *Neisseria meningitidis* (ATCC #43831).

Όλα τα βακτήρια εκτός *Neisseria gonorrhoeae* που δυνητικά απαντώνται στο ουροποιητικό σύστημα, με εξαίρεση τα τρία συμβιωτικά στελέχη της *Neisseria* και την *Chlamydia psittaci*, ήταν αρνητικά με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Παρατηρήθηκε μόνο μέτριου επιπέδου διασταυρούμενη δραστικότητα στα *Chlamydia psittaci* και *Neisseria lactamica*, η οποία θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως κατά τεκμήριο θετική. Αυτή η διασταυρούμενη δραστικότητα δεν πρέπει να επηρεάσει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA στα ουρογεννητικά δείγματα. Οι οργανισμοί που παρουσίασαν διασταυρούμενη δραστικότητα ως έναν βαθμό είναι:

	Ερμηνεία	Concentration at which Cross-reactivity Observed
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 από 2 απομονωμένα δείγματα)	Πιθανώς Θετικό*	1×10^7 οργανισμοί/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 από 6 απομονωμένα δείγματα)	Πιθανώς Θετικό*	1×10^9 CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (Ομάδα Y, 1 από 2 απομονωμένα δείγματα)	Θετικά	1×10^7 CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 από 6 απομονωμένα δείγματα)	Θετικά	5×10^5 CFU/ml

* Η τιμή RLU/CO ενέπνευσε στην αμφιλεγόμενη περιοχή 1,00-2,50 της δοκιμασίας.

Τα τρία συμβιωτικά στελέχη *Neisseria*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis* και *Neisseria mucosa*, συναντώνται κυρίως στο ρινοφάρυγγα και το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Σπανίως, απομονώνονται από το ουροποιητικό σύστημα.^{13,14} Επιπλέον, η ομάδα Y της *Neisseria meningitidis* που παρουσιάζει διασταυρούμενη δραστικότητα προσδιορίστηκε ως αχαρακτήριστη από πλευράς λιποπολυσακχαριτών και σπανίως απαντάται στο γενικό πληθυσμό. Τα *Chlamydia psittaci* είναι πιθανό να ανιχνευθούν στο δέρμα ορισμένων ατόμων που εργάζονται με ορισμένα είδη πτηνών, δεν έχουν όμως ανιχνευθεί στην πρωκτογεννητική οδό.¹⁵

Επιπλέον, δεν παρουσίασαν όλα τα απομονωμένα δείγματα του συγκεκριμένου στελέχους διασταυρούμενη δραστικότητα με την δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA, μειώνοντας την πιθανότητα παραγωγής ψευδώς θετικού αποτελέσματος στο κλινικό δείγμα, εάν το στέλεχος αυτό περιέχεται στο δείγμα. Για παράδειγμα, πέντε από τα έξι απομονωμένα δείγματα *Neisseria lactamica* ή *Neisseria mucosa* βρέθηκαν αρνητικά χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA, το ίδιο και ένα από τα δύο στελέχη *Chlamydia psittaci*. Συνεπώς, δεν αναμένεται η διασταυρούμενη δραστικότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA που παρατηρήθηκε στους τρεις συμβιώντες οργανισμούς των στελεχών *Neisseria* και *Chlamydia psittaci* να αποδώσει κλινική ερμηνεία ψευδώς θετικού αποτελέσματος στην εξέταση δειγμάτων πρωκτογεννητικής οδού.

Παρακάτω ακολουθεί λίστα των ιικών DNA, πλασμιδιακών DNA υλικών ανθρώπινων κυττάρων ή προϊόντων του αίματος που εξετάστηκαν καθώς και η συγκέντρωση ελέγχου τους:

Cytomegalovirus ^a	Human Papillomavirus τύπος 6 ^f
Epstein Barr Virus ^b	Human Papillomavirus τύπος 11 ^f
Επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας Β (Hepatitis B Surface Antigen Positive Serum) ^c	Human Papillomavirus τύπος 16 ^f
Herpes Simplex I ^d	Human Papillomavirus τύπος 18 ^f
Herpes Simplex II ^d	pBR322 ⁱ
Human Immunodeficiency Virus (HIV) ^{b,g}	SV40 ^j
Ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA ^e	PGEM [®] 3Z ⁱ
Ανθρώπινο DNA ^e Πλακούντα	PGEM [®] 3Zf(-) ^j
Ανθρώπινο αίμα πλήρους περιεκτικότητας ^h	Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα ^k

Συγκεντρώσεις ελέγχου:

- ^a 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^9 ιικά σωματίδια/ml
- ^b 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^8 ιικά σωματίδια/ml
- ^c $2,9 \times 10^8$, $1,1 \times 10^9$ ιικά σωματίδια/ml
- ^d $6,1 \times 10^6$, $2,4 \times 10^7$ ιικά σωματίδια/ml
- ^e $2,7 \times 10^2$, $1,1 \times 10^3$ αντίγραφα/ml
- ^f $1,1 \times 10^8$, $4,6 \times 10^8$ ιικά σωματίδια/ml
- ^g 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 ιικά σωματίδια/ml
- ^h 5%, 10%, 50%
- ⁱ $2,1 \times 10^8$, $8,3 \times 10^8$ αντίγραφα/ml
- ^j 1 ng/ml, 4 ng/ml
- ^k 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 κύτταρα/ml

Ουδείς από τους ιούς αυτούς παρουσίασε διασταυρούμενη δραστικότητα με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Ωστόσο, διασταυρούμενη δραστικότητα παρουσιάστηκε με τα πλασμίδια pBR322, pGEM[®] 3Z, και pGEM[®] 3Zf(-). Όλα τα άλλα DNA που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου DNA, ήταν αρνητικά. Το ανθρώπινο αίμα και τα επιθηλιακά κύτταρα δεν επέδειξαν τάσεις αλληλεπιδράσεων κατά τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Η διασταυρούμενη δραστικότητα μεταξύ του πλασμιδίου pBR322 και της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA ήταν αναμενόμενη λόγω του τρόπου δημιουργίας του ανιχνευτή GC. Η παρουσία ομόλογων αλληλουχιών pBR322 έχει αναφερθεί σε ανθρώπινα γεννητικά δείγματα και θα μπορούσαν να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε περίπτωση παρουσίας υψηλών επιπέδων βακτηριδιακού πλασμιδίου. Ωστόσο, κανένα άλλο δείγμα από τα 103 που δοκιμάστηκαν σε κάποια πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ και βρέθηκαν θετικά για *Neisseria gonorrhoeae* χαρακτηρίστηκε με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA ως ψευδώς θετικό εξαιτίας διασταυρούμενων αλληλουχιών pBR322. Επομένως, η πιθανότητα για ψευδώς θετικά αποτελέσματα με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA σε κλινικά δείγματα λόγω διασταυρούμενης δραστικότητας με ομόλογες αλληλουχίες pBR322 φαίνεται ότι είναι μικρή. Παρά το γεγονός ότι η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA έχει το δυναμικό για διασταυρούμενη δραστικότητα με το *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM, και αρκετά συμβιωτικά είδη *Neisseria*, η πιθανότητα να επηρεάζουν οι οργανισμοί αυτοί την ερμηνεία της δοκιμασίας είναι μικρή, όπως διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα της πολυκεντρικής κλινικής μελέτης.

ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ DNA

Οι γονιδιακοί ανιχνευτές είναι ομόλογοι με περίπου 0,5% του γονιδίου *Neisseria gonorrhoeae*. Ακολουθεί ανάλυση του κάθε ανιχνευτή χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA:

Ανιχνευτής	Τύπος	Κατά προσέγγιση μέγεθος ένθετου (bp)	Γονιδίωμα %
pGC1	Γονιδιακό	6,400	0.34%
pGC2		3,300	0.17%
		9.700 (Σύνολο)	0.51%
pGC3	Κρυπτικό πλασμίδιο	4,200	Δ/*

*Αντιπροσωπεύει ολόκληρη την αλληλουχία του ανιχνευτή.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ STM

Η επίδραση του αίματος και άλλων πιθανώς παρεμβατικών προσδιορισμένων ουσιών αξιολογήθηκε κατά τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Πλήρες αίμα, και εμπορικά διαθέσιμος καταιονισμός, αντιμυκητιακές κρέμες και αντισυλληπτική γέλη (παράγοντες οι οποίοι συχνά εντοπίζονται σε τραχηλικά δείγματα) προστέθηκαν σε αρνητικά και θετικά δείγματα STM (κλινικά δοχεία δειγμάτων και μη-κλινικά δείγματα) σε συγκεντρώσεις οι οποίες μπορεί να εντοπιστούν σε τραχηλικά δείγματα (βλ. Πίνακα 21). Δεν παρατηρήθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με κανέναν από τους τέσσερις παρεμβατικούς παράγοντες σε καμία συγκέντρωση. Μια μελέτη απροσδιόριστων ουσιών που απαντώνται σε ένα πληθυσμό 100 αρνητικών κλινικών δειγμάτων διαπίστωσε ότι απροσδιόριστες ουσίες δεν φαίνεται να αναστέλλουν τη δημιουργία θετικού σήματος με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA συγκριτικά με το σήμα που δημιουργείται κατά τον έλεγχο για GC σε STM.

Πίνακας 21. Επίδραση ουσιών που προκαλούν παρεμβολές στα αποτελέσματα της δοκιμασίας.

Αποτελέσματα δοκιμασίας <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA							
Διασύνδεση Παρεμβολική Ουσία	Συγκ έντρ.	Ομάδες Κλινικών Δειγμάτων				Μέσο Μεταφοράς Δειγμάτων	
		Αρνητικό		Θετικό*		Θετικό*	
		RLU/CO	Παρατηρήθηκαν	RLU/CO	Παρατηρήθηκαν	RLU/CO	Παρατηρήθηκαν
Καμία (Μάρτυρας)		0,15	NA	3,41	NA	2,70	NA
Αίμα	1%	0,21	+37%	3,17	-7%	3,21	+19%
	5%	0,19	+22%	3,11	-9%	3,05	+13%
Καταιονισμός	1%	0,21	+37%	3,48	+2%	2,80	+4%
	5%	0,18	+20%	3,47	+2%	3,20	+18%
Ανιμκητιακή Κρέμα	1%	0,19	+20%	3,60	+5%	2,95	+9%
	5%	0,20	+30%	3,52	+3%	3,09	+14%
Αντισυλληπτική Γέλη	1%	0,08	-54%	3,18	-7%	2,98	+10%
	5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15%

* Εμβολιάστηκαν με τον οργανισμό *Neisseria gonorrhoeae* 10³ CFU/ml αυξότυπο 1.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT

Οι εκτιμήσεις συγκεκριμένων ουσιών που προκαλούν παρεμβολές, όπως περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα, για τα δείγματα σε STM, δεν πραγματοποιήθηκαν με χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt. Ωστόσο, τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt δεν αναμένεται να παρουσιάσουν διαφορετικά προφίλ παρεμβολών σε σχέση με τα δείγματα σε STM, διότι η ανατομική περιοχή συλλογής των ενδοτραχηλικών δειγμάτων είναι η ίδια και για τους δύο τύπους δειγμάτων (διάλυμα PreservCyt και STM) και δεδομένου ότι ένα δείγμα σε διάλυμα PreservCyt υποβάλλεται σε μια διαδικασία μετατροπής (όπως λεπτομερώς αναφέρεται στις οδηγίες χρήσης του kit μετατροπής δειγμάτων *digene* HC2), η οποία το καθιστά συγκρίσιμο ως προς τη σύνθεση με ένα δείγμα σε STM.

Υπολείμματα ρυθμιστικού διαλύματος μετατροπής δείγματος (SCB)¹ μπορεί να υπάρχουν σε ελάχιστες ποσότητες σε πλήρως τροποποιημένα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt. Για το λόγο αυτό ολοκληρώθηκε μια αναλυτική μελέτη προκειμένου να επαληθευτεί η αναλυτική απόδοση της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA παρουσία διαφόρων ποσοτήτων του SCB. Προετοιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις πλασμιδιακού GC DNA σε STM. Στη συνέχεια προστέθηκε περίσσεια όγκου SCB στα δείγματα και τρία κλάσματα κάθε δείγματος εξετάστηκαν προκειμένου να ληφθεί μια μέση τιμή RLU/CO για κάθε δείγμα με την παρουσία είτε διαλύματος PreservCyt είτε SCB. Από τη σύγκριση αυτών των μέσων τιμών RLU/CO για κάθε δείγμα με τις μέσες τιμές RLU/CO για κάθε δείγμα μάρτυρα STM δεν προέκυψε κανένα ψευδώς θετικό ή ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα.

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΤΙΜΗΣ CUTOFF ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ *digene* HC2 GC-ID DNA ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΣΕ STM

Η επαναληψιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA με κλινικά δείγματα που συλλέγονται σε STM προσδιορίστηκε σε μια μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν 30 κλινικά δείγματα (15 θετικά και 15 αρνητικά) τα οποία παρασκευάστηκαν με το συνδυασμό τραχηλικών δειγμάτων τα οποία είχαν ληφθεί με τραχηλική βούρτσα σε STM, είχαν υποβληθεί σε αποδιάταξη και εξεταστεί. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε επαναληπτικά σετ δοκιμασιών, 4 καθημερινά για σύνολο 5 ημερών και για σύνολο 20 επαναληπτικών δοκιμασιών ανά δείγμα. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-

¹ Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Μετατροπής Δείγματος είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα με Ηωσίνη Υ και 0,05% (w/v) αζίδιο του νατρίου, το οποίο απαιτείται για τη μετατροπή ενός δείγματος PreservCyt. Για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του Kit μετατροπής δείγματος της QIAGEN (*digene* HC2 Sample Conversion Kit).

ID DNA. Η μέση τιμή RLU/CO, 95% διαστήματα εμπιστοσύνης για την μέση τιμή (Διάστημα εμπιστοσύνης 95%) και το ποσοστό των θετικών αποτελεσμάτων υπολογίστηκε για κάθε δείγμα πάνω από πέντε μέρες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22. Μέση τιμή RLU/CO με διάστημα εμπιστοσύνης και ποσοστά θετικών κατά τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA δειγμάτων (Φθίνουσα σειρά κατά μέση τιμή RLU/CO).

Αρ.	RLU/CO	Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	% Θετικό
1	1,92	1,31-2,00	100 (20/20)
2	1,22	1,16-1,29	100 (20/20)
3	1,21	1,16-1,25	100 (20/20)
4	1,21	1,16-1,25	90 (18/20)
5	1,17	1,03-1,28	100 (20/20)
6	1,14	1,09-1,18	90 (18/20)
7	1,08	1,04-1,12	80 (16/20)
8	1,05	1,00-1,09	70 (14/20)
9	1,05	1,01-1,09	70 (14/20)
10	1,02	0,98-1,06	65 (13/20)
11	1,00	0,96-1,03	65 (13/20)
12	1,00	0,97-1,03	45 (9/20)
13	1,00	0,96-1,03	40 (8/20)
14	0,98	0,95-1,02	45 (9/20)
15	0,91	0,89-0,94	10 (2/20)
16	0,90	0,87-0,92	0 (0/20)
17	0,87	0,84-0,91	5 (1/20)
18	0,86	0,83-0,89	0 (0/20)
19	0,84	0,82-0,85	0 (0/20)
20	0,82	0,79-0,85	0 (0/20)
21	0,79	0,75-0,82	0 (0/20)
22	0,77	0,78-0,80	0 (0/20)
23	0,76	0,74-0,79	0 (0/20)
24	0,75	0,78-0,79	0 (0/20)
25	0,73	0,70-0,75	0 (0/20)
26	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
27	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
28	0,56	0,53-0,59	0 (0/20)
29	0,54	0,52-0,56	0 (0/20)
30	0,12	0,11-0,13	0 (0/20)

Τα δείγματα με μέση τιμή RLU/CO 20% ή περισσότερο πάνω από την τιμή cutoff ήταν θετικά ή κατά τεκμήριο θετικά στο 97% των περιπτώσεων, ενώ τα δείγματα με μέση τιμή RLU/CO 20% ή περισσότερο πάνω από την τιμή cutoff ήταν αρνητικά στο 100% των περιπτώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα δείγματα που απέχουν κατά 20% ή περισσότερο από την τιμή cutoff αναμένεται να παράγουν αποτελέσματα σε συμφωνία με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA.

Τα δείγματα με τιμές που προσεγγίζουν την τιμή cutoff της δοκιμασίας παρέμειναν ως επί κατά τεκμήριο θετικά ή αρνητικά. Τα δείγματα με τιμές πάνω από την τιμή cutoff της δοκιμασίας αλλά μέσα σε ποσοστό 20% παρέμειναν θετικά ή πιθανώς θετικά στο 69,4% των περιπτώσεων. Τα δείγματα με τιμές κάτω από την τιμή cutoff αλλά σε ποσοστό 20% παρέμειναν αρνητικά στο 91,4% των περιπτώσεων.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA παράγει επαναλήψιμα αποτελέσματα με κλινικά δείγματα που συλλέγονται σε STM των οποίων οι τιμές RLU/CO εμπíπτουν εντός του ποσοστού 20% της τιμής cutoff της δοκιμασίας.

ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Το λουμινόμετρο Dynex, μοντέλο MLX είχε χρησιμοποιηθεί μαζί με το DML 2000 για την παραγωγή δεδομένων και για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών απόδοσης της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA. Το λουμινόμετρο MLX δεν είναι πλέον διαθέσιμο για χρήση. Χρησιμοποιείται πλέον μόνο το DML 2000 για την παραγωγή αποτελεσμάτων. Τα παρακάτω δεδομένα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια πολυκεντρικής κλινικής δοκιμής πολλαπλών κέντρων με στόχο τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας του θετικού βαθμονομητή και του αρνητικού βαθμονομητή και παρέχονται παρακάτω για ιστορικούς λόγους.

Συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα κλινικών αξιολογήσεων 79 δοκιμασιών με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA προκειμένου να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα του θετικού βαθμονομητή και του αρνητικού βαθμονομητή, καθώς και η συχνότητα κατά την οποία απαιτούνται χειροκίνητοι επαναληπτικοί υπολογισμοί (Πίνακας 23). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μέσος όρος %CV αυτών των 79 δοκιμασιών ήταν 5,79% και ότι καμιά δοκιμασία δεν σημείωσε μέσους όρους τιμών αρνητικού βαθμονομητή πάνω από 150 RLU. Λαμβάνοντας υπόψη και τα 3 αποτελέσματα του θετικού βαθμονομητή ανά δοκιμασία, επαναληψιμότητα του βαθμονομητή σε ποσοστό CV μεγαλύτερο από 20% παρατηρήθηκε μόνο σε 1 από τις 79 δοκιμασίες (1,3%) και η τιμή %CV υπολογίστηκε εκ νέου. Μετά το νέο υπολογισμό, η τιμή %CV της δοκιμασίας παρέμεινε κάτω από 15%, υποδηλώνοντας ότι όλοι οι κύκλοι της δοκιμασίας ήταν έγκυροι.

Πίνακας 23. Απόδοση του θετικού βαθμονομητή και του αρνητικού βαθμονομητή. Συνδυασμένα δεδομένα από την πολυκεντρική κλινική δοκιμασία και τη μελέτη ακριβείας. (n = 79 δοκιμασίες)

Όργανο	Αριθμός δοκιμασιών	Μέσος Όρος Λόγων S/N	Τύπος βαθμονομητή	Μέσος όρος υπολογισμένων μέσων (RLU)		Τρεις επαναλήψεις υπολογιζόμενων %CV	
				Τρεις επαναλήψεις	Προσαρμογή για μη έγκυρες τιμές	Τρεις επαναλήψεις	Προσαρμογή για μη έγκυρες τιμές
DML 2000	9	7,71	Αρνητικό	40,300	34,470	18,960	12,240
			Θετικά	292,370	292,370	6,670	6,670
MLX*	70	4,52	Αρνητικό	0,076	0,070	13,830	12,360
			Θετικά	0,292	0,292	5,674	5,674

*Δεν είναι πλέον διαθέσιμο για χρήση.

ΙΣΟΔΥΝΑΜΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΕΣΟ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ PRESERVCYT

Η ισοδυναμία μεταξύ δειγμάτων σε STM και δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt μελετήθηκε σε μια κλινική αξιολόγηση 1252 συζευγμένων τραχηλικών δειγμάτων. Ένα δείγμα σε διάλυμα PreservCyt υποβλήθηκε σε επεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του *digene* HC2 Sample Conversion Kit και εξετάστηκε μαζί με ένα συζευγμένο δείγμα σε STM με τη δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Η κλινική επίδοση προέκυψε χρησιμοποιώντας δείγματα διαλύματος PreservCyt με υπολειμματικό όγκο μεγαλύτερο από 6,5 ml. Η ανάλυση δειγμάτων με υπολειμματικούς όγκους μεταξύ 4,0 και 6.5 ml πρέπει να ελέγχεται από το εργαστήριο.

Πίνακας 24. Περίληψη στατιστικών δεδομένων σχετικά με τη συμφωνία της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA μεταξύ συζευγμένων δειγμάτων που συλλέγονται σε STM και σε διάλυμα PreservCyt.

Κοόρτη	Kappa Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	Θετικά Συμφωνία (n/N) Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	Αρνητικό Συμφωνία (n/N) Διάστημα εμπιστοσύνης 95%	Συνολική συμφωνία (n/N) Διάστημα εμπιστοσύνης 95%
Εξάιρεση δεδομένων διφορούμενης ζώνης	0,96 0,92, 0,99	98,00 (49/50) 89,35, 99,95	99,75 (1181/1184) 99,26, 99,95	99,68 (1230/1234) 99,17, 99,91
Αλγόριθμος επανεξέτασης ζώνης διφορούμενων*	0,93 0,88, 0,98	91,80 (56/61) 81,90, 97,28	99,75 (1188/1191) 99,27, 99,95	99,36 (1244/1252) 98,74, 99,72

*Τα δείγματα σε εύρος 1,0 έως 2,5 RLU/CO εξετάστηκαν εις διπλούν. Η ταξινόμηση των δειγμάτων προσδιορίστηκε στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τον κανόνα των δύο από τα τρία.

Η επαναληψιμότητα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA υπολογίστηκε ως μέρος μιας κλινικής αξιολόγησης προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα αποτελέσματα της δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA ήταν ισοδύναμα όταν εξετάστηκε μια ομάδα 20 δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt σε διάστημα τριών ημερών και σε τρία εργαστήρια. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επαναληψιμότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 25 παρακάτω.

Πίνακας 25. Ποσοστιαία συμφωνία δοκιμασίας *digene* HC2 GC-ID DNA – Κατά ερευνητικό κέντρο.

Κέντρο	Ληφθείσα έναντι αναμενόμενης *	% Συμφωνία (Διάστημα εμπιστοσύνης 95%)
1	60/60	100 (94,04, 100)
2	60/60	100 (94,04, 100)
3	59/60	98,33 (91,06, 99,96)
Συνδυασμός όλων των τοποθεσιών	179/180	99,44 (96,94, 99,99)

*20 μέλη x 3 ημέρες x 3 τοποθεσίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Roongpisuthipong A, Lewis JS, Kraus SJ, Morse SA. Gonococcal urethritis diagnosed from enzyme immunoassay of urine sediment. *Sex Transm Dis* 1988;15(4):192-5.
2. Schachter J, McCormack WM, Smith RF, Parks RM, Bailey R, Ohlin AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhea. *J Clin Microbiol* 1984;19(1):57-9.
3. Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington,DC: ASM Press; 1995. p 324-40.
4. Kingsbury DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* 1969 Jun;98(3):1400-1.
5. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
6. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
7. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Wayne,PA: NCCLS; 1997.
9. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
10. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
12. U.S.Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.
13. [Anonymous]. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
14. [Anonymous]. *Textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995.
15. Schachter J. Chlamydiae. In: Balows A, Hausler WJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington,D.C.: American Society for Microbiology; 1991. p 1045-53.

ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΧΡΗΣΗΣ

Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΕΙΣ
Παρατηρείται εσφαλμένη ή καμία χρωματική αλλαγή κατά την αποδιάταξη.	Δεν προστέθηκε Αντιδραστήριο αποδιάταξης, ή ακατάλληλη παρασκευή Αντιδραστηρίου αποδιάταξης.	1. Βεβαιωθείτε ότι το Αντιδραστήριο αποδιάταξης περιέχει το χρωματικό δείκτη και έχει σκούρο μοβ χρώμα. 2. Βεβαιωθείτε ότι έχει προστεθεί Αντιδραστήριο αποδιάταξης στο δείγμα μετρώντας τον όγκο του δείγματος (ο οποίος πρέπει να ανέρχεται σε 1.5 ml). If the volume indicates that Denaturation Reagent was not added, make the appropriate addition, mix and proceed with the assay if the proper color change is then observed.
	Δείγμα με αίμα μπορεί να συγκάλυψε τη χρωματική αλλαγή.	Η ακριβής χρωματική αλλαγή που περιγράφεται δεν αναμένεται με αυτά τα δείγματα. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν πρέπει να επηρεάζονται δυσμενώς.
	Το pH του δείγματος πιθανόν να είναι εξαιρετικά όξινο.	Το δείγμα μπορεί να είναι ασυνήθιστα όξινο, συνεπώς δεν θα πραγματοποιηθεί η αναμενόμενη αλλαγή χρώματος. Συλλέξτε ένα νέο δείγμα πριν από την εφαρμογή οξεικού οξέος στον τράχηλο, δεδομένου ότι το ακατάλληλο pH του δείγματος θα επηρεάσει δυσμενώς τα αποτελέσματα της δοκιμασίας.
Οι Ποιοτικοί έλεγχοι παράγουν εσφαλμένα αποτελέσματα	Λανθασμένη επιλογή πρωτοκόλλου λογισμικού για τη δοκιμασία	Εάν το πρωτόκολλο λογισμικού είναι λάθος για την εκτελούμενη δοκιμασία, το πλακίδιο πρέπει να αναγνωστεί ξανά εντός 30 λεπτών μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 και με το σωστό πρωτόκολλο.
	Αντίστροφη τοποθέτηση των ποιοτικών ελέγχων QC CT και QC GC.	Επανεξετάστε τα δείγματα.
Παρατηρείται λάθος χρωματική αλλαγή κατά τον υβριδισμό.	<ul style="list-style-type: none"> • Ανεπαρκής ανάμιξη μείγματος ανιχνευτή με το βαθμονομητή, ποιοτικούς ελέγχους ή/και τα δείγματα που έχουν υποστεί αποδιάταξη. • Δεν έχει προστεθεί μείγμα ανιχνευτή. • Έχει προστεθεί λανθασμένος όγκος αντιδραστηρίου. 	Ανακινήστε το μικροπλακίδιο υβριδισμού για 2 λεπτά ακόμα. Εάν υπάρχουν πηγαδάκια που παραμένουν μοβ ή γκρι προσθέστε ακόμα 25 μl μείγμα ανιχνευτή και αναμειξτε καλά. Εάν, μετά την προσθήκη του ανιχνευτή και την εκ νέου ανάμιξη, δεν εμφανιστεί η κατάλληλη χρωματική αλλαγή και εφόσον το δείγμα δεν περιείχε αίμα ή άλλες ουσίες, επανεξετάστε το δείγμα.
	Δείγμα με αίμα μπορεί να συγκάλυψε τη χρωματική αλλαγή.	Η ακριβής χρωματική αλλαγή που περιγράφεται δεν αναμένεται με αυτά τα δείγματα. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας δεν πρέπει να επηρεάζονται δυσμενώς.
	Το δείγμα περιείχε < 1.000 μl μέσου μεταφοράς δειγμάτων <i>digene</i> (STM).	Ελέγξτε τον όγκο του αρχικού δείγματος. Ο όγκος πρέπει να ανέρχεται σε 1425 μl ± 20 μl (μετά την αφαίρεση 75 μl). Εάν ο όγκος είναι <1.405 μl, το αρχικό δείγμα περιείχε <1.000 μl STM. Προβείτε σε λήψη νέου δείγματος.
Η δοκιμασία δεν πληροί τα κριτήρια της επαλήθευσης βαθμονόμησης. Δεν παρατηρείται κανένα σήμα στο θετικό βαθμονομητή, στους ποιοτικούς ελέγχους ή στα	Δεν έχει προστεθεί ανιχνευτής στον αραιωτή ανιχνευτή.	Παρασκευάστε το μείγμα ανιχνευτή GC όπως περιγράφεται στην ενότητα " <i>Προετοιμασία και φύλαξη αντιδραστηρίων</i> " σε αυτές τις οδηγίες χρήσης. Αναμειξτε καλά. Τοποθετήστε τις κατάλληλες ετικέτες στους σωλήνες. Επαναλάβετε τη δοκιμασία χρησιμοποιώντας νέο μείγμα ανιχνευτή.
	Ο ανιχνευτής έχει μολυνθεί με ριβονουκlease κατά την παρασκευή του.	Χρησιμοποιήστε ρύγχη μικροπιπέτας με φραγμό αερολύματος κατά τη μεταγίση του ανιχνευτή και φοράτε γάντια χωρίς πούδρα. Αραιώνετε τον ανιχνευτή σε αποστειρωμένο δοχείο. Χρησιμοποιείτε μόνο καθαρά και αναλώσιμα δοχεία φύλαξης αντιδραστηρίων.

Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΕΙΣ
δείγματα	Ανεπαρκής ανάμειξη του μείγματος ανιχνευτή με τον αραιωτή ανιχνευτή.	Μετά την προσθήκη Ανιχνευτή στον Αραιωτή ανιχνευτή, αναμίξτε πολύ καλά με ισχυρή ανάδευση (vortexing) σε υψηλές ταχύτητες επί τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα. Πρέπει να δημιουργηθεί ένας εμφανής στρόβιλος.
	Ανεπαρκής ανάμειξη του αραιωμένου ανιχνευτή και του δείγματος που έχει υποβληθεί σε αποδιάταξη.	Μετά την προσθήκη μίγματος ανιχνευτή στο δείγμα που έχει αποδιάταχθεί, καλύψτε το μικροπλακίδιο υβριδισμού και αναδεύστε σε περιστροφικό ανακινήτηρα I ρυθμισμένο στις 1100 ± 100 rpm επί 3 ± 2 λεπτά, όπως περιγράφεται στο εδάφιο Διαδικασία δοκιμασίας, Υβριδοποίηση, βήμα 6 αυτών των οδηγιών χρήσης. Βεβαιωθείτε για τις χρωματικές αλλαγές από μοβ σε κίτρινο σε κάθε πηγαδάκι.
	Λάθος χρόνος ή θερμοκρασία κατά το στάδιο του υβριδισμού.	Υβριδοποιήστε επί 60 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία 65 ± 2°C, όπως περιγράφεται στο εδάφιο Διαδικασία δοκιμασίας, Υβριδοποίηση, βήμα 7 αυτών των οδηγιών χρήσης. Ελέγξτε τη θερμοκρασία της Συσκευής θέρμανσης μικροπλακιδίου I. Βεβαιωθείτε ότι η Συσκευή θέρμανσης μικροπλακιδίου I έχει ρυθμιστεί κατάλληλα ώστε να θερμαίνει τα δείγματα στην κατάλληλη θερμοκρασία και έχει προθερμανθεί για 1 ώρα πριν από τη χρήση.
	Ανεπαρκής ανάμειξη κατά το στάδιο της δέσμωσης.	Ανακινήστε τον περιστροφικό ανακινήτηρα I με ταχύτητα 1100 ± 100 rpm για 60 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία 20-25°C, όπως περιγράφεται στην ενότητα Διαδικασία ελέγχου, Δέσμωση υβριδίου, βήμα 4 αυτών των οδηγιών χρήσης. Επαληθεύστε την ταχύτητα του Περιστροφικού Ανακινήτηρα I με βαθμονόμηση, όπως περιγράφεται στην ενότητα Βαθμονόμηση Ταχύτητας Ανακινήτηρα του Εγχειριδίου Χρήσης του Περιστροφικού Ανακινήτηρα I.
	<ul style="list-style-type: none"> Δεν προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1. Δεν πραγματοποιήθηκε επώαση για το καθορισμένο χρονικό διάστημα. 	<p>Μεταφέρετε με πιπέττα 75 μl του Αντιδραστηρίου Ανίχνευσης 1 σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα.</p> <p>Επωάστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 30-45 λεπτά.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Δεν προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2. Δεν πραγματοποιήθηκε επώαση για το καθορισμένο χρονικό διάστημα. 	<p>Μεταφέρετε με πιπέττα 75 μl του Αντιδραστηρίου Ανίχνευσης 2 σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα.</p> <p>Επωάστε στους 20-25°C για 15-30 λεπτά.</p>
	Δυσλειτουργία ή λανθασμένος προγραμματισμός του λουμινόμετρου	Ανατρέξτε στις ενότητες συντήρησης/σέρβις και αντιμετώπισης προβλημάτων του σχετικού εγχειριδίου χρήσης του λογισμικού ανάλυσης του προσδιορισμού <i>digene</i> , για περαιτέρω οδηγίες ή καλέστε το Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN
Υψηλές τιμές RLU σε Βαθμονομητές, Ποιοτικούς ελέγχους ή/και δείγματα (≥ 150 RLU σε πολλά ή σε όλα τα πηγαδάκια). Η δοκιμασία πιθανόν να μην πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.	<ul style="list-style-type: none"> Δεν έχει προστεθεί αντιδραστήριο αποδιάταξης, έχει προστεθεί λανθασμένος όγκος αντιδραστηρίου, δεν έχει πραγματοποιηθεί επαρκής ανάμειξη του αντιδραστηρίου αποδιάταξης με τους βαθμονομητές, τους ποιοτικούς ελέγχους ή/και τα δείγματα. Η θερμοκρασία και το επίπεδο νερού στο υδατόλουτρο δεν είναι κατάλληλα. 	<ul style="list-style-type: none"> Πριν από την προσθήκη Αντιδραστηρίου αποδιάταξης βεβαιωθείτε ότι η επαναληπτική πιπέττα μεταγγίζει με ακρίβεια. Οι βαθμονομημένες πιπέττες είναι εξαιρετικά σημαντικές. Προσθέστε το μισό όγκο Αντιδραστηρίου αποδιάταξης σε κάθε σωλήνα και ανάμειξη καλά. Για να αποφύγετε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου (αναστρέψτε το σωλήνα μια φορά εάν η ανάμειξη γίνεται με το χέρι). Βαθμονομητές, Ποιοτικοί έλεγχοι και δείγματα πρέπει να αποκτήσουν ένα μοβ χρώμα μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου αποδιάταξης. Ελέγξτε τη βαθμονόμηση ταχύτητας του Multi-Specimen Tube Vortexer 2l. Ελέγξτε το επίπεδο και τη θερμοκρασία του νερού του υδατόλουτρου.

Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΕΙΣ
	<ul style="list-style-type: none"> Διαρροή φωτός στο λουμινόμετρο . Το κάλυμμα έχει σπάσει. Η θύρα δεν έχει σφραγιστεί. 	Εκτελέστε μία μέτρηση υπόβαθρου (μέτρηση πρωτογενών δεδομένων) του λουμινόμετρου, εκτελώντας ,μέτρηση ενός κενού μικροπλακιδίου. Μια τιμή μεγαλύτερη των 50 RLU υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχει διαρροή φωτός. Ανατρέξτε στις ενότητες συντήρησης/σέρβις και αντιμετώπισης προβλημάτων στο σχετικό εγχειρίδιο χρήσης του λογισμικού ανάλυσης προσδιορισμού <i>digene</i> για περαιτέρω πληροφορίες ή καλέστε το Τμήμα τεχνικής εξυπηρέτησης της QIAGEN.
	Μόλυνση του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 ή των πηγαδιών μικροπλακιδίων Δέσμευσης με Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 ή με εξωγενή αλκαλική φωσφατάση.	Ανατρέξτε στον Έλεγχο Μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων.
	Μολυσμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης.	Ανατρέξτε στον Έλεγχο Μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων.
	Μολυσμένο Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων.	Ανατρέξτε στον Έλεγχο Μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων.
	Ανεπαρκής έκπλυση των πηγαδιών μικροπλακιδίων Δέσμευσης μετά την επώαση του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 1.	Καθαρίζετε προσεκτικά τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, συμπληρώνοντας τα πηγαδάκια μέχρι να προκληθεί υπερχειλίση, κάθε φορά, ή χρησιμοποιώντας το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων 1. Δεν πρέπει να υπάρχουν υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια έπειτα από την έκπλυση. Βλ. Αντιμετώπιση προβλημάτων του <i>Εγχειριδίου χρήσης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων 1</i> για οδηγίες σχετικά με τον έλεγχο για μολύνσεις ή δυσλειτουργίες.
	Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων με Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.	Βεβαιωθείτε ότι όλες οι επιφάνειες εργασίας είναι καθαρές και στεγνές. Προσοχή απαιτείται κατά τη χρήση του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 1. Αποφύγετε τα αερολύματα.
	Κηλίδες διαλύματος υβριδισμού στην ίδια επιφάνεια των μαντηλιών τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχων χαρτομάντιλων με ελάχιστο χνούδι. Χρήση ακατάλληλων χαρτομάντιλων.	Μην στυπώνετε χρησιμοποιώντας συνεχώς τις ίδιες επιφάνειες χαρτομάντιλων Kimtowels Wipers ή ανάλογων χαρτομάντιλων με ελάχιστο χνούδι. Για την απορρόφηση Χρησιμοποιήστε μαντιλάκια τύπου Kimtowels Wipers ή αντίστοιχα χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι.
	Υλικό ποιοτικού ελέγχου GC χρησιμοποιήθηκε ως Θετικός βαθμονομητής. Η δοκιμασία δεν πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.	Βεβαιωθείτε ότι οι βαθμονομητές και οι ποιοτικοί έλεγχοι έχουν τοποθετηθεί σωστά.
Χαμηλές τιμές λόγου PC/NC ή υψηλός αριθμός δειγμάτων χαμηλής θετικότητας (>20% του συνολικού αριθμού δειγμάτων) με λόγο RLU/CO <2,0. Η δοκιμασία πιθανώς δεν πληροί τα κριτήρια επικύρωσης. Η δοκιμασία πιθανόν να μην πληροί τα κριτήρια επαλήθευσης.	Ανεπαρκής παρασκευή δείγματος.	Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο Αντιδραστήριου αποδιάταξης και αναμείξτε καλά με στροβιλισμό. Για να αποφύγετε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα πραγματοποιώντας στροβιλισμό με τη μέθοδο Multi-Specimen Tube Vortexer 2 για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα (εάν χρησιμοποιείτε τη μέθοδο χειροκίνητου στροβιλισμού, πραγματοποιήστε στροβιλισμό για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα και αναστρέψτε το σωλήνα μία φορά). Πρέπει να παρατηρηθεί μια εμφανής χρωματική αλλαγή από διαυγές σε σκούρο μοβ χρώμα. Επώαστε για 45 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία 65 ± 2°C. Κατά τη χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt, αυτά τα υβρίδια είναι πιθανό να υφίστανται στα εσωτερικά τοιχώματα του σωλήνα μετατροπής δείγματος. Για την αποφυγή πιθανής μετάδοσης αυτού του μη-αποδιατεταγμένου κυτταρικού υλικού, το ρύγχος της πιπέτας δεν πρέπει να αγγίζει τα τοιχώματα του σωλήνα μετατροπής δείγματος κατά τη μεταφορά του αποδιατεταγμένου δείγματος στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή GC. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης του προϊόντος <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.

Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΕΙΣ
	Ανεπαρκής ανάμιξη του ανιχνευτή ή προσθήκη ανεπαρκούς ποσότητας ανιχνευτή στις δοκιμασίες.	Παρασκευάστε τα Μείγματα Ανιχνευτών κατά τον τρόπο που περιγράφεται. Αναμείξτε καλά με στροβιλισμό και βεβαιωθείτε ότι δημιουργείται ένας εμφανής στρόβιλος. Τα μείγματα ανιχνευτών πρέπει να προστίθενται στα πηγαδάκια με πιπέττα πολλαπλών καναλιών ή με επαναληπτική πιπέττα ώστε να εξασφαλίζεται η ακριβής μετάγγιση.
	Προσθήκη ανεπαρκούς όγκου μείγματος ανιχνευτή στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου υβριδισμού.	Βεβαιωθείτε ότι η 8-κάναλη πιπέττα πραγματοποιεί ακριβή μετάγγιση πριν την προσθήκη του μίγματος ανιχνευτή στο αποδιατεταγμένο δείγμα στον πυθμένα από κάθε πηγαδάκι. Βεβαιωθείτε ότι η 8-κάναλη πιπέττα πραγματοποιεί ακριβή μετάγγιση πριν από την προσθήκη του μείγματος ανιχνευτή στα πηγαδάκια υβριδισμού. Μετά την προσθήκη και καλή ανάμιξη του Μείγματος Ανιχνευτών πρέπει να παρουσιαστεί χρωματική αλλαγή από σκούρο μοβ σε κίτρινο.
	Απώλεια ενέργειας του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1.	Φυλάξτε το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 σε θερμοκρασία 2-8°C. Χρησιμοποιήστε το μέχρι την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα της εξωτερικής συσκευασίας του κιτ.
	Ανεπαρκής δέσμευση RNA: υβρίδια DNA.	Η διαδικασία της δέσμευσης πρέπει να εκτελείται χρησιμοποιώντας τον περιστροφικό ανακινήτηρα I στη ρύθμιση 1100 ±100 rpm. Επαληθεύστε την ταχύτητα του ανακινήτηρα όπως περιγράφεται στην ενότητα «Βαθμονόμηση ταχύτητας ανακινήτηρα» του Εγχειριδίου χρήσης του Περιστροφικού Ανακινήτηρα I.
	Ανεπαρκής έκπλυση.	Πλένετε τα μικροπηγαδάκια σχολαστικά με το Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 6 φορές, προκαλώντας κάθε φορά υπερχειλίση ή χρησιμοποιώντας το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων.
	Μολυσμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Έκπλυσης.	Ανατρέξτε στον Έλεγχο Μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων.
Ακολουθίες θετικών δειγμάτων με τιμές RLU κατά προσέγγιση πανομοιότυπες.	Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων δέσμευσης κατά το χειρισμό της δοκιμασίας.	Καλύψτε τα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης σε όλα τα στάδια της επώασης. Αποφύγετε την έκθεση των πηγαδιών του μικροπλακιδίου σε μόλυνση αερολύματος κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας. Κατά τους χειρισμούς, φοράτε γάντια χωρίς επικάλυψη πούδρας.
	Μόλυνση του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2.	Προσέχετε ώστε να μη μολύνετε το απόθεμα του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 κατά τη μετάγγισή του στα πηγαδάκια μικροπλακιδίων δέσμευσης. Αποφύγετε τη μόλυνση του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 με αερολύματα από το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1 ή από σκόνη του εργαστηρίου κ.λ.π.
	Δυσλειτουργία του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων.	Ανατρέξτε στον Έλεγχο Μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων ή βλ. ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων <i>Εγχειρίδιο Λειτουργίας και Συντήρησης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων</i> για οδηγίες σχετικά με τον έλεγχο για μόλυνση ή αναγνώριση δυσλειτουργιών.
Μεγάλες αποκλίσεις %CV μεταξύ των παραγώγων.	Ανακριβής μετάγγιση (π.χ. φυσαλίδες αέρα, μη βαθμονομημένη πιπέττα).	Ελέγξτε την πιπέττα ώστε να βεβαιωθείτε ότι μεταγγίζονται επαναλήψιμοι όγκοι. Βαθμονομήστε τακτικά τις πιπέττες.
	Ανεπαρκής ανάδευση.	Αναμείξτε καλά σε όλα τα στάδια. Στροβιλίστε πριν και μετά την επώαση αποδιάταξης. Βεβαιωθείτε ότι δημιουργείται ένας εμφανής στρόβιλος.
	Ατελής μεταφορά υγρού από το μικροπλακίδιο υβριδισμού στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης.	Φροντίστε ώστε να εξασφαλίζετε ότι μεταφέρονται επαναλήψιμοι όγκοι κατά το στάδιο της μεταφοράς από το μικροπλακίδιο υβριδισμού στο μικροπλακίδιο δέσμευσης.

Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΕΙΣ
	Ακατάλληλες συνθήκες έκπλυσης.	Πλύνετε τα μικροπηγαδάκια 6 φορές σχολαστικά με το Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, προκαλώντας κάθε φορά υπερχειλίση ή χρησιμοποιώντας το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων και τα κατάλληλα πρωτόκολλα για το σύστημα αυτό.
	Μόλυνση των πηγαδιών μικροπλακιδίων με Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.	Βεβαιωθείτε ότι όλες οι επιφάνειες εργασίας είναι καθαρές και στεγνές. Προσοχή απαιτείται κατά τη χρήση του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1. Αποφύγετε τα αερολύματα.
	Μόλυνση του ρύγχους της πιπέτας με μη-αποδιατεταγμένο υλικό κατά τη μετάγγιση αποδιατεταγμένου δείγματος στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή GC.	Το βήμα αποδιάταξης της διαδικασίας επεξεργασίας δειγμάτων πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τις παρούσες οδηγίες. Ακατάλληλος στροβιλισμός δειγμάτων, αναστροφή σωλήνων και ανακίνηση μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την ατελή αποδιάταξη μη-ειδικών υβριδίων RNA:DNA, ενδογενών στα τραχηλικά δείγματα. Ειδικότερα κατά τη χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt, τα υβρίδια αυτά είναι πιθανό να υφίστανται στα εσωτερικά τοιχώματα του σωληναρίου μετατροπής δείγματος. Για την αποφυγή πιθανής μετάδοσης αυτού του μη-αποδιατεταγμένου κυτταρικού υλικού, το ρύγχος της πιπέτας δεν πρέπει να αγγίζει τα τοιχώματα του σωληναρίου μετατροπής δείγματος κατά τη μεταφορά του αποδιατεταγμένου δείγματος στο μικροσωλήνα ή στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή GC.
	Σκουπίζετε αρκετές σειρές χρησιμοποιώντας την ίδια επιφάνεια από τα μαντιλάκια Kimtowels Wipers.	Μην σκουπίζετε χρησιμοποιώντας πολλές φορές την ίδια επιφάνεια από τα μαντηλάκια Kimtowels Wipers.
Ψευδώς θετικά αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από γνωστά αρνητικά δείγματα.	Μολυσμένο Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2.	Προσέχετε ώστε να μην δημιουργούνται διασταυρούμενες μολύνσεις μεταξύ των δειγμάτων κατά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 μεταξύ των δειγμάτων. Εάν χρησιμοποιείτε μόνο ένα τμήμα του κιτ, δημιουργήστε κλάσμα του όγκου που απαιτείται για τη συγκεκριμένη δοκιμασία σε ένα καθαρό αναλώσιμο δοχείο φύλαξης αντιδραστηρίων πριν γεμίσετε την πιπέτα.
	Μόλυνση πηγαδιών μικροπλακιδίου με Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.	Ξεπλύνετε τα μικροπηγαδάκια 6 φορές σχολαστικά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης, προκαλώντας κάθε φορά υπερχειλίση ή χρησιμοποιώντας το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων. Μετά την έκπλυση δεν πρέπει να υπάρχουν εμφανή υπολείμματα ροζ υγρού στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου.
	Μόλυνση του ρύγχους της πιπέτας με μη-αποδιατεταγμένο υλικό κατά τη μετάγγιση αποδιατεταγμένου δείγματος στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή GC.	Το βήμα αποδιάταξης της διαδικασίας επεξεργασίας δειγμάτων πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τις παρούσες οδηγίες. Ακατάλληλος στροβιλισμός δειγμάτων, αναστροφή σωλήνων και ανακίνηση μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την ατελή αποδιάταξη μη-ειδικών υβριδίων RNA:DNA, ενδογενών στα τραχηλικά δείγματα. Ειδικότερα κατά τη χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt, τα υβρίδια αυτά είναι πιθανό να υφίστανται στα εσωτερικά τοιχώματα του σωληναρίου μετατροπής δείγματος. Για την αποφυγή πιθανής μετάδοσης αυτού του μη-αποδιατεταγμένου κυτταρικού υλικού, το ρύγχος της πιπέτας δεν πρέπει να αγγίζει τα τοιχώματα του σωληναρίου μετατροπής δείγματος κατά τη μεταφορά του αποδιατεταγμένου δείγματος στο μικροσωλήνα ή στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή GC.

Δοκιμασία *digene* HC2 GC-ID DNA

ΣΥΜΠΤΩΜΑ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΙΤΙΕΣ	ΛΥΣΕΙΣ
	Ανεπαρκής παρασκευή δείγματος.	Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο Αντιδραστήριου αποδιάταξης και αναμείξτε καλά με στροβιλισμό. Για να αποφύγετε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, βεβαιωθείτε ότι το υγρό ξεπλένει ολόκληρη την εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου δημιουργώντας στροβιλισμό με τη μέθοδο Multi- Specimen Tube Vortexer 2 για τουλάχιστον 5 δευτερόλεπτα (για τη χειροκίνητη μέθοδο στροβιλισμού, αναστρέψτε το σωλήνα μία φορά). Πρέπει να παρατηρηθεί μια εμφανής χρωματική αλλαγή από διαυγές σε σκούρο μοβ χρώμα. Επώαστε για 45 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία 65 ± 2°C. Ιδιαίτερως, κατά τη χρήση δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt, αυτά τα υβρίδια είναι πιθανό να απαντώνται στα εσωτερικά τοιχώματα του σωλήνα μετατροπής δείγματος. Για την αποφυγή πιθανής μετάδοσης αυτού του μη-αποδιατεταγμένου κυτταρικού υλικού, το ρύγχος της πιπέτας δεν πρέπει να αγγίζει τα τοιχώματα του σωληναρίου μετατροπής δείγματος κατά τη μεταφορά του αποδιατεταγμένου δείγματος στο μικροσωλήνα ή στο πηγαδάκι του μικροπλακιδίου που χρησιμοποιείται για τον υβριδισμό του ανιχνευτή GC. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης του προϊόντος <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.
	Ακατάλληλες συνθήκες έκπτυσης.	Πλύνετε τα μικροπηγαδάκια 6 φορές σχολαστικά με το Ρυθμιστικό διάλυμα έκπτυσης, προκαλώντας κάθε φορά υπερχείλιση ή χρησιμοποιώντας το Σύστημα Αυτοματοποιημένης Έκπτυσης Μικροπλακιδίων και τα κατάλληλα πρωτόκολλα για το σύστημα αυτό.
Αυξημένες τιμές RLU του Αρνητικού βαθμονομητή (>150 RLU). Το υπόλοιπο της δοκιμασίας εκτελείται κανονικά.	Το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 επώαστηκε σε θερμοκρασία υψηλότερη των 20-25°C.	Η δοκιμασία δεν είναι έγκυρη εξαιτίας υψηλών τιμών του αρνητικού βαθμονομητή. Εκτελέστε τη δοκιμασία εκ νέου και βεβαιωθείτε ότι κατά τα στάδια της δέσμησης και ανίχνευσης η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 20-25°C.
	Το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 επώαστηκε για χρονική διάρκεια μεγαλύτερη των 30 λεπτών.	Διαβάστε το μικροπλακίδιο μετά από 15 λεπτά επώασης (και όχι πέραν των 30 λεπτών επώασης) σε θερμοκρασία 20-25°C.
	Το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 ή το ρυθμιστικό διάλυμα έκπτυσης μολύνθηκε με αλκαλική φωσφατάση ή με Αντιδραστήριο ανίχνευσης 1.	Ανατρέξτε στον Έλεγχο Μόλυνσης στην παρούσα ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Αντιδραστήριο υπό αξιολόγηση	Διαδικασία ελέγχου μόλυνσης	Ερμηνεία αποτελεσμάτων
Σημείωση: Προσέξτε να αποφύγετε τη μόλυνση όταν μεταφέρετε με πιπέτα το Αντιδραστήριο Ανίχνευσης 2. Φοράτε γάντια και αποφύγετε να αγγίξετε τα ρύγχη των πιπετών σε οποιαδήποτε επιφάνεια εργασίας.		
Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2	<ul style="list-style-type: none"> Μεταφέρετε 75 μl του υπολειμματικού κλάσματος ή/και από το αρχικό φιαλίδιο του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε ένα κενό πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμησης. Επώαστε στους 20-25°C επί 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως. Διαβάστε τα πηγαδάκια της μικροπλάκας στο λουμινόμετρο. 	<ul style="list-style-type: none"> Ο έλεγχος του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 πρέπει να είναι < 50 RLU. Αν οι τιμές του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 είναι < 50 RLU το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επανάληψη της δοκιμασίας.

	<p>Σημείωση: Ο έλεγχος του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 εις τριπλούν παρέχει βέλτιστη αξιολόγηση της απόδοσης.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Αν υπάρχει μόλυνση (>50 RLUs), λάβετε ένα καινούργιο kit και επαναλάβετε τη δοκιμασία.
<p>Συσκευή έκπλυσης ή/και Πηγή νερού</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε με πιπέττα 75 μl Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε 4 διαφορετικά πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης. • Σημειώστε τα πηγαδάκια 1-4. • Το πηγαδάκι 1 χρησιμεύει ως μάρτυρας για του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2. • Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης από τον υδροβολέα στο πηγαδάκι 2. • Αφήστε το ρυθμιστικό έκπλυσης να κυλήσει μέσα στους σωλήνες έκπλυσης. • Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης από το σωλήνα στο πηγαδάκι 3. • Λάβετε ένα κλάσμα νερού που χρησιμοποιήθηκε για προετοιμασία του Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης. Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl νερού στο πηγαδάκι 4. • Επώαστε στους 20-25°C επί 15 λεπτά. Αποφύγετε την έκθεση στο άμεσο ηλιακό φως. • Διαβάστε τα πηγαδάκια της μικροπλάκας στο λουμινόμετρο. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ο έλεγχος του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1) πρέπει να είναι < 50 RLUs. • Συγκρίνετε την τιμή RLU από τα πηγαδάκια 2, 3 και 4 με την τιμή έλεγχου RLU για το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1). Καθεμία από τις τιμές RLU για τα πηγαδάκια 2, 3 και 4 δεν πρέπει να υπερβαίνουν τις 50 RLUs της τιμής ελέγχου για το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1). • Τιμές που υπερβαίνουν τα 50 RLUs του ελέγχου του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 δείχνουν μόλυνση. Για οδηγίες σχετικά με τον καθαρισμό και τη συντήρηση της Συσκευής Έκπλυσης ανατρέξτε στην ενότητα Παρασκευή Αντιδραστήριου.
<p>Σύστημα αυτοματοποιημένης έκπλυσης</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Μεταφέρετε με πιπέττα 75 μl Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 σε 5 διαφορετικά πηγαδάκια του μικροπλακιδίου δέσμευσης. • Σημειώστε τα πηγαδάκια 1-5. • Το πηγαδάκι 1 χρησιμεύει ως μάρτυρας για του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2. • Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης από τον υδροβολέα του μικροπλακιδίου με τη σήμανση <i>Πλύση</i> στο πηγαδάκι 2. • Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl του υγρού έκπλυσης από τον υδροβολέα του μικροπλακιδίου με τη σήμανση <i>Έκπλυση</i> στο πηγαδάκι 3. • Πιέστε το πλήκτρο Prime στο πληκτρολόγιο του συστήματος αυτοματοποιημένης έκπλυσης για να επιτρέψετε στο Ρυθμιστικό Διάλυμα να κυλήσει μέσα στους σωλήνες. • Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης από τη δεξαμενή στο πηγαδάκι 4. • Πιέστε το πλήκτρο Prime στο πληκτρολόγιο του συστήματος αυτοματοποιημένης έκπλυσης μικροπλάκας, για να επιτρέψετε στο υγρό έκπλυσης να κυλήσει μέσα στους σωλήνες. • Μεταφέρετε με πιπέττα 10 μl Ρυθμιστικού Διαλύματος Έκπλυσης από τη δεξαμενή στο πηγαδάκι 5. • Καλύψτε και επώαστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 20 - 25°C. Αποφύγετε την έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως. • Διαβάστε τα πηγαδάκια της μικροπλάκας στο λουμινόμετρο. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ο έλεγχος του Αντιδραστήριου ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1) πρέπει να είναι < 50 RLUs. • Συγκρίνετε την τιμή RLU από το πηγαδάκι 3, 4 και 5 με την τιμή έλεγχου RLU για το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1). Καθεμία από τις τιμές RLU για τα πηγαδάκια 2, 3, 4 και 5 δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 50 RLUs της τιμής ελέγχου για το Αντιδραστήριο ανίχνευσης 2 (πηγαδάκι 1). • Τιμές που υπερβαίνουν τις 50 RLUs του ελέγχου DR2 δείχνουν μόλυνση του συστήματος έκπλυσης μικροπλακιδίων. • Βλ. Διαδικασία απολύμανσης στο <i>Εγχειρίδιο χρήσης του Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων</i>.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ QIAGEN

Χρησιμοποιήστε τη σελίδα με τις πληροφορίες επικοινωνίας που σας παρέχεται με αυτό το προϊόν για να επικοινωνήσετε με τον αντιπρόσωπο της QIAGEN της περιοχής σας.

Τα QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] και Rapid Capture[®] είναι σήματα κατατεθέντα της QIAGEN.

Η τεχνολογία Hybrid Capture καλύπτεται από το Ευρωπαϊκό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας No. 0 667 918 το οποίο είναι καταχωρημένο στις εξής χώρες: Αυστρία, Βέλγιο, Ελβετία, Λιχτενστάιν, Γερμανία, Δανία, Ισπανία, Γαλλία, Μ. Βρετανία, Ελλάδα, Ιρλανδία, Ιταλία, Λουξεμβούργο, Ολλανδία και Σουηδία.

Αριθμοί ευρεσιτεχνίας Hybrid Capture στις ΗΠΑ: 6,228,578B1

Αναγνώριση εμπορικών σημάτων:

ThinPrep[®] και PreservCyt[®]: Hologic Corporation

Kimtowels[®]: Kimberly-Clark Corporation

Eppendorf[®] και Repeater[®]: Eppendorf-Netheler-Hinz

CDP-Star[®]: Tropix, Inc.

Parafilm[®]: American Can Co.

DuraSeal[®]: Diversified Biotech, Inc.

Sarstedt[®]: SARSTEDT AG & Co.

pGEM[®]: Promega Corporation

VWR[®]: VWR International, Inc.

Corning[®]: Corning, Inc.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ *digene* HC2 GC-ID DNA

Σημαντικό: Είναι σημαντικό να είστε πλήρως εξοικειωμένοι με τη λεπτομερή διαδικασία για να χρησιμοποιήσετε αυτή τη σύνοψη.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ			
Αποδιάταξη (Για τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt, ανατρέξτε στη Διαδικασία Παρασκευής δειγμάτων σε διάλυμα PreservCyt)	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Μέθοδος στροβιλισμού με το χέρι</p> <p style="text-align: center;">Δημιουργήστε τη διάταξη πλακιδίων Επικολλήστε ετικέτα στο Μικροπλακίδιο Υβριδισμού. Παρασκευάστε Αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε Αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα.</p> <p>Στροβιλίστε κάθε δείγμα, βαθμονομητή και ποιοτικό έλεγχο μεμονωμένα για 5 δευτερόλεπτα σε μεγάλη ταχύτητα και αναστρέψτε τα (για λεπτομέρειες ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτή GC.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓</p> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Μέθοδος Vortexer 2 για Σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων</p> <p style="text-align: center;">Δημιουργήστε τη διάταξη πλακιδίων Επικολλήστε ετικέτα στο Μικροπλακίδιο Υβριδισμού. Παρασκευάστε Αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε Αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Καλύψτε το στατώ με μεμβράνη και καπάκι.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα με τη μέγιστη ταχύτητα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτή GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> </td> </tr> </table>	<p style="text-align: center;">Μέθοδος στροβιλισμού με το χέρι</p> <p style="text-align: center;">Δημιουργήστε τη διάταξη πλακιδίων Επικολλήστε ετικέτα στο Μικροπλακίδιο Υβριδισμού. Παρασκευάστε Αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε Αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα.</p> <p>Στροβιλίστε κάθε δείγμα, βαθμονομητή και ποιοτικό έλεγχο μεμονωμένα για 5 δευτερόλεπτα σε μεγάλη ταχύτητα και αναστρέψτε τα (για λεπτομέρειες ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτή GC.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓</p>	<p style="text-align: center;">Μέθοδος Vortexer 2 για Σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων</p> <p style="text-align: center;">Δημιουργήστε τη διάταξη πλακιδίων Επικολλήστε ετικέτα στο Μικροπλακίδιο Υβριδισμού. Παρασκευάστε Αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε Αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Καλύψτε το στατώ με μεμβράνη και καπάκι.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα με τη μέγιστη ταχύτητα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτή GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p style="text-align: center;">Μέθοδος στροβιλισμού με το χέρι</p> <p style="text-align: center;">Δημιουργήστε τη διάταξη πλακιδίων Επικολλήστε ετικέτα στο Μικροπλακίδιο Υβριδισμού. Παρασκευάστε Αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε Αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα.</p> <p>Στροβιλίστε κάθε δείγμα, βαθμονομητή και ποιοτικό έλεγχο μεμονωμένα για 5 δευτερόλεπτα σε μεγάλη ταχύτητα και αναστρέψτε τα (για λεπτομέρειες ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτή GC.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓</p>	<p style="text-align: center;">Μέθοδος Vortexer 2 για Σωλήνες πολλαπλών δειγμάτων</p> <p style="text-align: center;">Δημιουργήστε τη διάταξη πλακιδίων Επικολλήστε ετικέτα στο Μικροπλακίδιο Υβριδισμού. Παρασκευάστε Αντιδραστήριο αποδιάταξης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε Αντιδραστήριο αποδιάταξης (ο όγκος πρέπει να ισούται με το μισό του όγκου του δείγματος) σε βαθμονομητές, ποιοτικούς ελέγχους και δείγματα.</p> <p>Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν μοβ χρώμα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Καλύψτε το στατώ με μεμβράνη και καπάκι.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα με τη μέγιστη ταχύτητα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 45 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Παρασκευάστε μείγμα ανιχνευτή GC.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
Υβριδισμός	<p style="text-align: center;">Αναμειξτε καλά τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε αποδιάταξη και μεταφέρετε 75 μl του δείγματος, Βαθμονομητή ή Ποιοτικού ελέγχου στα πηγαδάκια του μικροπλακιδίου.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Επώαστε για 10 λεπτά στους 20-25°C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Μεταφέρετε με πιπέττα 25 μl μείγματος ανιχνευτών GC στα πηγαδάκια του Μικροπλακιδίου.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Καλύψτε τα μικροσωλήνες με το κάλυμμα μικροπλακιδίου και ανακινήστε με τον Περιστροφικό Ανακινήτηρα I στη θέση 1100 ±100 rpm για 3 ±2 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι όλοι οι σωλήνες παρουσιάζουν κίτρινο χρώμα. (Τα δείγματα σε διάλυμα PreservCyt θα αποκτήσουν ροζ χρώμα.)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Επώαστε σε θερμοκρασία 65 ±2°C για 60 ±5 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Ετοιμάστε το μικροπλακίδιο δέσμησης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
Δέσμηση υβριδίου	<p>Μεταφέρετε τα περιεχόμενα από κάθε Πηγαδάκι πλακιδίου υβριδισμού ή μικροσωλήνα στο αντίστοιχο πηγαδάκι στο μικροπλακίδιο δέσμησης χρησιμοποιώντας μια 8-κάναλη πιπέττα.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Καλύψτε με ένα καπάκι ή κάλυμμα μικροπλακιδίου.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Ανακινήστε στη θέση 1100 ±100 rpm σε θερμοκρασία 20-25°C για 60 ±5 λεπτά. Παρασκευάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Μεταφέρετε και στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμησης (για λεπτομέρειες ανατρέξτε σε αυτές τις οδηγίες χρήσης).</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
ανιχνευση υβριδίου	<p>Μεταφέρετε με πιπέττα 75 μl Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 1 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμησης. Καλύψτε το Μικροπλακίδιο Δέσμησης με Καπάκι Μικροπλακιδίου, Parafilm ή αντίστοιχο υλικό. Επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 30-45 λεπτά. Πλύνετε το μικροπλακίδιο με τη μέθοδο που επιθυμείτε.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
έκπλυση	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Μέθοδος έκπλυσης με το χέρι:</p> <p>Στραγγίστε και στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμησης (δείτε το ένθετο της συσκευασίας για λεπτομέρειες).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Πλύνετε 6 φορές.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Στυπώστε σε χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι</p> <p style="text-align: center;">↓</p> </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Μέθοδος Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων</p> <p>Τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στη συσκευή έκπλυσης και πατήστε "START/STOP" για να ξεκινήσει η διαδικασία.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓</p> </td> </tr> </table>	<p style="text-align: center;">Μέθοδος έκπλυσης με το χέρι:</p> <p>Στραγγίστε και στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμησης (δείτε το ένθετο της συσκευασίας για λεπτομέρειες).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Πλύνετε 6 φορές.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Στυπώστε σε χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Μέθοδος Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων</p> <p>Τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στη συσκευή έκπλυσης και πατήστε "START/STOP" για να ξεκινήσει η διαδικασία.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓</p>
<p style="text-align: center;">Μέθοδος έκπλυσης με το χέρι:</p> <p>Στραγγίστε και στυπώστε το μικροπλακίδιο δέσμησης (δείτε το ένθετο της συσκευασίας για λεπτομέρειες).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Πλύνετε 6 φορές.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Στυπώστε σε χαρτομάντιλα με ελάχιστο χνούδι</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Μέθοδος Συστήματος Αυτοματοποιημένης Έκπλυσης Μικροπλακιδίων</p> <p>Τοποθετήστε το μικροπλακίδιο στη συσκευή έκπλυσης και πατήστε "START/STOP" για να ξεκινήσει η διαδικασία.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓</p>		
Ενίσχυση σήματος	<p>Μεταφέρετε με πιπέττα 75 μl Αντιδραστηρίου ανίχνευσης 2 σε κάθε πηγαδάκι του μικροπλακιδίου δέσμησης. Καλύψτε με ένα καπάκι πλακιδίου. Επώαστε σε θερμοκρασία 20-25°C για 15-30 λεπτά.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>		
Ανάγνωση	<p style="text-align: center;">Διαβάστε τις ενδείξεις του μικροπλακιδίου δέσμησης ²⁵ σε λουμινόμετρο εγκεκριμένο από την QIAGEN.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Επαληθεύστε τη δοκιμασία και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα των δειγμάτων.</p>		