



Hybrid Capture<sup>®</sup> 2

CT-ID DNA Test

Käyttöohjeet

## **digene<sup>®</sup> HC2 CT-ID DNA Test**

Kemiluminesenssikuoppalevyllä suoritettava signaalin vahvistava *in vitro* - nukleinihappohybridisaatiomääritys *Chlamydia trachomatis* (CT) DNA:n kvalitatiiviseksi osoittamiseksi kohdunkaulanäytteistä.

Käytettäväksi yhdessä seuraavien kanssa:

*digene<sup>®</sup>* HC2 DNA -näytteenotin  
*digene<sup>®</sup>* Female Swab Specimen Collection Kit  
Hologic PreservCyt<sup>®</sup> -liuos

### **TÄRKEIMMÄT MUUTOKSET EDELLISEEN PAKKAUSSELOSTEESEEN**

1. Päivitetty tuotenimi.
2. Päivitetty CE-rekisteröintinumero
3. Poistettu refleksikoeviitteet ja tiedot.

Vain koulutetun ja laillistetun laboratoriohenkilöstön ammattikäyttöön. Ohjeet luettava huolellisesti ennen kokeen käyttöä.



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



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Str. 1  
D-40724 Hilden  
Germany



CE-merkintä on osoitus siitä, että *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe täyttää *in vitro* diagnostiseen käyttöön tarkoitettuja lääkinnällisiä laitteita (98/79/EY) koskevan eurooppalaisen direktiivin asettamat vaatimukset.

IVD



96

REF 5135-1330

©2011 QIAGEN.

L2171FI Rev. 3

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>NIMI JA KÄYTTÖTARKOITUS</b> .....	<b>1</b>
<b>TIIVISTELMÄ JA SELITYKSET</b> .....	<b>1</b>
<b>MENETELMÄN PERIAATE</b> .....	<b>2</b>
<b>PAKKAUKSEEN SISÄLTÄVÄT REAGENSIT JA MATERIAALIT</b> .....	<b>3</b>
<b>TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY PAKKAUKSEEN</b> .....	<b>4</b>
<b>VAROITUKSET JA VAROTOIMET</b> .....	<b>5</b>
TURVALLISUUSTOIMENPITEET .....	5
TIETOJA TURVALLISUUTEEN JA TERVEYTEEN LIITTYVISTÄ VAAROISTA .....	6
KÄSITTELYÄ KOSKEVAT VAROTOIMET .....	7
<b>REAGENSIIEN VALMISTUS JA SÄILYTYS</b> .....	<b>8</b>
<b>NÄYTTEIDEN OTTO JA KÄSITTELY</b> .....	<b>10</b>
KOHDUNKAULANÄYTTEET digene NÄYTTEENKULJETUSAINEESSA (STM) .....	10
HOLOGIC PRESERVCYT -LIUOKSESSA OLEVAT KOHDUNKAULANÄYTTEET .....	10
<b>KOEMENETELMÄ</b> .....	<b>11</b>
RAPID CAPTURE SYSTEM -JÄRJESTELMÄN KÄYTTÖ LUKUISIEN NÄYTTEIDEN TEHOTESTAAMISESSA .....	11
MANUAALINEN MENETELMÄ.....	11
DENATURAATIO.....	12
Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja STM-näytteiden valmistusmenetelmä .....	12
Preservcyt-liuosnäytteiden valmistusmenetelmä .....	14
Valiitoehtoinen pysähtymiskohta .....	17
HYBRIDISAATIO .....	17
HYBRIDINSIEPPAUS .....	18
HYBRIDIN DETEKOINTI .....	19
PESEMINEN.....	19
SIGNAALIN VAHVISTUS .....	21
<b>ANALYYSIN KALIBROINNIN VERIFIOINTIKRITEERIT</b> .....	<b>21</b>
<b>RAJA-ARVON LASKENTA</b> .....	<b>23</b>
<b>LAADUNTARKKAILU</b> .....	<b>23</b>
<b>NÄYTTEIDEN TULOSTEN TULKINTA</b> .....	<b>24</b>
<b>MENETELMÄN RAJOITUKSET</b> .....	<b>24</b>
<b>ODOTETTAVISSA OLEVAT TULOKSET</b> .....	<b>25</b>
ESIINTYVYYS .....	25
POSITIIVISET JA NEGATIIVISET PREDIKTIIVISET ARVOT .....	26
FREKVENSIIJAKAUMA: digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOKEEN RLU/CO-TULOKSET .....	26
<b>SUORITUKSEN OMINAISPIIRTEET</b> .....	<b>27</b>
KLIINISEN KOKEEN NÄYTEKOHTAISET TULOKSET .....	27
TOISTETTAVUUS .....	30
TARKKUUS .....	32
PreservCyt-liuosnäytteiden muita tarkkuus .....	33
ANALYYTTINEN HERKKYYS .....	34
PreservCyt-liuosnäytteiden muita tietoja .....	35
ANALYYTTINEN SPESIFISYYS.....	36
VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS STM-NÄYTTEISIIN .....	38
VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS PRESERVCYT-LIUOKSESSA OLEVIIN NÄYTTEISIIN .....	38
digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOKEEN TARKKUUS CO-RAJA-ARVOLLA STM- NÄYTTEENKULJETUSAINEESEEN KERÄTTYJEN KLIINISTEN NÄYTTEIDEN ANALYSOINNISSA .....	39
HISTORIATIETOA .....	40
STM- JA PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VASTAAVUUSTIEDOT .....	41

<b>KIRJALLISUUS</b> .....	<b>42</b>
<b>VIANETSINTÄOPAS</b> .....	<b>44</b>
KONTAMINAATIOTARKISTUS .....	48
<b>QIAGEN YHTEYSTIEDOT</b> .....	<b>49</b>
<b>digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOEEN YHTEENVETO</b> .....	<b>50</b>

## NIMI JA KÄYTTÖTARKOITUS

*digene*<sup>®</sup> Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (HC2) CT-ID DNA -koe on kemiluminesenssillä suoritettava signaalin vahvistava *in vitro* -nukleiinihappohybridisaatiomääritys *Chlamydia trachomatis* (CT) DNA:n kvalitatiiviseksi osoittamiseksi kohdunkaulanäytteistä, jotka on kerätty *digene* HC2 DNA -näytteenottimella [joka koostuu kohdunkaulaharjasta ja *digene* Specimen Transport Medium (STM) näytteenkuljetusaineesta] ja *digene* Female Swab Specimen Collection -välinepakkauksella (vanutoppo ja STM) tai näytteistä, jotka on kerätty harjaisella keräyslaitteella ja asetettu Hologic PreservCyt<sup>®</sup> -liuokseen. *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe on tarkoitettu käytettäväksi alustavaksi kokeena, jolla identifioidaan symptomaattiset tai ei-symptomaattiset naiset, joilla on *Chlamydia trachomatis* -infektio.

Kun tavoitteena on suurien näytemäärien tehotestaus, *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe voidaan suorittaa Rapid Capture<sup>®</sup> System (RCS) -järjestelmällä.

*In vitro* diagnostiseen käyttöön

IVD

## TIIVISTELMÄ JA SELITYKSET

Chlamydia-bakteerit ovat gramnegatiivisia organismeja. Niillä on 2-vaiheinen elämänsykli, joka koostuu morfologisesti selvästi erottuvista infekti- ja reproduktiomuodoista.<sup>1</sup> *Chlamydia trachomatis* -genomi on suhteellisen pieni, kooltaan n.  $1 \times 10^6$  emäsparia.<sup>2</sup> Infektiomuoto on alkeellinen muoto, joka ei pysty jakaantumaan ja toimii pelkästään infektiota siirtäjänä solusta toiseen. Päästyään isäntäsolun sisälle, nämä alkeelliset muodot kerääntyvät kalvon sitomiiniin vakuoleihin tuottamaan metabolisesti aktiivisia klamydiaalisia reproduktiomuotoja, tai retikulaarisia muotoja. Replikaatio on täysin isännän ATP:sta riippuvainen tapahtuma<sup>3</sup> ja se tapahtuu binaarisena fissiona refraktiilien sytoplastisten sulkeumien sisällä, josta tuloksena on uusi alkeismuotosukupolvi, joka vapautuu infektoimaan muita soluja. Chlamydia-bakteereille on myös ominaista kalvoon kiinnittyvä, sukupuolinen lipopolysakkaridi, joka on toiminut lähdeantigeeninä diagnostisten vasta-aineiden tuottamisessa.

Perinteisiin menetelmiin *Chlamydia trachomatis* detekoimiseksi suoraan kliinisistä näytteistä kuuluvat organismin jodi- ja Giemsa-väriä ja siihen liittyvä mikroskooppinen arviointi<sup>4</sup> tai herkkyydeltään parempi suoraan fluorisoivan vasta-aineväriäyksen käyttö (DFA).<sup>5</sup> Näillä menetelmillä päästään kuitenkin vain 70-85 %:n herkkyteen verrattuna optimaalisilla soluviljelytekniikoilla saataviin tuloksiin.<sup>6</sup> Laajimmin hyväksytty menetelmä Chlamydian detekointiin on ns. McCoy-solujen infektointi soluviljelyssä. Tällöin fluoresoivilla yhdistettyjä vasta-aineita käytetään detektoimaan intrasytoplasmisia sulkeumakappaleita, joita infektoitujen solujen reproduktiiviset ainekset tuottavat.<sup>7</sup> Optimaalisella soluviljelyllä on erinomainen herkkyys ja spesifisyys näiden organismien detekoinnissa, mutta menetelmä on monivaiheinen, kallis ja aikaa vievä menetelmä. Tuloksia ei yleensä saada ennen kuin 48-72 tunnin kuluttua inokulaatiosta.<sup>8</sup> Myös entsyymeihin perustuvia immunomäärityksiä tehdään Chlamydia-vasta-aineiden detekoimiseksi<sup>6</sup> ja niiden on havaittu olevan hieman herkempiä ja hieman vähemmän spesifisiä kuin suorat fluoresoiviin vasta-aineisiin perustuvat menetelmät.<sup>9</sup> Nukleiinihappokokeet ovat myös käytössä detektoitaessa Chlamydia-kohteita, mm. kromosomialinen DNA, mRNA sekä pääosalle *Chlamydia trachomatis* -kannoista yleinen kryptinen plasmidi. Nämä menetelmät eroavat toisistaan herkkyydeltään ja spesifisyydeltään, mutta yleensä niiden suoritus lähentelee viljelymenetelmien suoritusta tai ylittää sen.<sup>10-12</sup>

## MENETELMÄN PERIAATE

*digene* Hybrid Capture 2 -teknologiaan perustuva *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe on signaalin vahvistava, kuoppalevykemiluminesenssidetekointia hyödyntävä nukleiinihappo-hybridisaatiomääritys. Kohde-DNA:ta sisältävät näytteet hybridisoituvat spesifiin Chlamydia RNA -koettimeen. Näin syntyneet RNA:DNA-hybridit siepataan huolellisesti RNA:DNA-hybridispesifeillä vasta-aineilla sivellylle mikrokuoppalevyille. Seuraavaksi annetaan immobilisoituneiden hybridien reagoitua alkaliseen fosfataasiin konjugoituihin, RNA:DNA-hybridispesifisiin vasta-aineisiin ja ne detekoidaan kemiluminesenssisubstraattilla. Kuhunkin vasta-aineeseen konjugoituu useita alkaalifosfataasimolekyylejä. Konjugoidut vasta-aineet sitoutuvat multippeleina kuhunkin siepattuun hybridiin ja saavat aikaan huomattavan signaalin vahvistumisen. Kun sitoutunut alkalinen fosfataasi pilkkoo substraattia, syntyy valoa, jota mitataan suhteellisina valoyksikköinä (RLU) luminometrillä. Syntyvän valon voimakkuus ilmaisee, sisältääkö näyte kohde-DNA:ta vai ei.

Mittauksessa saatu RLU, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin määrätty suhdeluku positiiviseen raja-arvoon (Cutoff, CO), osoittaa näytteen Chlamydia DNA:n. Määrättyä CO-suhdetta pienempi RLU-tulos osoittaa, että näytteessä ei ole Chlamydia DNA:ta tai että ko. DNA-tasot jäävät alle analyysin detekointirajan.

CT-koetin sisältää koetinsekoituksen, joka on nimenomaan valittu eliminoimaan tai minimoimaan ristiin reagoinnin sellaisten DNA-sekvenssien kanssa, jotka ovat peräisin ihmissoluista, muista bakteerilajeista, tai muista Chlamydia-lajeista kuin *Chlamydia trachomatis*. *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen mukana toimitettu CT-koetin on komplementaarinen n. 39 300 bp:n (4 %) Chlamydian genomiseen DNA:han nähden ( $1 \times 10^6$  bp).<sup>3</sup> Yksi koetin on komplementaarinen 100 %:iin 7 500 bp:n kryptiseen plasmidiin nähden.

Lukuisien näytteiden tehotestaaminen *digene* HC2 CT-ID DNA Test -menetelmällä voidaan suorittaa käyttämällä yleisesti käytössä olevaa automatisoitua pipetointi- ja laimennusmenetelmää, josta käytetään nimeä Rapid Capture System (RCS). Kyseinen instrumentti, jonka käyttöön liittyy *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeelle ominainen sovellus, pystyy käsittelemään jopa 352 näytettä kahdeksassa tunnissa. Suurien näytemäärien tehokäsittely on mahdollista, kun kaikki määritysvaiheet suoritetaan em. RCS-menetelmää käyttäen. Poikkeuksena ovat kuitenkin näytteiden denaturointi, kemiluminesenssisignaalin detekointi ja tulosten raportointi.

## PAKKAUKSEEN SISÄLTÄVÄT REAGENSIT JA MATERIAALIT

Yksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koepakkaus sisältää 96 koetta (REF 5135-1330). Potilastulosten määrä vaihtelee pakkauksen käyttömäärästä riippuen:

- 1 käyttö = 88 potilastulosta
- 2 käyttöä = 80 potilastulosta
- 3 käyttöä = 72 potilastulosta
- 4 käyttöä = 64 potilastulosta

<b>Osoitinväri</b> INDIC Sisältää 0,05 % w/v (paino-tilavuussuhde) natriumatsidia.	1 x 0,35 ml
<b>Denaturointireagenssi*</b> REAG DENAT Laimennettu natriumhydroksidiliuos (NaOH).	1 x 50 ml
<b>Koettimen laimennin*</b> DIL PROBE Puskuroitu 0,05 % w/v natriumatsidia sisältävä liuos.	1 x 5 ml
<b>CT-koetin</b> PROBE CT CT RNA -koetin puskuriliuoksessa.	1 x 200 µl
<b>Negatiivinen kalibraattori (Negative Calibrator – NC)</b> CAL - Kantaja-DNA 0,05 % w/v natriumatsidia sisältävässä näytteenkuljetusaineessa (STM).	1 x 2 ml
<b>CT-positiivinen kalibraattori (Positive Calibrator – PC)</b> CAL CT + 1,0 pg/ml kloonattua CT DNA:ta ja kantaja-DNA:ta 0,05 % w/v natriumatsidia sisältävässä STM:ssa.	1 x 1 ml
<b>Laaduntarkkailu CT (QC CT)</b> QC CT 5,0 pg/ml kloonattua CT DNA:ta ja kantaja-DNA:ta 0,05 % w/v natriumatsidia sisältävässä STM:ssa.	1 x 1 ml
<b>Laaduntarkkailu GC (QC GC)</b> QC GC 5,0 pg/ml kloonattua GC DNA:ta ja kantaja-DNA:ta 0,05 % w/v natriumatsidia sisältävässä STM:ssa.	1 x 1 ml
<b>Sieppauskuoppalevy</b> PLATE CAPTURE Siveltä anti-RNA:DNA-hybridivasta-aineilla.	Kukin 1
<b>Detekointireagenssi 1</b> REAG DET 1 Alkaliseen fosfataasiin konjugoituja RNA:DNA-hybridien vasta-aineita 0,05 % w/v natriumatsidia sisältävässä puskuriliuoksessa.	1 x 12 ml
<b>Detekointireagenssi 2</b> REAG DET 2 CDP-Star® + Emerald II (kemiluminesenssisubstraatti).	1 x 12 ml
<b>Pesupuskuritiiviste*</b> BUF WASH X 30 Sisältää 1,5 % w/v (paino-tilavuussuhde) natriumatsidia.	1 x 100 ml

\* Katso tämän pakkausselosteen kohdasta *Varoitukset ja varotoimenpiteet* tarkemmat terveyttä ja turvallisuutta koskevat tiedot.

# TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY PAKKAUKSEEN

## Hybridinsieppausjärjestelmän *in vitro* diagnostiset laitteet ja tarvikkeet<sup>A</sup>

*digene* Hybrid Capture 2 -järjestelmä ("digene HC2 -järjestelmä"), joka sisältää QIAGENin hyväksymän luminometrin ("luminometri"), QIAGENin hyväksymän tietokoneen sekä tietokoneen oheislaitteet (näyttö, näppäimistö, hiiri, tulostin ja tulostimen kaapeli), *digene* HC2 -järjestelmän ohjelmiston ("digene-analysimääritysohjelmisto"), *digene* HC2 -järjestelmän analyysiprotokollat CT/GC-määritystä varten, LumiCheck Plate -ohjelmiston ja and *digene* HC2 -järjestelmäohjelmiston käyttöohjeet.

Hybrid Capture System Rotary Shaker I -

Hybridinsieppausjärjestelmän tasoravistin I

Hybrid Capture System Microplate Heater I -

Hybridinsieppausjärjestelmän kuoppalevyn lämmitin I

Hybrid Capture System Automated Plate Washer -

Hybridinsieppausjärjestelmän automaattinen kuoppalevypesuri

Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube Vortexer 2, Rack, and Rack Lid (optional)<sup>B</sup> -

Hybridinsieppausjärjestelmän moninäyteputkivortexi 2 (lisävaruste)<sup>B</sup>

Konversioteline ja telineen kansi (lisävaruste manuaaliseen käyttöön: tarvitaan käytettäessä Rapid Capture -järjestelmää *digene* HC2 CT-ID DNA Test- ja PreservCyt-näytteiden kanssa) *digene*-näyteteline ja telineen kansi (lisävaruste manuaaliseen käyttöön: tarvitaan käytettäessä Rapid Capture -järjestelmää *digene* HC2 CT-ID Test- ja *digene* HC2 -näytteiden kanssa, jotka on kerätty *digene* HC2 DNA -näytteenottimella) *digene* HC2 DNA -näytteenotin<sup>D</sup>

*digene* Female Swab Specimen Collection Kit - Hybridinsieppausjärjestelmään sisältyvä naispotilaan vanutupponäytteiden keräilypakkaus (koostuu kahdesta vanutuposta ja *digene* näytteenkuljetusaineesta)<sup>D</sup> Putkentiivisteiden annostelija ja leikkuri (käytetään 2:ssa)

Rapid Capture System - Rapid Capture -järjestelmä (lisävaruste suurten näytelukumäärien tehostaamiseen)<sup>E</sup> Pesulaite

Hybridisaatiokuoppalevyt

Kuoppalevyjen kannet

Tyhjät kuoppalevylusikat (toimittaja Costar, mallinr. 2581); lisävaruste käytettäväksi automaattisen kuoppalevypesurin kanssa

Erikoispitkät pipetinkärjet näytteen siirtämiseen

Näytteenottoputket

Näytteenottoputkiteline

Näytteenottoputkien kierrekorkit

Kertakäyttöiset reagenssialtaat

DuraSeal<sup>®</sup>-putkentiivistekelmä

## Lisälaitteet ja -varusteet PreservCyt -liuosnäytteen prosessointiin

### Yleisiä laboratorioissa käytettäviä laitteita ja varusteita

Riittävän suuri 65±2 °C:n vesihaude, johon mahtuu joko yksi konversioteline (36 x 21 x 9 cm) tai kaksi *digene* näytetelinettä (kukin 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)

Mikrosentrifugi (lisävaruste koetinpullojen sentrifugointiin maksimaalisen koetinlilavuuden saamiseksi)

Astially varustettu vortexi

Yksikanavainen mikropipetti (mikroannostelija); muunneltavat

asetukset 20–200 µl:n ja 200–1000 µl:n tilavuuksille

Sarja-annosteleva täsmämääntäpipetti, kuten esim. Eppendorf

Repeater<sup>®</sup>-pipetti tai vastaava 8-kanavainen pipetti; muunneltavat asetukset 25–200 µl:n tilavuuksille

Ajastin

Natriumhypokloriittiliuosta, 0,5 % lopullinen tilavuus (kotitalouskäyttöön tarkoitettua valkaisuainetta)

Parafilm<sup>®</sup> tai vastaava

Kertakäyttöiset aerosolin estävät pipetinkärjet yksikanavaisen pipettiin (20–200 µl ja 200–1000 µl)

Kertakäyttöiset kärjet Eppendorf Repeater<sup>®</sup>-pipettiin (25 ja 500 µl)

Kertakäyttöiset kärjet 8-kanavaisen pipettiin (25–200 µl)

Kimtowels<sup>®</sup>-pyyhkeet tai vastaavat vähänukkaiset paperipyyhkeet

Kertakäyttöinen pöytäsuojus

Puuterittomat suojakäsineet

5 ml:n ja/tai 15 ml:n painokorkilliset, pyöreäpohjaiset

polypropeeniputket (koettimen laimennukseen)

Korkilliset 2,0 ml:n polypropeeniset mikrosentrifugiputket

Pyörivällä astialla varustettu sentrifugi (Swinging Bucket Centrifuge), jonka suurin nopeus on 2900 ± 150 x g ja johon mahtuu 10 ml:n tai 15 ml:n kartiopohjaisia

polypropeeniputkia

5 ml:n serologiset pipetit tai siirtopipetit

*digene* HC2-näytteenkonversiosarja<sup>A</sup>

Kertakäyttöiset kärjet Eppendorf Repeater -pipettiä varten (50 ja 100 µl)

### Manuaalinen vorteksimenetelmä:

*digene* HC2 -näytteenkonversioputket (15 ml:n kartiopohjaiset putket)<sup>F</sup>, Sarstedt<sup>®</sup>-merkkiset 10 ml:n korkilliset

kartiopohjaiset putket tai VWR<sup>®</sup> - tai Corning<sup>®</sup>-merkkiset 15

ml:n korkilliset kartiopohjaiset polypropeeniputket

Putkiteline, johon mahtuu 10 ml:n tai 15 ml:n kartiopohjaisia

putkia

### Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä:

*digene* HC2 -näytteenkonversioputket (15 ml:n kartiopohjaiset putket)<sup>F</sup>

Moninäyteputkivortexi 2

Konversioteline ja telineen kansi (vain 15 ml:n kartiopohjaisille putkille)

Putkentiivisteiden annostelija ja leikkuri

DuraSeal-putkentiivistekelmä (käytetään MST-vortexi 2:ssa)

<sup>A</sup> QIAGEN toimittaa vain laitteita ja varusteita, jotka on validoitu *digene* HC2 CT-ID DNA -kokeen kanssa käytettäviksi.

<sup>B</sup> Tarvitaan myös silloin, kun suoritetaan puoliautomaattista RCS-sovellusta.

<sup>C</sup> Käyttäjakohtainen varuste. Muita käyttäjän laajennettavissa olevia monikanavapipettejä voidaan käyttää, mikäli kärkiväliksi säädettäessä saadaan 3,2 cm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää yksikanavapipettiä, jonka annostelukapasiteetti on 75 µl.

<sup>D</sup> *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suoritusarvot on määritetty vain tässä mainittuja näytteenottopakkauskäyttöä käyttäen.

<sup>E</sup> Ks. järjestelmän käyttöohjeita Rapid Capture -järjestelmän käyttöopasta, kun ko. järjestelmää käytetään lukuisien näytteiden tehostaamiseen tätä määritysmenetelmää käytettäessä.

<sup>F</sup> QIAGEN toimittamia *digene* HC2-näytteenkonversioputkia (VWR tai Corning<sup>®</sup>) on käytettävä, jotta analyysi sujuu suunnitellusti käytettäessä moninäyteputkivortexi 2 -menetelmää.

## VAROITUKSET JA VAROTOIMET

KAIKKI OHJEET ON LUETTAVA HUOLELLISESTI ENNEN KOKEEN KÄYTTÖÄ.

### TURVALLISUUSTOIMENPITEET

KAIKKIA NÄYTTEITÄ tulisi pitää mahdollisina tartuntalähteinä. Mikään tunnettu testausmenetelmä ei pysty antamaan täyttä varmuutta siitä, että näytteet eivät levittäisi tartuntaa. Ihmisestä peräisin olevia näytteitä suositellaan käsiteltäviksi asianmukaisten kansallisten/alueellisten biologista turvallisuutta koskevien käytäntöjen mukaisesti.<sup>13,14,15,16</sup> Tätä biologista turvallisuutta koskevaa käytäntöä tulee soveltaa materiaaleihin, jotka sisältävät tai joiden epäillään sisältävän tartunnanaiheuttajia. Vähintään seuraavat menettelytavat kuuluvat tällaisiin varotoimiin:

1. Älä pipetoi suun avulla.
2. Älä tupakoi äläkä syö tai juo tiloissa, missä käsitellään reagensseja tai näytteitä.
3. Reagenssien tai näytteiden käsittelyssä on käytettävä kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä. Kokeen suorittamisen jälkeen kädet on pestävä huolellisesti.
4. Kaikki näytteistä peräisin olevat roiskeet tulee puhdistaa ja desinfioida tuberkulosidisella (esim. 0,5 % v/v natriumhypokloriitilla) tai muulla sopivalla desinfiointiaineella.<sup>17,18</sup>
5. Kaikki näytteet, reagenssit ja muut mahdollisesti saastuneet materiaalit tulee dekontaminoida ja hävittää kansallisten ja paikallisten säännösten edellyttämällä tavalla.<sup>19,20</sup>

Jotkut reagenssit sisältävät natriumatsidia. Natriumatsidin on raportoitu muodostavan lyijy- tai kupariatsidia laboratoriotuotoksissa. Koputtaminen, esim. vasarointi, voi aiheuttaa näiden atsidien räjähtämisen. Jotta lyijy- tai kupariatsidia ei pääse muodostumaan, tulee natriumatsidia sisältävien liuosten hävittämisen jälkeen viemärit huuhdella perusteellisesti vedellä. Kontaminaation poistamiseksi vanhoista viemäreistä, joihin atsidia epäillään kertyneen, Yhdysvaltain työsuojeluvirasto NIOSH suosittelee seuraavaa käytäntöä: (1) neste juoksetetaan pois viemäriputkesta kumi- tai muoviletkulla, (2) täytetään 10 %:sella v/v natriumhydroksidiliuoksella, (3) annetaan seistä 16 tunnin ajan ja (4) huuhdellaan pois runsaalla vedellä.



## TIETOJA TURVALLISUUTEEN JA TERVEYTEEN LIITTYVISTÄ VAAROISTA

Alla luetellut materiaalit on vahvistettu Euroopan yhteisön direktiivien 2001/59/EY ja 99/45/EY vaatimusten mukaisesti.



T

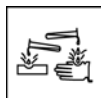
### **Pesupuskurikonsentraatti. Sisältää natriumatsidia: Myrkyllinen (T)**

R25: Myrkyllistä nieltynä.

R52/53: Haitallista vesieliöille, voi aiheuttaa pitkäaikaisia haittavaikutuksia vesiympäristössä.

S36/37/39: Käytettävä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä ja silmien- tai kasvonsuojainta.

S45: Onnettomuuden sattuessa tai tuntiessasi pahoinvointia, hakeudu heti lääkärin hoitoon (näytä lääkärille tätä etikettiä, mikäli mahdollista).



C

### **Denaturointireagenssi. Sisältää natriumhydroksidia: Syövyttävä (C)**

R35: Aiheuttaa vakavia palovammoja.

S26: Roiskeet silmistä on huuhdeltava välittömästi runsaalla vedellä ja hakeuduttava lääkäriin hoitoon.

S36/37/39: Käytettävä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä ja silmien- tai kasvonsuojainta.

S45: Onnettomuuden sattuessa tai tuntiessasi pahoinvointia, hakeudu heti lääkärin hoitoon (näytä lääkärille tätä etikettiä, mikäli mahdollista).



Xi

### **Koettimen laimennin. Sisältää BES ja etikkahappoa: Ärsyttävä (Xi)**

R36/38: Ärsyttää silmiä ja ihoa.

S26: Roiskeet silmistä on huuhdeltava välittömästi runsaalla vedellä ja hakeuduttava lääkäriin hoitoon.

S36/37/39: Käytettävä sopivaa suojavaatetusta, suojakäsineitä ja silmien- tai kasvonsuojainta.

HÄTÄTIETOJÄRJESTELMÄ (24 H)


**HÄTÄTAPAUKSESSA LÄÄKETIETEELLISTÄ ANTAA ENGLANNIKSI, RANSKAKSI JA SAKSAKSI 24 TUNTIA VUOROKAUDESSA:**

**MAINZIN MYRKYTYSTIETOKESKUS SAKSASSA**


**PUHELIN: +49-6131-19240**

**Ks. lisävaroituksia ja varotoimenpiteitä *Rapid Capture* -järjestelmän käyttöoppaasta kun ko. järjestelmää käytetään lukuisien näytteiden tehotestaamiseen tämän määrityksen avulla.**

## KÄSITTELYÄ KOSKEVAT VAROTOIMET

1. *In vitro* diagnostiseen käyttöön.
2. Kohdunkaulaharja, joka on tarkoitettu käytettäväksi vain naisilla, jotka eivät ole raskaana.
3. Reagensseja ei saa käyttää ulkopakkausmerkinnöissä olevan symbolin  viereen merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen.
4. Mikäli määrittäminen tehdään annettujen aika- ja lämpötilarajojen ulkopuolella, saadut tulokset voivat olla epäpäteviä. Ne määrittäykset, jotka eivät tapahdu asetettujen aika- ja lämpötilarajojen sisällä, ovat epäpäteviä ja ne on suoritettava uudelleen.
5. Luotettavien koetulosten saamiseksi tulee *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koemenetelmää, määrittäksen kalibraation verifiointikriteereitä, laaduntarkkailua ja näytetulosten tulkintaa seurata tarkasti.
6. On tärkeää, että reagenssia pipetoidaan täsmälleen osoitettu määrä ja sekoitetaan hyvin jokaisen reagenssilisäyksen jälkeen. Jos näin ei menetellä, kokeista saatavat tulokset voivat olla virheellisiä. Värimuutosten ilmeneminen odotetulla tavalla on varmistus siitä, että nämä ehdot on täytetty.
7. Nämä komponentit on testattu yhtenä kokonaisuutena. Komponentteja **ei saa** vaihtaa muista lähteistä tai toisista eristä peräisin olevien komponenttien kanssa.
8. Nukleiinihapot ovat erittäin herkkiä ympäristön nukleasidegradaatiolle. Nukleaaseja on ihmisen iholla ja ihmisten käsittelemillä pinoilla tai materiaaleilla. Työpinnat tulee puhdistaa ja niille levitetään kertakäyttöinen pöytäsuojus ja **tutkimuksen kaikissa suoritusvaiheissa tulee käyttää puuterittomia suojakäsineitä.**
9. Estä sieppauskuoppalevyn ja detekointireagenssi 2:n kontaminoituminen eksogeenisellä alkalisella fosfataasilla määrittäksen aikana. Aineita, jotka voivat sisältää alkalisia fosfataaseja, ovat detekointireagenssi 1, bakteerit, sylki, hiukset ja ihon öljyt. **On erittäin tärkeää, että sieppauskuoppalevy peitetään pesuvaiheen jälkeen ja detekointireagenssi 2:n inkubointiajaksi, koska eksogeeninen alkalinen fosfataasi voi reagoida detekointireagenssi 2:n kanssa ja antaa vääriä positiivisia tuloksia.**
10. Suojaa detekointireagenssi 2:ta pitkältä altistumiselta suoralle valolle. Reagenssi on käytettävä heti alikvoottien ottamisen jälkeen ja suoraa auringonvaloa tulee välttää.
11. Sarja-annostelija tulee valmistella ennakkoon ennen reagenssin annostusta ja tulee säännöllisin välein tarkistaa, ettei siinä ole suuria ilmakuplia. Haitalliset määrät suuria ilmakuplia sarja-annostelijan kärjessä voivat aiheuttaa epätarkkuutta annostelussa ja tämä voidaan välttää täyttämällä annostelija, tyhjentämällä siitä kaikki neste ja täyttämällä se uudelleen. Ks. tarkat käyttöohjeet annostelijan käyttöohjeista.
12. Detekointireagenssi 1:n ja 2:n annostelussa monikanavapipetointi tulee tehdä käänteispipetointimenetelmällä (ks. *Hybridien detekointi*). Tarkistetaan, että jokainen monikanava-annostelijan pipetinkärki on tiiviisti kiinni ja että se täyttyy asianmukaisesti.
13. Varmista, että kukin mikrokaivo pestään huolellisesti manuaalisen pesumenetelmän ohjeiden mukaisesti. Riittämätön pesu lisää taustaa ja saattaa aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Pesupuskurin jäämät kaivoissa voivat heikentää signaalia tai huonontaa toistettavuutta.
14. Kuoppalevyn lämmitin 1:n annetaan kylmäkäynnistyksen jälkeen tasaantua vähintään 60 minuutin ajan lämpötilaan  $65 \pm 2$  °C. Jos tämä lämpiämisaikavaatimus laiminlyödään, saattaa seurauksena olla hybridisaatiokuoppalevyn sulaminen. Ks. lisätietoja kuoppalevyn lämmitin 1:n käyttöoppaassa.

## REAGENSSIEN VALMISTUS JA SÄILYTYS

1. Vastaanottamisen jälkeen pakkausta säilytetään 2–8 °C:n lämpötilassa. Pesupuskuritiiviste, denaturointireagenssi ja osoitinväri voidaan haluttaessa säilyttää 2–30 °C:n lämpötilassa.
2. Reagensseja ei saa käyttää ulkopakkauksessa olevan symbolin  viereen merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen (ks. jäljempänä).
3. Kaikki reagenssit ovat käyttövalmiita paitsi denaturointireagenssi, CT-koetinseos ja pesupuskuritiiviste.

**Ks. CT-koetinsekoituksen, pesupuskuritiivisteen, detekointireagenssi 1:n ja detekointireagenssi 2:n valmistamiseen liittyviä ohjeita *Rapid Capture -järjestelmän käyttöoppaasta*, sillä ko. ohjeet ovat spesifit lukuisten näytteiden tehostaamiseen käytettävälle järjestelmälle.**

### Reagenssien valmistusmenetelmä

<b>Denaturointi-reagenssi</b>	<p><b>VALMISTA ENSIN:</b></p> <p>Lisää denaturointireagenssipullon viisi tippaa osoitinväriä ja sekoita hyvin. Denaturointireagenssin tulee olla väriltään tasaisen tumman violetti.</p> <p>Valmis denaturointireagenssi pysyy stabiilina kolmen kuukauden ajan säilytettynä 2–8 °C:n lämpötilassa. Varusta uudella viimeinen käyttöpäivä -merkinnällä. Jos väri heikkenee, lisää kolme tippaa osoitinväriä ja sekoita perusteellisesti ennen käyttöä.</p> <p><b>Varoitus:</b> Denaturointireagenssi on syövyttävää. Käytä tarkoituksenmukaista suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Noudata varovaisuutta käsittelyssä.</p>																		
<b>CT-koetinseos (valmistettu CT-koettimen ja koettimen laimentimen reagensseista)</b>	<p><b>VALMISTA NÄYTTEEN DENATUROINTI-INKUBOINNIN AIKANA:</b></p> <p><b>TÄRKEÄÄ: KOETIN TARTTUU JOSKUS PULLON KANTEEN.</b></p> <p><b>Huomautus:</b> Noudata tässä vaiheessa koettimen ja koetinseoksen ribonukleasikontaminaation estämiseksi <b>äärimmäisen suurta huolellisuutta</b>. Käytä koettimen pipetointiin aerosolin estäviä pipetinkärkiä. Koettimen laimennin on tahmeaa. <b>Varmista, että CT-koetinseosta valmistettaessa sekoitus suoritetaan huolellisesti. Sekoittamisvaiheessa tulee nesteeseen muodostua näkyvä pyörre. Riittämätön sekoittaminen voi johtaa heikentyneeseen signaaliin.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sentrifugoi CT-koetinpulloa hetken ajan, jotta neste laskeutuu pullon pohjalle. Napauta putkea kevyesti, jotta neste sekoittuu.</li> <li>• Määritä tarvittava koetinsekoitteen määrä (25 µl/koe). Koetinseosta suositellaan valmistettavan sen verran yli tarpeen, että voidaan korvata se määrä mikä mahdollisesti häviää pipetin kärkiin tai pullon reunoihin. Ks. ehdotetut tilavuudet alla olevasta luettelosta. Suositeltava vähimmäismäärä kaivoja kutakin käyttöä kohti on 24. Jos halutaan käyttää vähemmän kuin 24 kaivoa analyysia kohti, kokeiden kokonaismäärä pakkausta kohden saattaa jäädä pienemmäksi sekä koettimen että koettimen laimentimen riittämättömyyden vuoksi.</li> <li>• Siirrä tarvittava määrä koettimen laimenninta uuteen kertakäyttöiseen astiaan. Kokeiden määrästä riippuen suositellaan joko 5 ml:n tai 15 ml:n painokorkillisia, pyöreäpohjaisia polypropeeniputkia. Valmista 1:25 laimennus CT-koetinta koettimen laimentimeen koetinsekoitteen valmistamista varten.</li> </ul> <table data-bbox="438 1585 1356 1795" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;"><u>Kokeiden/liuskojen lkm</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Koettimen laimentimen tilavuus*</u></th> <th style="text-align: right;"><u>Koettimen tilavuus*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">4,0 ml</td> <td style="text-align: right;">160,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> <td style="text-align: right;">120,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">2,0 ml</td> <td style="text-align: right;">80,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">1,0 ml</td> <td style="text-align: right;">40,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Per kaivo</td> <td style="text-align: center;">0,045 ml</td> <td style="text-align: right;">1,9 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Näihin arvoihin sisältyy suositeltu ylimäärä.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetoi koetin koettimen laimentimeen asettamalla pipetin kärki putken sisäseinää vasten aivan kuperan linssin yläpuolelle ja tyhjentämällä sisältö. <b>Kärkeä ei saa upottaa koettimen laimentimeen.</b></li> </ul>	<u>Kokeiden/liuskojen lkm</u>	<u>Koettimen laimentimen tilavuus*</u>	<u>Koettimen tilavuus*</u>	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Per kaivo	0,045 ml	1,9 µl
<u>Kokeiden/liuskojen lkm</u>	<u>Koettimen laimentimen tilavuus*</u>	<u>Koettimen tilavuus*</u>																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
Per kaivo	0,045 ml	1,9 µl																	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vorteksoi vähintään 5 sek maksiminopeudella, jotta sekoittuminen olisi perusteellinen. <b>Tuloksena tulee olla nähtävissä oleva pyörre/vorteksi.</b> Varusta seos nimilapulla "CT-koetinseos" ja säilytä suljetussa astiassa kunnes se käytetään. <b>Käyttämätön koetinseos tulee hävittää.</b></li> </ul>												
<b>Pesupuskuri</b>	<p><b>VALMISTA SIEPPAUSVAIHEESSA:</b>  <b>Automaattisen kuoppalevypesurin</b> pesupuskuri voidaan valmistaa alla kuvatulla tavalla ja säilyttää kannellisessa astiassa, tai se voidaan valmistaa 1 litra kerrallaan ja laittaa se automaattisen kuoppalevypesurin säiliöihin. Ks. alla olevassa taulukossa annettavat seostilavuudet:</p> <p>Ks. Automaattisen kuoppalevypesuri hoito- ja ylläpito-ohjeet laitteen käyttöoppaasta.</p> <p><b>Varoitus:</b> Pesupuskuritiiviste on nieltynä myrkyllistä. Käytetä tarkoituksenmukaista suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Altistumisen minimoimiseksi lisää pesupuskuritiivisteeseen valmistusvaiheessa vettä.</p> <table border="0"> <thead> <tr> <th><u>Pesutiivisteiden määrä</u></th> <th>Tislattun tai deionisoidun <u>veden määrä</u></th> <th>Pesupuskuritiivisteiden <u>lopullinen määrä</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 litra</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1 933,4 ml</td> <td>2 litraa</td> </tr> <tr> <td>100,0 ml</td> <td>2 900,0 ml</td> <td>3 litraa</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Huomautus: On erittäin tärkeää, että automaattinen kuoppalevypesuri pidetään aina päälle kytkettynä. Tällöin kunnossapitohuuhdeltu käynnistyy automaattisesti, kun laitetta ei ole käytetty kahdeksaan tuntiin.</b></p> <p><b>Ennen jokaista analyysia on varmistettava, että laitteen jätesäiliö on tyhjä ja että huuhdelluallas on täytetty tislattulla tai deionoidulla vedellä.</b></p> <p>Ks. laitteen hoitoon ja ylläpitoon liittyviä lisäohjeita Automaattisen kuoppalevypesurin käyttöoppaasta.</p> <p><b>Kuoppalevyn manuaalista pesumenetelmää varten:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sekoita pesupuskuritiiviste huolellisesti.</li> <li>Laimenna 100 ml pesupuskuritiivistettä 2,9 litraan tislattua tai deionoitua vettä ja sekoita hyvin (lopullisen määrän tulee olla 3 litraa).</li> <li>Sulje säiliö tiiviisti kontaminaation ja haihtumisen estämiseksi.</li> </ul> <p>Valmis denaturointireagenssi pysyy stabiilina kolmen kuukauden ajan säilytettynä 2–30 °C:n lämpötilassa. Varusta uudella viimeinen käyttöpäivä -merkinnällä. Jos pesupuskuriainetta on pidetty kylmässä, anna sen lämmetä 20–25 °C:n lämpötilaan ennen käyttöä.</p> <p>On suositeltavaa, että pesulaite ja putket puhdistetaan 0,5 % natriumhypokloriittiliuoksella ja huuhdotaan perusteellisesti tislattulla tai deionoidulla vedellä kolmen kuukauden välein, jotta estettäisiin bakteerien ja homeiden sisältämän alkalisen fosfataasin mahdollinen kontaminaatio.</p>	<u>Pesutiivisteiden määrä</u>	Tislattun tai deionisoidun <u>veden määrä</u>	Pesupuskuritiivisteiden <u>lopullinen määrä</u>	33,3 ml	966,7 ml	1 litra	66,6 ml	1 933,4 ml	2 litraa	100,0 ml	2 900,0 ml	3 litraa
<u>Pesutiivisteiden määrä</u>	Tislattun tai deionisoidun <u>veden määrä</u>	Pesupuskuritiivisteiden <u>lopullinen määrä</u>											
33,3 ml	966,7 ml	1 litra											
66,6 ml	1 933,4 ml	2 litraa											
100,0 ml	2 900,0 ml	3 litraa											

#### Käyttövalmiiden reagenssien määrät

<b>Detekointi-reagenssi 1 ja detekointi-reagenssi 2</b>	<p><b>VÄLITTÖMÄSTI ENNEN KÄYTTÖÄ:</b>  Sekoita reagenssi perusteellisesti, ja sen jälkeen <u>mittaa</u> tarvittava määrä detekointireagenssi 1:ta tai detekointireagenssi 2:ta puhtaaseen reagenssialtaaseen alla olevia ohjeita huolellisesti noudattaen. Kontaminaation välttämiseksi näitä reagensseja <b>EI SAA</b> palauttaa alkuperäisiin pulloihin: <b>Käyttämättömät aineet on hävitettävä.</b> Jos et käytä 8-kanavaista pipettiä, voit käyttää asianmukaista sarja-annostelijaa. Ota siinä tapauksessa reagenssista alikvootit riittävän kokoiseen polypropeeniputkeen, johon mahtuu alla annettu tarvittava määrä.</p> <table border="0"> <thead> <tr> <th><u>Kokeiden/liuskojen lkm</u></th> <th><u>Detekointireagenssi 1:n tai 2:n määrä</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>Pullon sisältö</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>7,0 ml</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>5,0 ml</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>3,0 ml</td> </tr> <tr> <td>1 koe</td> <td>0,125 ml</td> </tr> </tbody> </table>	<u>Kokeiden/liuskojen lkm</u>	<u>Detekointireagenssi 1:n tai 2:n määrä</u>	96/12	Pullon sisältö	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 koe	0,125 ml
<u>Kokeiden/liuskojen lkm</u>	<u>Detekointireagenssi 1:n tai 2:n määrä</u>												
96/12	Pullon sisältö												
72/9	7,0 ml												
48/6	5,0 ml												
24/3	3,0 ml												
1 koe	0,125 ml												

## NÄYTTEIDEN OTTO JA KÄSITTELY

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeeseen suosittelemme ainoastaan sellaisia kohdunkaulanäytteitä, jotka on otettu ja siirretty *digene* HC2 DNA -näytteenottimella (sisältää kohdunkaulaharjan ja *digene*-näytteenkuljetusaineen) ja *digene* Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkauksella (vanutuppo ja näytteenkuljetusaine) tai näytteitä, jotka on kerätty harjamaisella keräyslaitteella ja asetettu Hologic PreservCyt -liukseen. Näytteitä, jotka on kerätty muilla näytteenottovälineillä tai siirretty muissa kuljetusaineissa, ei voida käyttää tässä analyysissä. Tämän välinepakkauksen suoritusarvot on määritetty vain tässä mainittuja näytteenottopakkauksia käyttäen. Mikäli suoritetaan kolposkopia, kohdunkaulanäytteet on kerättävä ennen etikkahappo- tai jodikäsittelyä. Ks. näytteiden ottoa ja käsittelyä koskevia lisätietoja *digene* HC2 DNA -näytteenottimen käyttöohjeista.

### KOHDUNKAULANÄYTTEET *digene* NÄYTTEENKULJETUSAINEESSA (STM)

Näytteenkuljetusaineessa olevia näytteitä voidaan pitää huoneenlämmössä enintään kaksi viikkoa, jona aikana niiden toimittaminen koelaboratorioon ei vaadi kylmäkuljetusta. Näytteet tulee lähettää eristetyssä säiliössä joko yli yön- tai 2-päivän toimituksena. Koelaboratoriossa näytteet tulee säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa, mikäli analyysi tehdään viikon sisällä. Jos koe tehdään myöhemmin kuin viikon kuluessa, näytteitä säilytetään –20 °C:n lämpötilassa enintään kolme kuukautta. *digene*-näytteenkuljetusaineeseen on lisätty suoja-ainetta hidastamaan bakteerikasvua ja säilyttämään DNA:n eheys. Sen **tarkoituksena ei ole** organismien tai solujen elinkyvyn säilyttäminen. *digene* näytteenkuljetusaineeseen kerättyjä näytteitä ei voi käyttää viljely- tai muissa koemenetelmissä.

Näytteenkuljetusaineessa olevien näytteiden 2 viikkoa kestävä stabiliteetti huoneenlämmössä sekä yksi lisäviikko 2–8 °C:n lämpötilassa perustuu suorittamaamme 90 simuloidun kliinisen näytteen testaamiseen. Näihin 90 näytteeseen sisältyi 40 näytettä, jotka sisälsivät alhaisia määriä CT-organismeja (analyysin detekointirajalla, limit of detection [LOD], tai sen lähellä olevia määriä), 35 näytettä, jotka olivat lievästi positiivisia näytteitä (määrät n. 2–5 kertaa LOD-raja-arvoa suurempia) ja 5 erittäin positiivista näytettä, jotka ylittivät LOD-raja-arvon kymmenkertaisesti. Muut 10 näytettä olivat CT-negatiivisia, mutta 5 sisälsi korkeita määriä GC-organismeja. Analyysin suoritusarvot perustuvat näytteisiin, joita säilytettiin 2–8 °C:n lämpötilassa tai pakastettuina ja jotka testattiin 1–2 viikon kuluessa näytteenottohetkestä.

#### Huomautuksia:

1. Kustakin 90 näytteen sarjan näytteestä otettu denaturoimaton alikvootti altistettiin ääriämpötiloille, minkä tarkoituksena oli kuljetusolosuhteiden simuloiminen (säilytys –20 °C:ssa kolmen päivän ajan, ja sen jälkeen 50 °C:ssa viiden päivän ajan sekä lisäksi 2 viikkoa huoneenlämmössä). Signaalin (RLU/CO) havaittu menetys 8 päivän kuluttua näissä olosuhteissa ei vaikuttanut tulosten tulkintaan laadullisesti. Huoneenlämmössä tapahtuneen kahden viikon lisäinkuboinnin jälkeen havaittiin laadullisia eroja verrattaessa sellaisiin näytteisiin, jotka sisälsivät vähäisiä määriä organismeja.
2. Korkkien irtoaminen pakastettuina lähetetyistä tai säilytetyistä näytteistä voidaan välttää seuraavasti:
  - Peitetään pakastettujen näytteiden korkit Parafilm<sup>®</sup>-kalvolla ennen näytteiden lähettämistä. Näytteet voidaan lähettää pakastettuina tai 20–25 °C:n lämpötilassa.
  - Poistettaessa näytteitä pakastimesta testaamista varten niihin on välittömästi vaihdettava näytteenottoputkien kierrekorkit.
3. *digene* HC2 DNA -näytteenotinta ei saa käyttää raskaana olevien naisten tutkimiseen. Kerää näytteet raskaana olevilta naisilta käyttämällä ainoastaan *digene* Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkausta.

### HOLOGIC PRESERVCYT -LIUKSESSA OLEVAT KOHDUNKAULANÄYTTEET

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa voidaan käyttää näytteitä, jotka on kerätty harjamaisella keräyslaitteella ja asetettu PreservCyt -liukseen käytettäväksi valmistettaessa Hologic ThinPrep Pap -objektileaseja. Näytteet on otettava tavalliseen tapaan ja ThinPrep Pap -objektileasit on valmistettava Hologic-ohjeiden mukaisesti.

PreservCyt -liuoksessa olevat näytteet voidaan säilyttää korkeintaan yhden kuukauden ajan huoneenlämmössä (20–25 °C) keräämisen jälkeen ja ennen prosessointia *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta varten. PreservCyt-liuoksessa olevia näytteitä ei voida pakastaa. Ks. *PreservCyt -näytteiden valmistusmenetelmä*ä koskevia ohjeita näiden näytteiden valmistamiseksi.

## KOEMENETELMÄ

**Näytteet voivat sisältää tartunnanaiheuttajia ja niitä tulee käsitellä sen mukaisesti.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe voidaan suorittaa manuaalisesti (näiden käyttöohjeiden mukaisesti) tai käyttämällä Rapid Capture System -järjestelmää instrumenttisovelluksena, kun tavoitteena on lukuisien näytteiden tehotestaaminen.

### RAPID CAPTURE SYSTEM -JÄRJESTELMÄN KÄYTTÖ LUKUISIEN NÄYTTEIDEN TEHOTESTAAMISESSA

Rapid Capture System -järjestelmä on yleiskäytössä oleva automatisoitu pipetointi- ja laimennusjärjestelmä, jota voidaan käyttää *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen yhteydessä käsiteltävien lukuisien näytteiden tehotestaamisessa. Järjestelmällä voidaan käsitellä enimmillään 352 näytettä 8 tunnissa, johon sisältyy 3,5 tunnin jakso, jolloin käyttäjän väliintuloa ei edellytetä; jopa 704 näytetuloa voidaan tuottaa 13 tunnissa. Näytteiden denaturointi testausta varten suoritetaan RCS-järjestelmästä erillään, ja se tapahtuu primäärisessä näytteenottoputkessa (samoin kuin jäljempänä kuvatussa manuaalisessa *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa), ennen näytteiden asettamista RCS-alustalle. Lisäksi suoritetaan kemiluminesenssisignaalin detekointi ja tulosten raportointi offline-tilassa olevalla QIAGENin hyväksymällä luminometrijärjestelmällä, joka on yhteinen sekä manuaaliselle että RCS-menetelmälle. Jokainen *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen vaihe suoritetaan täsmälleen samassa järjestyksessä kuin manuaalisesti tehtävissä kokeissa. RCS-sovellus mahdollistaa eri vaiheissa etenevän jopa neljän kuoppalevyn prosessoinnin, jolloin kukin kuoppalevy sisältää näytteet ja tarvittavat tutkimuskalibraattorit ja laatukontrollit.

**Rapid Capture System -järjestelmää käytettäessä tulee ensin tutustua laitteen mukana toimitettuun Rapid Capture System -käyttöoppaaseen näiden käyttöohjeiden lisäksi.**

### MANUAALINEN MENETELMÄ

#### Asetus

1. Kuoppalevyn lämmitin I:n annetaan tasaantua vähintään 60 minuutin ajan kylmäkäynnistyksen jälkeen lämpötilaan 65±2 °C. Ks. lisätietoja on kuoppalevyn lämmitin I:n käyttöoppaasta.
2. Varmista, että vesihauteen lämpötila on 65 °C ja että veden pinta on tarpeeksi korkealla, jotta jokaisen näyteputken sisältö on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
3. Ota näytteet ja **kaikki** tarvittavat reagenssit jääkaapista **ennen analyysin aloittamista**. Anna niiden lämmitä 20–25 °C:n lämpötilaan 15–30 minuutin ajan.
4. Laadi levystä esimerkki-layout käyttäen *digene* analyysimääritysohjelmaa CT:n *digene* analyysiprotokollien kanssa. Ks. lisätietoja käytetyn ohjelmiston käyttöoppaasta.
5. Negatiivinen kalibraattori, positiivinen kalibraattori ja laaduntarkkailukontrollit on kukin valmistettava **tuoreena** kutakin analyysia varten. Sekoita kalibraattorit ja laatukontrollit hyvin. Jos käytössä on MST-moninäyteputkivorteksi 2, siirrä kustakin 500 µl asianmukaisesti merkittyihin tyhjiin näytteenottoputkiin. Vaihtoehtoisesti voit siirtää kustakin 200 µl asianmukaisesti merkittyihin 2 ml polypropeenisiin mikrosentrifugiputkiin.
6. **ENSIN on testattava negatiivinen kalibraattori ja positiivinen kalibraattori** kolme rinnakkain kustakin näyte-erästä. Laaduntarkkailukontrollit ja näytteet tulee testata yksitellen. Kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet tulee tutkia 8:n mikrokaivosarakkeen asetelmassa siten, että negatiivisen kalibraattorin (NC) toistot pannaan sarakkeisiin A1, B1, C1; positiivisen kontrollin (PC) toistot sarakkeisiin D1, E1, F1; QC CT sarakkeeseen G1; QC GC sarakkeeseen H1; ja näytteet aloittaen sarakkeesta A2. Ohessa esimerkkiasetus. Ks. kalibraattorien, laatukontrollien ja näytteiden ohjelmistoasetuksiin liittyviä lisätietoja sopivan QIAGENin hyväksymän luminometrin käyttöoppaasta ja sopivan *digene* analyysimääritysohjelmiston käyttöoppaasta.

## LAYOUT-ESIMERKKI 24 MIKROKAIVOLLA SUORITETUSTA KOKEESTA:

Rivi	Sarake		
	1	2	3
A	NC	Näyte 1	Näyte 9
B	NC	Näyte 2	Näyte 10
C	NC	Näyte 3	Näyte 11
D	PC	Näyte 4	Näyte 12
E	PC	Näyte 5	Näyte 13
F	PC	Näyte 6	Näyte 14
G	QC CT	Näyte 7	Näyte 15
H	QC GC	Näyte 8	Näyte 16

### DENATURAATIO

#### Huomautuksia:

- **Varo:** Denaturointireagenssi on syövyttävää. Käytä tarkoituksenmukaista suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Ole varovainen ja käytä puuterittomia käsineitä käsittelyn aikana.
- **Tärkeää:** Jotkut näytteet voivat sisältää verta tai muita biologisia aineita, ja nämä voivat vaikuttaa denaturointireagenssia lisättäessä tapahtuviin värinmuutoksiin. Näytteissä, jotka ennen denaturointireagenssin lisäämistä ovat tummia, ei tässä vaiheessa ehkä tapahdu kunnollista värinmuutosta. Jos kunnollista värinmuutosta ei esiinny näissä tapauksissa, se ei vaikuta koetuloksiin. Kunnollinen sekoittuminen voidaan varmistaa tarkkailemalla kalibraattoreiden ja laatukontrollien värinmuutosta.
- Varmista denaturointivaiheessa, että vesihauteessa veden pinta on tarpeeksi korkealla jotta jokaisen näyteputken sisältö on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
- Näytteet voidaan valmistaa denaturointivaiheen loppuun saakka ja säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa yön yli tai –20 °C:n lämpötilassa enintään kolme kuukautta. Sulatusjaksoja saa olla korkeintaan kolme, jolloin kunkin sulatusjakson aikana pisin sallittu säilytysaika huoneenlämmössä on kaksi tuntia. Sekoita hyvin ennen käyttöä.
- Kalibraattorit ja laatukontrollit voidaan valmistaa denaturointivaiheen loppuun saakka ja säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa yön **mutta niitä ei saa pakastaa**. Pakastetut kalibraattorit ja laatukontrollit on hylättävä.
- Näytteiden ei enää denaturoinnin ja inkuboinnin jälkeen katsota olevan infektoivia.<sup>21</sup> Laboratorion henkilöstön on kuitenkin yhä noudatettava kansallisia/paikallisia varotoimenpiteitä.

### KALIBRAATTOREIDEN, LAATUKONTROLLEIDEN JA STM-NÄYTTEIDEN VALMISTUSMENETELMÄ

#### Huomautuksia:

- Näyteenottolaitetta ei saa poistaa ennen denaturaatiota.
  - Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on ratkaisevan tärkeää, että kalibraattori-, laatukontrolli- ja STM-näyteaine joutuvat kosketuksiin denaturointireagenssin kanssa. Denaturointireagenssin lisäämistä seuraava sekoittaminen on ratkaiseva vaihe: **On varmistettava, että MST-vortexi 2:n nopeudeksi on säädetty 100 (maksiminopeus) ja että nesteessä todetaan selvästi havaittavissa oleva pyörre sekoittamisen aikana niin, että neste pesee putken sisäpinnan kauttaaltaan. Manuaalisesti vortexoitaessa on varmistettava, että jokainen kalibraattori, laatukontrolli ja näyte sekoitetaan yksitellen vortexoimalla kutakin vähintään viiden sekunnin ajan maksiminopeudella siten, että nestepyörre pesee putken sisäpinnan kauttaaltaan, ja sen jälkeen putki invertoidaan kerran.**
1. Poista ja hävitä kalibraattoreiden, laatukontrollien ja STM-näyteputkien korkit.

**Huomautus:** Näyteputkista poistettujen korkkien katsotaan olevan potentiaalisesti infektoivia. Hävitettävä kansallisten/paikallisten määräysten mukaisesti.

2. Pipetoi denaturointireagenssia ja osoitinväriä kuhunkin kalibraattoriin, laatukontrolliin tai STM-näytteeseen sarja-annostelijalla tai säädettävällä pipetillä. Varo koskemasta putken laitoihin näytteiden ristikontaminaatiolta välttymiseksi. Tarvittavan denaturointireagenssin määrä on puolet näytteen määrästä. Kunkin kalibraattori-, laatukontrolli- ja näytetyypin tarkat määrät käyvät ilmi alla olevasta taulukosta.
- **Laimenna jäljellä oleva denaturointireagenssi pullossa ennen kansallisten/paikallisten laboratorionkäytäntöjen mukaista hävittämistä.**

Kalibraattori, laatukontrolli tai näyte	Tarvittava määrä denaturointireagenssia
Negatiivinen kalibraattori, positiivinen kalibraattori ja laaduntarkkailukontrolli, 200 µl	100 µl
Negatiivinen kalibraattori, positiivinen kalibraattori ja laaduntarkkailukontrolli, 500 µl	250 µl
Kohdunkaulanäyte, 1 ml	500 µl

3. Sekoita näytteet käyttäen jompaakumpaa alla olevista menetelmistä.

#### Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä

Huomautus: QIAGEN-näytteitä, jotka on sekoitettu MST vortexi 2:lla, **on** hybridoitava kuoppalevyllä ja kuoppalevyn lämmittimellä I. Katso tarvittaessa lisätietoja MST vortexi 2:n käyttöoppaasta.

- Peitä kalibraattorit, laatukontrollit ja STM-näyteputket DuraSeal<sup>®</sup>-putkentiivistelmällä vetämällä kelmu telineessä olevien putkien yli.
- Aseta telineen kansi kalvolla peitettyjen putkien päälle ja lukitse paikoilleen kahdella reunapidikkeellä. Katkaise kelmu leikkurilla.
- Aseta teline MST Vortexer 2:een ja kiinnitä paikoilleen puristimella. Tarkista, että nopeudeksi on säädetty 100 (maksiminopeus) ja aseta vortexin virtakytkin "ON"-asentoon. Vortexoi putkia 10 sekunnin ajan.

#### Putkien yksittäinen/manuaalinen vorteksointimenetelmä

- Sulje kalibraattorit, laatukontrolli ja STM-näyteputket uudelleen puhtailla näytteenottoputken kierrekorkeilla.
- Sekoita kunkin putken sisältö vorteksoimalla yksitellen perusteellisesti suurella nopeudella viiden sekunnin ajan.
- Käännä kukin näyteputki ylösalaisin kerran putken sisäpinnan, korkin ja reunan pesemiseksi.
- Aseta putki takaisin telineeseen.

4. Riippumatta siitä kumpaa vorteksointimenetelmää käytetään, **jokaisessa putkessa tulee olla sekoittamisen aikana selvästi nähtävissä oleva nestepyörre niin, että neste pesee putken koko sisäpinnan**. Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden värin tulee muuttua violetiksi.
5. Inkuboi telineessä olevia putkia 65±2 °C:n vesihauteessa 45±5 minuutin ajan (denaturoitu kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet voidaan testata välittömästi. Kalibraattorit ja laatukontrollit voidaan säilyttää yön yli 2–8 °C:ssa edellä **Huomautuksia**-kohdassa kuvatulla tavalla). Ks. näytteiden säilyttämisohjeita kohdasta *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta* [Optional Stop Point]. Valmista CT-koeinseos tämän inkuboinnin aikana. Ks. kohta *Reagenssin valmistus ja säilytys*.



## PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VALMISTUSMENETELMÄ

### Huomautuksia:

- Ks. perusteelliset tiedot *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan käyttöohjeista.
- 4 ml:n alikvootin valmistaminen PreservCyt-liuoksesta riittää 2 kokeeseen, kun käytetään manuaalista koemenetelmää. Käsiteltävän määrän on oltava vähintään 4 ml. *digene STM- ja PreservCyt-liuosnäytteiden* vastaavuustiedot ekvivalenssia koskevassa osassa on lisätietoja vähimmäisjäännöstilavuudesta.
- Valmista PreservCyt-liuosnäytteet enintään 36 kpl:n erinä; muuten pelletit saattavat irrota supernatanttia dekantoidessa. Tämä on tärkeää solupellettien eheyden varmistamiseksi dekantointivaiheen aikana. Ylimääräiset PreservCyt-liuospullot valmistetaan vasta ensimmäisen erän valmistuttua loppuun saakka.

### Reagenssien valmistaminen

Käytä joko *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen mukana toimitettua denaturointireagenssia (DNR) (ks. *Reagenssien valmistus ja säilytys*) tai *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan mukana toimitettua DNR-reagenssia. *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan toimitettu DNR valmistetaan lisäämällä 3 tippaa osoitinväriä DNR-pulloon ja sekoittamalla hyvin. Liuoksen tulee olla väriltään tasaisen tummanvioletti. Tarvittavat määrät näkyvät taulukosta 1.

**Taulukko 1.** Tarvittavat määrät: reagenssien valmistus.

Kokeiden lkm	PreservCyt-liuoksen määrä	Konversiopuskurin määrä
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. Varusta *digene* HC2 -näytteenkonversioputki, 10 ml:n kartiopohjainen Sarstedt-putki tai 15 ml:n VWR- tai Corning-merkkinen kartiopohjainen putki asianmukaisella näytteen tunnistenumeraalla.
2. Yhden näytteen käsittely kerrallaan:
  - a. Ravista PreservCyt-pulloa voimakkaasti käsin, kunnes solut näyttävät jakautuneen tasaisesti.
  - b. Koska solut laskeutuvat nopeasti, pipetoi välittömästi sopiva määrä PreservCyt-näytettä tunnistenumeraalla merkittyyn putkeen. Siirrä PreservCyt-liuos kartiopohjaisen putken pohjalle, jotta soluaine ei kiinnity putken sisäpinnalle.
3. Lisää sopiva määrä näytteenkonversiopuskuria kuhunkin putkeen (ks. taulukko 1).
4. Aseta korkit paikoilleen ja sekoita kunkin putken sisältöä huolellisesti käyttäen astialla varustettua vortekssekoitinta.

**Huomautus:** MST Vortexer 2:lla suoritettavaa toimenpidettä ei ole validoitu PreservCyt-liuosnäytteiden vorteksioimiseen näytteenkonversiopuskurin kanssa ennen sentrifugointia eikä sitä saa käyttää tässä vaiheessa.

5. Sentrifugoi putkia nopeudella  $2\ 900 \pm 150 \times g$  pyörivän astian roottorissa  $15 \pm 2$  min ajan.
6. Valmista sentrifugoinnin aikana *digene* näytteenkuljetusaine-denaturaatioreagenssiseos (STM/DNR) suhteessa 2:1 taulukon 2 mukaisesti.

**Huomautus: STM/DNR-seos on valmistettava aina testauspäivänä.**

- a. Tarvittavan STM/DNR-seoksen kokonaismäärä määritetään käyttämällä PreservCyt-liuosnäytteen alkumäärää viitteenä ja kertomalla sitten STM:n ja DNR:n putkikohtaiset määrät analysoitavien näytteiden lukumäärällä (ks. taulukko 2).

**Taulukko 2.** Tarvittavat määrät: STM/DNR.

Kokeiden lkm	PreservCyt-liuoksen määrä	STM:n määrä/putki lopullista STM/DNR-seosta* varten	DNR:n määrä/putki lopullista STM/DNR-seosta* varten	Putkeen lisätyn STM/DNR-seoksen määrä
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

\*Näissä sarakkeissa lueteltuja määriä ei saa lisätä suoraan näyteputkeen.

- b. Sekoita liuos huolellisesti vorteksoimalla.
7. Ota putket sentrifugista yksi kerrallaan ja aseta ne telineeseen tai konversiotelineeseen. Kunkin putken pohjalla tulisi olla vaaleanpunainen/oranssi pelletti (sakka).  
**Huomautus:** Näytteitä, joissa ei näy pellettiä sentrifugoinnin jälkeen, ei voi käyttää kokeeseen vaan ne on hävitettävä.
8. Kunkin putken käsittely erikseen:
- Poista korkki ja aseta se sivuun puhtaalle vähänukkaiselle liinalle.
  - Dekantoi supernatantti varovasti.
  - Pidä putkea ylösalaisin käännettynä ja kuivaa se varovasti (noin 6 kertaa) vähänukkaisiin imukykyisiin paperipyyhkeisiin, kunnes putkesta ei enää tipu nestettä. Käytä joka kerta uutta puhdasta kohtaa pyyhkeestä. **Älä** päästä solupellettiä liukumaan pois putkesta kuivaamisen aikana.  
**Huomautuksia:**
    - Älä käytä imukykyisen vähänukkaisiin paperipyyhkeen samaa kohtaa kuivaamiseen useammin kuin kerran.
    - On tärkeää, että mahdollisimman suuri määrä PreservCyt-liuosta poistetaan kuivaamalla. On kuitenkin normaalia nähdä hiukan PreservCyt-liuosta kuivaamisen jälkeen.
  - Aseta putki telineeseen tai konversiotelineeseen.

## Vorteksointi ja denaturointi

### Manuaalinen vorteksointimenetelmä

- Lisää sopiva määrä STM/DNR-seosta kuhunkin pellettiin (ks. taulukko 2). Sulje jokainen putki uudelleen korkilla ja suspendoi pelletit uudelleen vorteksoimalla jokaista putkea yksitellen suurimmalla nopeudella vähintään 30 sekunnin ajan. Jos pellettiä on vaikea suspendoida, vorteksoi putkea vielä 10-30 sekuntia tai kunnes pelletti irtoaa putken pohjasta. Jos pelletti ei ole liennut lisävorteksoinnin jälkeen (yhteensä enintään 2 min), merkitse muistiin näytteen tunnistenumero ja siirry seuraavaan vaiheeseen.
- Aseta putket telineeseen.
- Aseta teline  $65 \pm 2$  °C:n vesihauteeseen  $15 \pm 2$  minuutiksi. Vedenpinnan on oltava tarpeeksi korkealla, jotta jokaisessa putkessa oleva neste on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
- Poista näyteteline vesihauteesta ja vorteksoi näytteitä yksitellen 15-30 sekuntia.  
**Huomautus:** Varmista tässä vaiheessa, että kaikki pelletit ovat täysin suspendoituneet. Näytteitä, joissa näkyy vielä pellettejä, ei voi käyttää kokeeseen vaan ne on hävitettävä.
- Siirrä teline takaisin  $65 \pm 2$  °C:n vesihauteeseen ja jatka denaturointia vielä  $30 \pm 3$  minuuttia.
- Jatka seuraavasta vaiheesta *Hybridisaatio* tai ks. denaturoitujen näytteiden säilytykseen ja käsittelyyn liittyviä ohjeita kohdasta *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta* [Optional Stop Point].

## Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä

### Huomautuksia:

- Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä on validoitu PreservCyt-liuosnäytteiden käsittelyä varten sentrifugoinnin ja supernatantin dekantoinnin jälkeen.
  - Vain MST Vortexer 2 on tarkoitettu PreservCyt-liuosnäytteiden prosessointiin.
  - Konversioteline ja telineen kansi on suunniteltu erityisesti *digene* HC2 -näytteenkonversioputkia (VWR- tai Corning-merkkisiä 15 ml:n kartiopohjaisia putkia) varten. Konversiotelineessä saa käyttää vain yhtä putkityyppiä kerrallaan. Muunmerkkisiä putkia ei ole validoitu käyttöä varten.
  - On ehdottoman tärkeää noudattaa määritettyjä vorteksointi-aikoja konversiotelineelle ja telineen kannelle.
  - Konversiotelinettä ja telineen kantta ei saa käyttää *digene* HC2 DNA -kokeen pakkaukseen sisältyvien kalibraattoreiden tai laatukontrollien vorteksointiin. Konversiotelinettä ja telineen kantta käytettäessä STM-putkien korkeus estää riittävän vorteksoinnin.
1. Kun jokainen nimilapulla merkitty 15 ml:n kartiopohjainen putki on kuivattu, aseta ne paikoilleen konversiotelineeseen.
  2. Lisää sopiva määrä STM/DNR-seosta jokaiseen pellettiin (taulukko 2).
  3. Peitä 15 ml:n kartiomaiset putket DuraSeal-putkentiivistekelmulla vetämällä kelmu telineessä olevien putkien päälle.
  4. Aseta telineen kansi kelmulla peitettyjen putkien päälle ja lukitse kansi paikalleen kahdella reunapidikkeellä. Leikkaa kelmu leikkurilla, kun kansi on tiukasti kiinni.
  5. Siirrä punakahvaista vipua ylöspäin, kunnes se on vaakasuorassa asennossa.
  6. Aseta konversioteline ja telineen kansi MST Vortexer 2:een siten, että konversiotelineen suurin diagonaalinen kulma on oikeassa etukulmassa. Aseta teline ja kansi MST Vortexer 2:n tukialustalle siten, että se on tiiviisti ohjaimien sisäpuolella. Kiinnitä teline paikalleen siirtämällä punakahvaista vipua alaspäin kohtisuoraan asentoon. Teline lukkiutuu paikalleen.
  7. Tarkista, että nopeudeksi on säädetty 100 (maksiminopeus) ja että pulssinvaihtokytkin on OFF-asennossa.
  8. Käännä vortexin virtakytkin päälle ON-asentoon. **Vorteksoi putkia 30 sekunnin ajan.**
  9. Käännä vortexin virtakytkin pois päältä OFF-asentoon.
  10. Ota konversioteline ja telineen kansi pois MST Vortexer 2:sta nostamalla punakahvainen vipu ylöspäin.
  11. Aseta teline  $65 \pm 2$  °C:n vesihauteeseen 15  $\pm$  2 minuutiksi. Varmista, että jokaisessa putkessa oleva neste on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
  12. Ota näytteet sisältävä teline pois vesihauteesta 15 minuutin inkuboinnin jälkeen.
  13. Kuivaa ylimääräinen vesi telineestä roiskumisen estämiseksi, ennen kuin asetat sen MST Vortexer 2:een.
  14. Kiinnitä konversioteline ja telineen kansi MST Vortexer 2:een *vaiheessa 6* kuvatulla tavalla.
  15. Tarkista, että nopeudeksi on säädetty 100 ja käännä vortexin virtakytkin päälle ON-asentoon. **Vorteksoi putkia 1 minuutin ajan.**
  16. Käännä vortexin virtakytkin pois päältä OFF-asentoon.  
**Huomautus:** MST Vortexer 2 -menetelmässä käytetyt sekoitusnopeus, -ajat ja -prosessi ovat standardisoituja, eikä pellettejä tarvitse tarkistaa silmämääräisesti kuten manuaalista vorteksointimenetelmää käytettäessä.
  17. Aseta teline takaisin  $65 \pm 2$  °C vesihauteeseen ja jatka denaturointia  $30 \pm 3$  minuuttia.
  18. Poista teline vesihauteesta, kuivaa teline ja kiinnitä se vortexiin.
  19. Käännä vortexin virtakytkin päälle ON-asentoon. **Vorteksoi 10 sekunnin ajan maksiminopeudella.**
  20. Käännä vortexin virtakytkin pois päältä OFF-asentoon. Poista teline.
  21. Poista telineen kansi ja DuraSeal-putkentiivistekelmu välittömästi näytteiden päältä.

22. Siirry seuraavaan *Hybridisaatio*-vaiheeseen tai ks. denaturoituja näytteitä koskevia säilytys- ja käsittelyohjeita kohdasta *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta*.

## VAIHTOEHTOINEN PYSÄHTYMISKOHTA

STM-näytteitä ja konvertoituja PreservCyt-liuosnäytteitä voidaan denaturoinnin jälkeen säilyttää 2–8 °C:ssa yli yön tai –20 °C:ssa korkeintaan 3 kuukautta. Kun näytteitä säilytetään jääkaapissa yön yli, ne voidaan jättää konversiotelineeseen DuraSeal-kelmulla ja telineen kannella peitettynä. Telineen kansi ja DuraSeal-kelmu on poistettava näytteistä ja näyteputket on suljettava korkeilla ennen niiden säilyttämistä –20 °C:ssa. Kummassakin tapauksessa on saavutettava näytteiden tasainen lämpötila 20–25 °C ja näytteet on vorteksoitava perusteellisesti ennen *Hybridisaatio*-vaiheeseen siirtymistä.

**Huomautus:** hiilihappojäätä ei saa käyttää denaturoitujen näytteiden säilyttämiseen eikä kuljettamiseen.

Jäädytys- ja sulatusjaksoja voidaan suorittaa korkeintaan 3, ja kukin sulatusjakso saa kestää enintään 2 tuntia huoneenlämmössä.

## HYBRIDISAATIO

### Huomautuksia:

- CT-koetinseos on tahmeaa ainetta. Varmista, että sekoittuminen on perusteellinen ja että vaadittu määrä kokonaisuudessaan jakautuu kuhunkin hybridisaatiokuoppalevykaivoon. Ks. kohta *Reagenssin valmistus ja säilytys*.
  - Jos denaturoitua näytettä on säilytetty –20 °C:n lämpötilassa, annetaan näytteen sulaa 20–25 °C:n lämpötilassa, minkä jälkeen näyte vorteksoidaan perusteellisesti ennen kuin siirrytään hybridisaatioon.
  - Esikuumenna kuoppalevyn lämmitin I:tä ennen käyttöä 65 ± 2 °C:n lämpötilaan vähintään 60 minuutin ajan ennen käyttöä. Ks. lisätietoja tarvittaessa kuoppalevyn lämmitin I:n käyttöoppaasta.
1. Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimi- tai numerolapulla.
  2. Poista kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet inkuboinnin jälkeen vesihauteesta. Jos käytät MST-vortexi 2:ta, vorteksoi koko STM-näytteitä sisältävää telineä vähintään 5 sekunnin ajan maksiminopeudella. Kun käsittelet PreservCyt-liuoksessa olevia näytteitä, vorteksoi koko konversiotelinettä vähintään 10 sekunnin ajan maksiminopeudella. Voit vaihtoehtoisesti vorteksoida kunkin putken erikseen vähintään viiden sekunnin ajan.
  3. Pipetoi kalibraattoria, laatukontrollia tai näytettä 75 µl kutakin tyhjän hybridisaatiokuoppalevyn kaivon **pohjaan** niin kuin kohdassa *Asetus* laaditussa levyn layout-esimerkissä esitetään. Vältä koskettamasta kaivojen sivuja ja pyri rajoittamaan ilmakuplien syntymistä. Kalibraattoreiden, laatukontrollien tai näytteiden ristikontaminaation estämiseksi käytä kuhunkin siirtoon puhdasta, erikoispitkää pipetinkärkeä. STM-näytteitä varten näytteenottovälinettä ei saa poistaa näytteenkuljetusputkesta. Denaturoidut näytteet voidaan sulkea näytteenottoputkien kierrekorkeilla ja säilyttää yhdessä putkiin jäävien näytteenottovälineiden kanssa. Denaturoidut PreservCyt-liuoksessa olevat näytteet voidaan sulkea uudelleen alkuperäisillä korkeilla.

### Huomautuksia:

- **Näytteen alikvoottien varomaton siirtäminen voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Näytteen siirron aikana pipetin kärki ei saa koskettaa putken sisäpintaa 75 µl alikvoottia otettaessa.**
4. Kun viimeinen näyte on siirretty, peitä levy kannella ja inkuboi **hybridisaatiokuoppalevyä 20–25 °C:n lämpötilassa 10 minuutin ajan**.
  5. Ota alikvoottit preparoidusta ja perusteellisesti vorteksoidusta koetinseoksesta kertakäyttöiseen reagenssialtaaseen. Käytä 8-kanavaista pipettiä ja annostele huolellisesti 25 µl koetinseosta kuhunkin kalibraattoreita, laatukontrolleja ja näytteitä sisältävään kaivoon käyttäen jokaisella rivillä uusia kärkiä. Annostele koetinseos kuhunkin hybridisaatiokaivoon takaisinroiskeita välttämällä. Vältä koskemasta kaivojen seinämiin.

**Huomautus:** Käytä edellä mainitussa vaiheessa 8-kanavaista pipettiä, jossa on 25-200 µl:n kärjet ja jonka annostelukapasiteetti on 25-75 µl. Jos kaivojen lukumäärä on pieni, käytä yksikanavaista pipettiä (jossa on 25-200 µl:n kärjet) 8-kanavaisen pipetin sijasta.

6. Aseta kuoppalevyn kansi hybridisaatiokuoppalevyn päälle. Ravista hybridisaatiokuoppalevyä  $3 \pm 2$  minuutin ajan nopeudella  $1100 \pm 100$  kierr./min tasoravistimessa I. *Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden väri tulisi ravistelun päätyttyä muuttua keltaiseksi.* Violetin väriseksi jäävissä kaivoissa ei ehkä ole ollut tarpeeksi koetinseosta. Annostele 25 µl lisää koetinseosta niihin näytteisiin, joiden väri on jäänyt violetiksi ja ravista uudelleen. Jos kaivot ovat edelleen violetteja tämän toimenpiteen jälkeen, testaa näytteet uudestaan.
7. Inkuboi esikuumennetussa ja tasaiseen  $65 \pm 2$  °C:n lämpötilaan saatetussa kuoppalevynlämmittin I:ssä  $60 \pm 5$  minuuttia.

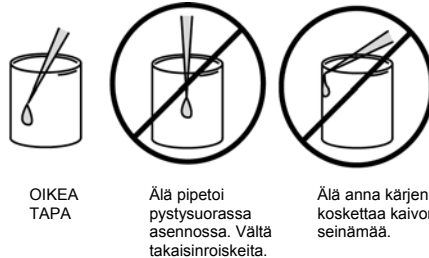
**Huomautuksia:**

- Kun hybridisaatiokuoppalevy asetetaan kuoppalevylämmittin I:een, pidä huoli siitä, ettei roiskeita synny.
- Ravistelun jälkeen PreservCyt-liuoksessa olevien näytteiden tulee muuttua keltaisen sijasta vaaleanpunaisiksi.

**HYBRIDINSIEPPAUS**

1. Poista ylimääräiset sieppauskuoppalevykaivot levyn rungolta. Aseta käyttämättömät kuoppalevykaivot takaisin niiden alkuperäiseen pussiin ja sulje pussi. Merkitse sarakkeet 1, 2, 3... huopakynällä ja varusta kuoppalevy asianmukaisella tunnistustiedolla. Lisää näytteet kaivoihin kohdassa *Asetus* aikaisemmin esitetyn layout-esimerkin mukaisesti.
2. Poista kalibraattoreita, laatukontrolleja ja näytteitä sisältävä hybridisaatiokuoppalevy varovasti kuoppalevyn lämmittin I:stä. Poista kuoppalevyn kansi välittömästi ja aseta se puhtaalle pinnalle.
3. Siirrä kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden koko määrä (n. 100 µl) hybridisaatiokuoppalevyn kaivoista vastaavan sieppausmikrokaivon pohjalle 8-kanavaisella pipetillä. Käytä jokaisessa sarakesiirroksessa 8-kanavaisessa pipetissä uusia pipetinkärkiä ja anna kunkin pipetinkärjen valua kunnolla täydellisen näytteen siirron varmistamiseksi. Voit halutessasi vakauttaa pipettiä tukemalla pipetinkärkien **keskivälin** kohtaa sieppausmikrokaivojen yläreunaa vasten (ks. kuva 1).

**KUVA 1: OIKEA PIPETOINTITAPA**



4. Peitä kuoppalevy kannella ja ravista tasoravistin I:ssä nopeudella  $1100 \pm 100$  kierrosta minuutissa ja  $20-25$  °C:n lämpötilassa  $60 \pm 5$  minuutin ajan.
5. Valmista pesupuskuri ja tarvittaessa tarkasta kuoppalevyn pesuri huuhtelu- ja jätesäiliöt tämän inkuboinnin aikana. Ks. kohta *Reagenssin valmistus ja säilytys*.
6. Kun sieppausvaihe on valmis, ota sieppauskuoppalevy pois tasoravistin I:stä ja poista kuoppalevyn kansi varovasti. Kaada kaivoissa oleva neste viemärialtaaseen. Käännä kuoppalevy viemärialtaan päällä ylösalaisin ja ravista voimakkein, alaspäin suuntautuvien liikkein, samalla varoen aiheuttamasta takaisinroiskeita jos dekantoit liian lähellä viemärialtaan pohjaa. **Kuoppalevyä ei saa kääntää takaisin**; kuivaa kuoppalevy kopauttamalla sitä napakasti kaksi tai kolme kertaa puhtaalle Kimtowels®-pyyhkeille tai vastaaville vähänukkaisille paperipyyhkeille. Varmista, että kaivoista on kaikki neste poistettu ja että kuoppalevy on päältä kuiva.

## HYBRIDIN DETEKOINTI

### Huomautuksia:

- Tee lisäykset kuljettamalla 8-kanavaista pipettiä kuoppalevyn poikki vasemmalta oikealle.
  - Tehokkaan ja yhtenäisen reagenssiannostelun aikaansaamiseksi suositellaan käytettäväksi käänteispipetointimenetelmää. Tällöin pipetinkärjet ensin ylitäytetään käyttämällä pipetin annosteluvivun (männän) 2. pidäkettä. Ks. menetelmän kuvaus jäljempänä. Pyyi kärjet kertakäyttöisen reagenssialtaan päällä tai vähänukkaiseen paperipyyhkeeseen ylimääräisen reagenssin poistamiseksi ennen kuoppalevylle annostelua.
  - Pipettiä voidaan haluttaessa vakauttaa tukemalla pipetinkärkien keskivälin kohtaa sieppausmikrokaivojen yläreunaa vasten. Varo koskemasta putken sivuja ettei tapahtuisi näytteiden ristikontaminaatiota. Ks. edellä kuva 1.
1. Ota detekointireagenssi 1:stä tarvittavan suuruinen alikvootti reagenssialtaaseen (ks. ohjeet kohdasta *Reagenssin valmistus ja säilytys*). Käytä 8-kanavaista pipettiä ja annostele huolellisesti 75 µl detekointireagenssia kuhunkin kuoppalevyn kaivoon jäljempänä kuvattua käänteistä pipetointimenetelmää noudattaen.

#### Käänteinen pipetointimenetelmä:

- a) Kiinnitä kärjet 8-kanavaiseen pipettiin; varmista, että kaikki kärjet ovat tiiviisti paikoillaan.
  - b) Paina pipetin mäntä ensimmäisen pidäkkeen ohitse toiseen pidäkkeeseen.
  - c) Upota kärjet detekointireagenssi 1:n liuokseen.
  - d) Vapauta mäntä hitaasti ja anna kärkien täytyä liuoksella.
  - e) Annostele liuos mikrokaivoihin (75 µl) painamalla mäntä ensimmäiseen pidäkkeeseen. Älä vapauta mäntää ennen kuin pipetinkärjet on upotettu takaisin detekointireagenssi 1:n liuokseen.
  - f) Täytä kärjet uudelleen ja jatka kunnes kaikki kaivot ovat täynnä. Täytä kuoppalevyn kaivot vasemmalta oikealle. *Varmista kaivojen täytyminen tarkkailemalla vaaleanpunaisen värin voimakkuutta. Värin voimakkuuden tulee olla sama kaikissa kaivoissa.*
2. Peitä kuoppalevyt kuoppalevyn kannella ja inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 30–45 minuutin ajan.

## PESEMINEN

Pese sieppauskuoppalevy jommallakummalla seuraavista menetelmistä.

### Automaattinen kuoppalevypesuri menetelmä

**Huomautus:** Pidä automaattisen kuoppalevyn pesuri aina päällä. Tarkista, että huuhteluallas on täynnä ja jätesäiliö tyhjä. Automaattinen kuoppalevypesuri huuhtelee järjestelmän säännöllisesti puhdistusta varten. Automaattisen kuoppalevypesurin hoito- ja ylläpito-ohjeet on esitetty laitteen käyttöoppaassa.

## ENNEN JOKAISTA KÄYTTÖÄ:

- Varmista, että pesuainesäiliö on täytetty pesupuskuriliuoksella vähintään 1 litran merkkiin asti. Jos näin ei ole, valmista pesupuskuriliuosta. Ks. kohta *Reagenssin valmistus ja säilytys*.
  - Varmista, että huuhteluallas on täynnä tislattua tai deionisoitua vettä.
  - Varmista, että jätesäiliö on tyhjä ja että korkki on varmasti kiinni.
  - Automaattinen kuoppalevypesuri valmistelee itsensä automaattisesti ennen jokaista pesua, ja huuhtelee jokaisen pesun jälkeen.
1. Irrota kuoppalevyn kansi ja aseta kuoppalevy automaattisen kuoppalevypesurin alustalle.
  2. Varmista, että virta on päällä ja että näytössä lukee "Digene Wash Ready" tai "P1".  
**Huomautus:** Jos sieppauskaivoista käytetään vain osittainen liuska, tyhjät kuoppalevyn kaivot pitää sarakkeen täydentämiseksi laittaa sieppauskuoppalevyn ennen pesemistä. Ks. tilaustietoja kohdasta Lisävarusteet.
  3. Valitse pestävien liuskojen määrä painamalla "Rows"-näppäintä, jonka jälkeen voit tehdä säätöjä painamalla "+" tai "-". Paina "Rows"-näppäintä, kun haluat palata "Digene Wash Ready" - tai "P1"-tilaan.
  4. Aloita toiminto painamalla "Start/Stop".
  5. Pesuri suorittaa kuusi täyttö- ja aspirointijaksoa, joihin kuuluu noin 10 minuuttia. Koska ohjelmaan sisältyy lyhyt tauko, varo poistamasta kuoppalevyä liian aikaisin. Kun automaattinen kuoppalevypesuri on päättänyt pesun, näyttöön tulee teksti "Digene Wash Ready tai "P1".
  6. Ohjelman päätyttyä poista kuoppalevy pesurista. Kuoppalevyn tulee näyttää valkoiselta, eikä kaivoissa saa olla vaaleanpunaisia nestejämiä.

## Manuaalinen pesumenetelmä

- Huomautus:** Riittämätön pesu voi aiheuttaa taustan lisääntymistä ja vääriä positiivisia tuloksia (alkalisen fosfataasin jäämien vuoksi). Pesulaitetta käytettäessä tulee varmistaa tehokas pesu siten, että laite asetetaan vähintään 61 cm ja enintään 91 cm pesualueen yläpuolelle niin, että kuoppalevy on 61–91 cm pesulaitteen alapuolella pesun aikana. Pesulaitteen sulkuhanan tulee olla täysin asennossa "open" (auki), kun sitä käytetään ja asennossa "off" (pois päältä), kun sitä ei käytetä. Käytön aikana pesulaitteen tulee sisältää vähintään 1,0 litraa pesupuskuriliuosta riittävän paineen varmistamiseksi.
1. Poista detekointireagenssi 1 kaivoista asettamalla puhtaita Kimtowels-pyyhkeitä tai vastaavia vähänukkaisia paperipyyhkeitä kuoppalevyn päälle ja kääntämällä kuoppalevy varovasti ylösalaisin. Varmista ennen ylösalaisin kääntämistä, että paperi on kosketuksessa koko kuoppalevyn pintaan. Anna kuoppalevyn valua 1–2 minuutin ajan. Kuivaa hyvin puhtailla Kimtowels-pyyhkeillä tai vastaavilla vähänukkaisilla paperipyyhkeillä. Hävitä käytetyt vähänukkaiset paperipyyhkeet huolellisesti myöhempien vaiheiden alkalisen fosfataasikontaminaation välttämiseksi.
  2. Pesulaitetta käytettäessä pese kuoppalevy käsin kuusi kertaa. Pese jokainen kaivo niin että se tulvii yli, jotta detekointireagenssi 1 saadaan poistetuksi kaivojen huipuista. Aloita peseminen kaivosta A1 ja jatka serpentiinimäisesti oikealle ja alaspäin. Kun kaikki kaivot ovat täynnä, dekantoi neste viemärialtaaseen voimakkaalla alaspäin suuntautuvalla liikkeellä. Aloita toinen pesu kaivosta H12 ja siirry serpentiinimäisesti vasemmalle ja ylöspäin. Toista tämä kahden pesun sekvenssi vielä kaksi kertaa, jolloin saat yhteensä kuusi pesua kaivoa kohti.
  3. Pesun jälkeen kuivaa kuoppalevy kääntämällä se ylösalaisin puhtaille Kimtowels-pyyhkeille tai vastaaville vähänukkaisille paperipyyhkeille ja kopauttamalla sitä napakasti kaksi tai kolme kertaa. Vaihda vähänukkaiset paperipyyhkeet ja kuivaa uudelleen. Jätä kuoppalevy valumaan ylösalaisin 5 minuutiksi. Kuivaa kuoppalevy vielä kerran.
  4. Kuoppalevyn tulee näyttää valkoiselta, eikä kaivoissa saa olla vaaleanpunaisia nestejämiä.

## SIGNAALIN VAHVISTUS

### Huomautuksia:

- Ota käyttöön uusi pari puuterittomia suojakäsineitä käsitellessäsi detekointireagenssi 2:ta.
  - Detekointireagenssi 2:n kontaminaation välttämiseksi ota kertakäyttöiseen reagenssialtaaseen reagenssista **vain** sen suuruinen alikvootti, mikä tarvitaan määrittämisen suorittamiseksi. Ks. kohta *Reagenssin valmistus ja säilytys*. **Detekointireagenssi 2:ta EI SAA palauttaa alkuperäiseen pulloon. Käyttämätön aine on hävitettävä.**
  - Detekointireagenssi 2:n lisäämisen tulee tapahtua keskeytyksettä. Kaikkien kaivojen inkubointiajankohtien tulee olla mahdollisimman lähekkäin.
  - Varo koskemasta mikrokaivon seinämiin tai roiskuttamasta reagenssia takaisin kärjille, jotta näytteet eivät ristiinkontaminoituisi (Ks. kuva 1).
1. Annostele 8-kanavaisella pipetillä huolellisesti 75 µl detekointireagenssi 2:ta kuhunkin kuoppalevyn kaivoon edellä kuvattua käänteistä pipetointimenetelmää noudattaen. *Kaikkien kaivojen värin tulee muuttua keltaiseksi.* Varmista kaivojen tarkka täyttyminen tarkkailemalla värin voimakkuutta. Värin voimakkuuden tulee olla sama kaikissa kaivoissa.
  2. Peitä kuoppalevyt kuoppalevyn kannella tai puhtaalla Parafilmillä (tai vastaavalla) ja inkuboi 20–25 °C:ssa 15 minuutin ajan. Vältä suoraa auringonvaloa.
  3. Lue kuoppalevy QIAGENin hyväksymällä luminometrillä 15 minuutin kuluttua inkuboinnista (ja viimeistään 30 minuutin kuluttua inkuboinnista).
  4. *digene*-analyysimäärittämissuositukset sallii määrittämiselle relevantin informaation suoran syöttämisen taulukkolaskentaohjelmaan.
  5. Jos ei ole käytetty koko kuoppalevyä, poista käytetyt mikrokaivot kuoppalevyn pidikkeestä, huuhtelee pidike tislattulla tai deionisoidulla vedellä perusteellisesti, kuivaa ja pane talteen seuraavaa koetta varten.

## ANALYYSIN KALIBROINNIN VERIFIOINTIKRITEERIT

Analyysin kalibroinnin verifiointilla on tarkoitus varmistaa, että reagenssit ja toimitetut kalibraattori- ja laatukontrolliaineet toimivat oikein ja mahdollistavat analyysin raja-arvon (Cutoff value, CO) tarkan määrittämisen. Verifiointikriteerit lasketaan automaattisesti ja ne verifoidaan *digene*-analyysimäärittämissuosituksella. *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe vaatii kalibroinnin jokaisen analyysin yhteydessä. Siksi on välttämätöntä verifioida kukin analyysi käyttämällä seuraavia kriteerejä. Tämän verifiointimenettelyn tarkoituksena ei ole korvata sisäistä laaduntarkkailukoekäytäntöä.

1. Negatiivinen kalibraattori  
Negatiivinen kalibraattori tulee kussakin analyysissä tarkistaa kolme kertaa. Analyysin jatkamiseksi negatiivisen kalibraattorin keskimääräisen RLU-arvon on oltava  $\geq 10$  RLU ja  $\leq 150$ . Negatiivisen kalibraattorin replikaattien osoittaman variaatiokertoimen (%CV) tulee olla  $\leq 25$  %. Jos %CV on  $> 25$  %, ohjelmisto hylkää poikkeavana tuloksena sen replikaatin, jolla on keskiarvosta kauimpana oleva RLU-arvo, ja keskiarvo ja %CV lasketaan uudelleen kahden jäljellä olevan replikaatin arvoilla. Uudelleen lasketun %CV-arvon tulisi olla  $\leq 25$  %. **Muussa tapauksessa analyysin kalibroinnin verifiointi on epäpätevä ja kaikki potilasnäytteet on analysoitava uudelleen. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.**
2. Positiivinen kalibraattori  
Positiivinen kalibraattori tulee kussakin analyysissä tarkistaa kolme kertaa. Positiivisen kalibraattorin replikaattien %CV-arvon tulee olla  $\leq 20$  %. Jos %CV on  $> 20$  %, ohjelmisto hylkää poikkeavana tuloksena sen replikaatin, jolla on keskiarvosta kauimpana oleva RLU-arvo, ja keskiarvo ja %CV lasketaan uudelleen kahden jäljellä olevan replikaatin arvoilla. Uudelleen lasketun %CV-arvon tulee olla  $\leq 20$  %. **Muussa tapauksessa analyysin kalibroinnin verifiointi on epäpätevä ja kaikki potilasnäytteet on analysoitava uudelleen. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.**



### 3. Keskimääräinen PC/keskimääräinen NC -suhdeluku

Positiivisen kalibraattorin replikaattien (keskimääräinen PC) keskiarvoa ja negatiivisen kalibraattorin replikaattien (keskimääräinen NC) keskiarvoa käytetään keskimääräinen PC/keskimääräinen NC -suhdeluvun määrittämiseen. Ohjelmisto laskee keskimääräisen PC/keskimääräisen NC -suhdeluvun. Tämän suhdeluvun on täytettävä seuraavat kriteerit kalibraatioanalyysin verifiointiseksi **ennen kuin näytetuloksia voidaan tulkita**. Jos suhdeluku on  $\geq 2,0$  ja  $\leq 20$ , ohjelmisto siirtyy seuraavaan vaiheeseen. Jos suhdeluku on  $< 2,0$  tai  $> 20$ , **analyysikalibroinnin verifiointi on epäpätevä ja kaikki potilasnäytteet on analysoitava uudelleen. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.**

**Huomautus:** Kalibraattoreiden toistettavuuden toteamiseksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeissa, *digene* Microplate Luminometer 2000 -laitteistolla (DML 2000) sisäisissä tutkimuksissa saadut tulokset koottiin, jotka käsittivät 63 Rapid Capture -järjestelmään perustuvaa analyysia ja 43 manuaaliseen menetelmään perustuvaa analyysia (ks. taulukko 3). Saadut tulokset osoittivat, että positiivisen kalibraattorin osalta näiden 106 analyysin keskimääräinen %CV-luku oli yhtä suuri tai pienempi kuin 5,8 % ja että negatiivisen kalibraattorin keskimääräinen %CV-luku oli yhtä suuri tai pienempi kuin 11,2 %. Vaikka manuaalisten analyysien negatiivisen kalibraattorin RLU-keskiarvon enimmäisarvoksi saatiin 88, RCS-sovelluksen on osoitettu tuottavan NC RLU -arvoja, jotka ovat hieman manuaalisia arvoja suurempia. Tämän on osoitettu olevan vailla vaikutusta näillä vaihtoehtoisilla menetelmillä tuotettuihin koearvoihin. Negatiivisen kalibraattorin keskimääräiseksi RLU-kynnysarvoksi on määritetty 250 RLU-yksikköä perustuen *digene* HC2 CT/GC DNA -koejärjestelmän laajan testauksen yhteydessä antamaan negatiivisen kalibraattorin keskimääräisen RLU-arvon  $\pm 3SD$ -parametrin tilastolliseen laskentaan. Ko. testaus tehtiin RCS-sovelluksen kehittämisen yhteydessä. Tämän  $\pm 3SD$ -poikkeaman ylärajaa laajennettiin 20 %, jotta voitiin varmistaa, että NC RLU-kynnysarvo voitaisiin saavuttaa tavanomaisessa kliinisessä työssä.

NC:n keskimääräisen RLU-arvon tulisi käytännössä olla todettavissa arvoilla  $\leq 150$  ja CV:n arvoilla  $\leq 25$  %. Jokaisen laboratorion tulisi seurata laaduntarkkailun ja kalibroinnin toteutumista noudattaen National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) -komitean asiakirjaa C24-2A. RCS-sovelluksen antama keskimääräinen RLU-arvo voi joskus ylittää arvon 150, jolloin tapahtuu mahdollisesti myös vastaavaa laskua PC/NC-arvossa, minkä taulukon 3 mukaan on todettu kalibroinnin jälkeen johtavan 7,11 keskiarvoon. Tässä tapauksessa tulokset voidaan hyväksyä, mikäli NC:n RLU-arvo on  $\leq 250$  ja PC/NC-suhdeluku jää alueelle  $\geq 2,0$  ja  $\leq 20$ . Mikäli NC RLU ylittää arvon 250 tai PC/NC jää alle arvon 2,0 tai ylittää arvon 20, analyysi on epäpätevä.

**Taulukko 3.** Tilastollinen yhteenveto negatiivisen kalibraattorin ja positiivisen kalibraattorin arvoista käytettäessä RCS-sovellusta ja manuaalista analyysimenetelmää.

Menetelmä	Kuoppa- levyjen lkm	PC/NC-suhteen laskennalliset keskiarvot				Koesarjan laatuksentrollit (keskim. RLU/CO)	
		Keskiarvo	Mediaani	Min	Max	QC CT	QC GC
RCS	63	7,11	6,87	5,24	10,23	3,8	0,24
Manuaal.	43	6,75	5,70	4,60	11,25	3,5	0,16

Menetelmä	Kalib- raattori	RLU, laskennalliset keskiarvot				Keskim. laskennallinen %CV
		Keskiarvo	Mediaani	Min.	Max	
RCS	Negatii- vinen	52	50	29	84	9,2
	Positiivi- nen	362	369	179	505	5,3
Manuaal.	Negatii- vinen	41	37	28	88	11,2
	Positiivi- vinen	275	274	135	428	5,8

## RAJA-ARVON LASKENTA

Kun analyysi on verifioitu yllä esitettyjen kriteerien mukaisesti, päteviä positiivisen kalibraattorin replikaatteja käytetään positiivisten näytteiden raja-arvojen RLU:n määrittämiseen. Raja-arvon RLU lasketaan seuraavalla tavalla:

Raja-arvon RLU = keskimääräisen positiivisen kalibraattorin RLU

Esimerkki raja-arvon laskennasta:

	NC RLU -arvot	PC RLU -arvot
	97	312
	101	335
	91	307
Keskim. arvo	96	318
%CV	4,9	4,7
Keskim. PC / keskim. NC	Ei koske	3,31

Näin ollen raja-arvon RLU on (keskim. PC) = 318

*digene* analyysimäärittämissuunnitelma konvertoi kaikkien näytteiden RLU-arvot suhdeluvuiksi ao. raja-arvon (CO) RLU:hun nähden. Esim. kaikki analyysit tulisi ilmaista näytteen RLU/CO-arvona.

**Huomautus:** Kaikkien testattujen näytteiden RLU/CO-arvot ja positiiviset/negatiiviset tulokset raportoidaan *digene* analyysimäärittämissuunnitelman data-analyyssiraportissa.

## LAADUNTARKKAILU

Laaduntarkkailunäytteet sisältyvät *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeeseen. Ks. eränumeroiden ja laaduntarkkailukontrollien viimeisten käyttöpäivien syöttöön liittyviä lisätietoja käytetyn *digene* analyysimäärittämissuunnitelman käyttöoppaasta. Näiden kontrollien tulee sisältyä jokaiseen analyysiin, ja jotta analyysia voidaan pitää pätevänä, kunkin laatukontrollin RLU/CO-arvon pitää jäädä oheisten hyväksyttävien vaihteluväliden sisälle. **Jos laatukontrollit eivät ole näiden vaihteluväliden sisällä, analyysi on epäkelpo ja se on toistettava.** Näin ollen epäkelpojen analyysien potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

	QC CT	QC GC
Min RLU/CO	1,00	0
Max RLU/CO	20,00	0,9999
Max %CV	20,00	20,00

- Pakkaukseen kuuluvat laatukontrollit ovat kloonattuja CT- ja GC DNA -kohteita ja ne koostuvat samasta plasmidirakenteesta kunkin yksittäisen organismin osalta (yksi CT:lle ja yksi GC:lle) kuin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeeseen kuuluvassa positiivisessa kalibraattorissa.
- Tämä laatukontrollimateriaali ei ole sama kuin CT-organismi näytematriisissa eikä se sovellu laatukontrolliksi *digene* näytteenkuljetusaineen tai PreservCyt-liuoksen prosessoinnissa.
- Positiivista kalibraattoria käytetään näytetulosten normalisointiin määrittämällä raja-arvon RLU. Tähän pakkaukseen kuuluvat laatukontrollit tulee käyttää sisäiseen laaduntarkkailuun. Lisälaatukontrolleja voidaan testata paikallisten, alueellisten ja/tai kansallisten tai akkreditoitujen organisaatioiden määräyksissä annettujen ohjeiden tai vaatimusten mukaisella tavalla.
- Näytteiden liukenemisen ja denaturoinnin testaamiseksi laboratorioiden tulisi säännöllisin välein lisätä >100 000 *Chlamydia trachomatis* -alkeiskappaletta (suosittelemme E- tai J-serovareja ja vastaavia ATCC:sta saatavissa olevia muotoja kuten ATCC VR348B ja VR886) tuoretta näytteenkuljetusainetta sisältävään putkeen. Inkuboi vähintään 1 tunti ennen testausta samalla tavalla kuin normaalit kliiniset näytteet. Tuloksena saadaan RLU/CO  $\geq 2,50$  edellyttäen että näyte on asianmukaisesti prosessoitu. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kaupallisesti saatavia CT-organismeja sisältäviä näytteiden koepaneeleja.

5. Hyväksyttävät negatiivisten ja positiivisten kalibraattorien vaihteluvälit on määritetty ainoastaan QIAGENin hyväksymille luminometreille. Negatiiviset ja positiiviset kalibraattorit monitoroivat siltä varalta, että reagenssit epäonnistuisivat merkittävästi, eivätkä takaa analyysin raja-arvon tarkkuutta.

## NÄYTTEIDEN TULOSTEN TULKINTA

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen kriteerien perusteella:

1. Näytteitä, joiden RLU/CO-suhdeluvut ovat  $\geq 2,50$  pidetään "positiivisina *Chlamydia trachomatis* DNA:n osalta". *Chlamydia trachomatis* -organismien elinvoimaisuutta ja/tai infektoimiskykyä ei voida johtaa, koska elinkelpoisten organismien puuttuessa kohde-DNA voi jäädä vaikuttamaan.
2. Näytteet, joiden RLU/CO -suhdeluvut ovat  $< 1,00$ , eivät sisällä *Chlamydia trachomatis* DNA:ta tai niiden sisältämät DNA-määrät jäävät analyysin detekointirajan alapuolelle. Nämä tulee tulkita ja raportoida "Chlamydia trachomatis DNA:ta ei havaittu" -tapauksina. Negatiivinen tulos ei sulje pois *Chlamydia trachomatis* -infektiota, koska tulokset ovat riippuvaisia näytteiden riittävästä keräämisestä ja tutkittavan riittävästä DNA:n määrästä.
3. Näytteitä, joiden RLU/CO -suhdeluvut ovat  $\geq 1,00$  ja  $< 2,50$ , pidetään epämääräisinä. Tuloksia voidaan pitää presumptiivisesti positiivisina *Chlamydia trachomatis* DNA:n suhteen. Suosittelemme kuitenkin potilaan uuden näytteen uusintakoetta tai täydentävää koetta jotakin vaihtoehtoista testausmenetelmää käyttäen, koska em. RLU/CO-arvoilla saatu positiivinen koetulos aikaansaa prediktivisen arvon huononemisen.\*
4. Suosittelemme positiivisten tulosten verifiointia jollakin toisella menetelmällä, mikäli *Chlamydia trachomatis* -infektio on epävarma tai kyseenalaistettu. Tähän kokeeseen liittyvät analyttiset selvitykset ovat osoittaneet presumptiivista ristiin reagoitua tiettyjen toisten DNA-sekvenssien kanssa, josta voi olla seurauksena väärä positiivinen tulos. Vaikka frekvenssiä, jolla pBR322- ja muut DNA-sekvenssit esiintyvät sukupuolielimistä otetuissa näytteissä ei ole lopullisesti selvitetty, pBR322:n osalta ei havaittu mitään ristiin reagoitua 1818 potilaan populaatiossa, jossa testattiin 106 pBR322:n suhteen CT-positiivista näytettä. Kyse on edustavasta populaatiosta ja tulokset viittaavat siihen, että ne eivät välttämättä kuvasta pBR322:n esiintymisfrekvenssiä kaikissa testatuissa populaatioissa. Ks. kohta Analyttinen spesifisyys lisätietojen osalta.

\* *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen kliinisen arvioinnin yhteydessä todettiin, että 7 tulosta 14 tuloksesta, jotka asettuivat tälle epäselvälle alueelle, verifioitiin viljelyn, DFA:n tai Polymerase Chain Reaction (PCR) -kokeen kautta positiivisiksi; loput 7 olivat nähtävästi väriä positiivisia näytteitä. Nämä 7 väärää positiivista näytettä kuitenkin sisältyivät niiden vain 11 näytteen joukkoon, joita ei ollut todettu negatiivisiksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa, kun toisaalta oli kaikkiaan 1643 näytettä, joiden ei viljelyssä verifioitu sisältävän CT-organismia (oikein verifioituja 99,3 % suhteessa viljely-/DFA-kokeeseen, kun tarkasteltiin PCR-kokeen tuloksia). Myöhemmin suoritetussa arvioinnissa nämä 7 aluksi positiiviseksi todettua näytettä antoivat RLU/CO-suhdeluvuksi arvon välillä 1,00-2,50 ja 3 näistä näytteistä todettiin kaikissa muissa kokeissa negatiivisiksi (kaikki 3 näytettä antoivat negatiivisen tuloksen, kun *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe toistettiin kahdesti). Lpput 4 näytettä todettiin positiivisiksi viljely-/DFA-/PCR-kokeissa ja molemmat *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen toistot antoivat RLU/CO-suhdeluvuksi arvon, joka oli  $\geq 1,00$ .

## MENETELMÄN RAJOITUKSET

**Ks. menetelmän muihin rajoituksiin liittyviä lisätietoja *Rapid Capture System* -järjestelmän käyttöoppasta erityisesti, kun järjestelmää käytetään lukuisten näytteiden tehotestaamiseen.**

- Vain *in vitro* diagnostiseen käyttöön.
- Luotettavien koetulosten saamiseksi tulee *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koemenetelmää, laaduntarkkailua ja näytetulosten tulkintaa seurata tarkasti.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta voidaan käyttää vain sellaisten kohdunkaulanäytteiden tutkimiseen, jotka on otettu *digene* HC2 DNA -näytteenottimella ja asetettu STM-

näytteenkuljetusaineeseen, sellaisten kohdunkaulanäytteiden tutkimiseen, jotka on otettu *digene* Female Swab Specimen Collection -pakkauksen välineillä ja asetettu STM-näytteenkuljetusaineeseen, tai sellaisten näytteiden tutkimiseen, jotka on otettu harjamaisella keräyslaitteella ja asetettu PreservCyt-liuokseen.

- Tämän testin tulokset tulee tulkita vain yhdessä käytettävissä olevien potilaan kliinisen arvioinnin ja muiden menetelmien tuloksien kanssa.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe tuottaa kvalitatiivisia tuloksia. Potilaan näytteestä saadulla raja-arvon yläpuolelle sijoittuvan numeerisen arvon (suhdeluvun) ei ole osoitettu korreloivan potilasnäytteessä olevan CT DNA:n määrän kanssa.
- Negatiivinen tulos ei poissulje *Chlamydia trachomatis* -infektion mahdollisuutta, koska detekointi on riippuvainen näytteessä olevien organismien lukumäärästä ja siihen voivat myös vaikuttaa näytteenottomenetelmät, potilaan ominaisuudet, infektiovaihe ja/tai *Chlamydia trachomatis* -kanta.
- Kuten muitakin viljelyyn perustumattomia menetelmiä käytettäessä, positiivisen näytteen ei voida tulkita osoittavan elinkelpoisen *Chlamydia trachomatis* -organismien olemassaoloa.
- *digene* HC2 CT ID DNA Test -koetta ei ole tarkoitettu hoidon onnistumisen mittaamiseen.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe on validoitu käytettäväksi vain automaattisen kuoppalevytestin kanssa ja analyysiohjeissa spesifioituja asetuksia soveltaen. Kyseinen validointitutkimus tehtiin sisäisesti QIAGEN-yhtiössä ja yhtiö on arkistoinut sitä tukevan aineiston. Muita kuoppalevytestejä ja muita kuoppalevytestiasetuksia ei hyväksytä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeeseen.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen tulosten vaihtelevuuden minimoimiseksi on välttämätöntä, että analyysia suorittava laboratoriohenkilöstö saavuttaa teknisesti riittävän pätevyyden. Kunkin laboratorion tulee lisäksi seurata niissä suoritettujen analyysien teknistä pätevyyttä. Tämän toteuttamiseksi suositellaan, että laboratoriot säännöllisin välein suorittavat kokeita, joissa käytetään kaupallisesti saatavia CT-organismeja tai CT DNA:ta sisältäviä näytesarjoja ja että nämä kokeet toteutetaan noudattaen ao. laitoksen laaduntarkkailumenetelmiä.

## ODOTETTAVISSA OLEVAT TULOKSET

### ESIINTYVYYS

*Chlamydia trachomatisin* suhteen positiivisten näytteiden esiintyvyys vaihtelee ja siihen vaikuttavat eri populaatiosta riippuvat tekijät, kuten ikä, sukupuoli ja riskitekijät. Kliinisessä tutkimuspopulaatiossa todettu *Chlamydia trachomatisin* esiintyvyys vaihteli välillä 3,3–14,6 %, kun käytettiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta. Esiintyvyys laskettiin olettaen, että tutkimuksessa mukana olleet ekvivalentin tuloksen antanutta 14 näytettä olivat positiivisia CT DNA:n suhteen (taulukko 4). Näistä 14:sta näytteestä seitsemän todettiin positiiviseksi CT:n suhteen viljely-/DFA-kokeessa tai CT PCR -kokeessa.

**Taulukko 4.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa saatujen positiivisten tulosten esiintyvyys tutkimuskeskuksittain.

Tutkimuskeskus	Posit. lkm/Testattujen lkm	Esiintyvyys-%
1	67/460	14,6
2	42/307	13,7
3	38/308	12,3
4	23/414	5,6
5	11/329	3,3
Yhteensä	181/1818	10,0

## POSITIIVISET JA NEGATIIVISET PREDIKTIIVISET ARVOT

Eri esiintyvyyssarvojen hypoteettiset positiiviset ja negatiiviset prediktiiviset arvot (jäljempänä PPV ja NPV) *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta käytettäessä laskettiin käyttämällä kokonaisherkkyyssarvoa ja spesifisyyttä suhteessa CT-viljelyyn/DFA-kokeeseen, jotka määritettiin erikseen kullekin *digene* HC2 – DNA -näytteenottimelle (kohdunkaulaharja) otetulle näytteelle ja niille näytteille, jotka otettiin *digene* Female Swab Specimen Collection Kit -välinesarjalla (vanutuppo). Taulukossa 5 on esitetty hypoteettiset PPV-arvot ja NPV-arvot harjalla otetuille näytteille (kokonaisherkkyyks 97,71 % ja spesifisyys 98,15 %) ja taulukossa 6 on esitetty hypoteettiset PPV-arvot ja NPV-arvot vanutupponäytteille (kokonaisherkkyyks 87,50 % ja spesifisyys 98,36 %)

**Taulukko 5.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen hypoteettiset prediktiiviset arvot yleisyyden eri prevalenssitasoilla (harja).

Esiintyvyytaso (%)	Herkkyys (%)	Spesifisyys (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	97,7	98,2	73,5	99,9
10	97,7	98,2	85,4	99,7
15	97,7	98,2	90,3	96,6
20	97,7	98,2	93,0	99,4

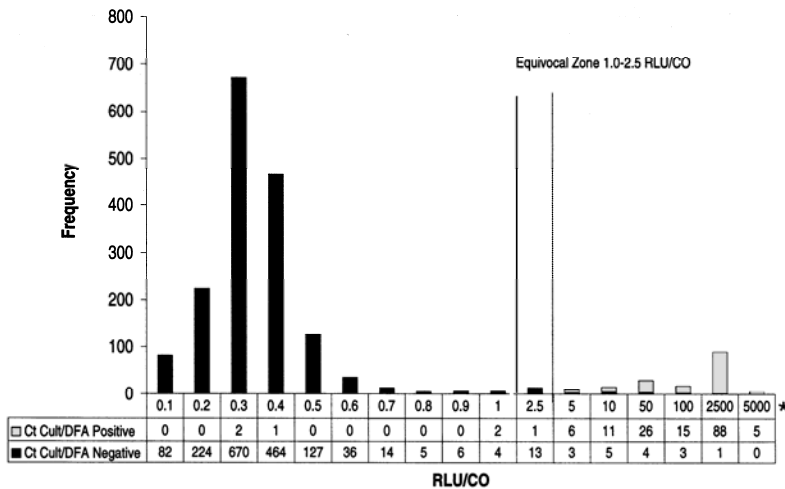
**Taulukko 6.** *digene* HC2 CT-ID DNA -kokeen hypoteettiset prediktiiviset arvot yleisyyden eri prevalenssitasoilla (vanutuppo).

Esiintyvyytaso (%)	Herkkyys (%)	Spesifisyys (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	87,5	98,4	73,4	99,4
10	87,5	98,4	83,2	98,9
15	87,5	98,4	87,2	98,4
20	87,5	98,4	89,3	97,9

## FREKVENSSIJAKAUMA: *digene* HC2 CT-ID DNA TEST -KOKEEN RLU/CO-TULOKSET

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen RLU/CO-suhdelukujen jakauma useita laboratorioita käsittävissä kliinisessä tutkimuksessa on esitetty ohessa (kuvio 1). Näihin tietoihin sisältyvät näytteet, joille tehtiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe and joille oli saatavissa CT- viljely/DFA-tulokset (n=1818). Tulosten tulkinta suoritettiin seuraavien kriteereiden pohjalta: Näyte katsottiin negatiiviseksi, jos sen RLU/CO-arvo oli <1,00. Näyte katsottiin positiiviseksi, jos sen RLU/CO-arvo oli ≥2,50. Näytteitä, joiden RLU/CO-arvojen suhdeluvut olivat ≥1,00 ja <2,50 pidettiin epä määräisinä.

**Kuvio 1.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen RLU/CO-tulosten frekvenssijakauma.



RLU/CO-suhdeluissa havaittiin selkeä ero *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen positiivisten tulosten ja kokeen negatiivisten tulosten välillä. Yhdeksänkymmentäyhdeksän prosenttia (99 %, 1620/1637) *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen negatiivisista tuloksista sai RLU/CO-arvon, joka oli välillä 0 ja 0,7. Yleisesti ottaen, näytetuloksista <1 % (14/1818) jäivät analyysin ekvivokaalivyöhykkeelle, ja niistä 7,1 % (1/14) osoittautui positiiviseksi CT-viljelyssä/DFA-kokeessa, ja toiset 6 (46 %) osoittautuivat positiiviseksi CT-PCR-kokeessa. Kahdeksänkymmentäviisi prosenttia (85 %, 142/167) *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen positiivisista tuloksista sai RLU/CO-arvon, joka oli välillä 10 ja 5000.

## SUORITUKSEN OMINAISPIIRTEET

### KLIINISEN KOKEEN NÄYTEKOHTAISET TULOKSET

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suorituksen ominaispiirteet määritettiin vertaamalla analyysin antamia tuloksia Chlamydia-viljelyn ja DFA-testauksen antamiin tuloksiin. Potilailta kerättiin 1818 näytettä ja myöhemmin nämä näytteet testattiin 5 eri tutkimuskeskuksessa, mukaan lukien sukupuolitauti-, perhesuunnittelu- ja obstetris-gynekologisissa klinikoissa. DFA-testaus suoritettiin CT-viljelyn näyteenkuljetusaineen sedimentistä sentrifugoinnin jälkeen niistä näytteistä, jotka oli todettu *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa positiiviseksi ja viljelyssä negatiiviseksi. Sen jälkeen PCR-testaus suoritettiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa positiiviseksi /viljelyssä negatiiviseksi/DFA-kokeessa negatiiviseksi osoittautuneilla näytteillä. *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen tuloksia ei ratkaistu PCR-kokeen tuloksilla ja siksi PCR-kokeella ei ollut vaikutusta *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suorituksen ominaisuuksien laskentaan. Kahta eri luminometrimallia (Dynex Model MLX ja ML2200) käytettiin tuottamaan dataa ja määrittäessä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suorituksen ominaisuudet. *digene* HC2 DNA -näytteenottimella (kohdunkaulaharja) otettujen kliinisen kokeen näytteiden tulokset on esitetty taulukossa 7 ja *digene* Female Swab Specimen Collection -vanutuppo-menetelmällä otettujen näytteiden tulokset on esitetty taulukossa 8.

**Taulukko 7.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen tulokset verrattuna CT-viljelyn/DFA-kokeen tuloksiin harjalla otettujen näytteiden osalta. Suorituksen ominaisuudet on esitetty ohessa laskemalla RLU/CO-raja-arvoa 1,0 käyttäen. Suluissa esitetyt arvot osoittavat suoritustasoa ottaen huomioon RLU/CO-raja-arvon 2,5. 95 %:n luotettavuusvälit sisältävät molemmat vaihteluvälit tapauksissa, joissa piste-estimaatit poikkesivat arvioituista RLU/CO-raja-arvoista.

Tutkimuskeskus	CT-ID : Viljely: DFA: n	POS POS Ei koske	POS NEG POS	POS NEG NEG <sup>1</sup>	NEG POS Ei koske	NEG NEG Ei koske <sup>3</sup>	Herkkyys	Spesifisyys	NPV	PPV	CT-ID+ Vilj.+ DFA- PCR <sup>2+</sup>
<b>Oireelliset</b>											
1	351	42	5	7 (4)	2	295 (298)	95,92 86,0–99,5	97,68 (98,68) 95,3–99,6	99,33 97,6–99,9	87,04 (92,16) 75,1–97,8	5/7 (3/4)
95 % CI											
2	192	11	5	6 (5)	0	170 (171)	100,00 79,4–100	96,59 (97,16) 92,7–99,1	100 97,9–100	72,73 (76,19) 49,8–91,8	6/6 (5/5)
95 % CI											
3	219	34	0	3 (1)	1	181 (183)	97,14 81,5–100	98,38 (99,46) 94,4–100	99,45 (99,46) 97,0–100	91,89 (97,14) 78,1–99,9	1/2 <sup>4</sup> (1/1)
95 % CI											
4	177	6	3 (2)	0	0 (1)	168	100,00 (88,89) 51,8–100	100,00 97,8–100	100,00 (99,41) 96,8–100	100,00 63,1–100	Ei koske
95 % CI											
<b>Kaikki</b>	<b>939</b>	<b>93</b>	<b>13 (12)</b>	<b>16 (10)</b>	<b>3 (4)</b>	<b>814 (820)</b>	<b>97,25 (96,33)</b> <b>90,9–99,4</b>	<b>98,07 (98,80)</b> <b>96,9–98,9</b>	<b>99,63 (99,51)</b> <b>98,8–99,9</b>	<b>86,89 (91,30)</b> <b>79,6–95,8</b>	<b>12/15<sup>4</sup> (9/10)</b>
<b>95 % CI</b>											
<b>Oireettomat</b>											
1	101	8	0	2 (0)	0	91 (93)	100,00 63,1–100	97,85 (100,00) 92,5–100	100,00 96,0–100	80,00 (100,00) 44,4–100	0/2 (Ei koske)
95 % CI											
2	12	1	0	1	0	10	100,00 2,50–100	90,91 58,7–99,8	100,00 69,2–100	50,00 1,3–98,7	1/1
95 % CI											
3	81	3	0	0	0	78	100,00 29,2–100	100,00 95,4–100	100,00 95,4–100	100,00 29,2–100	Ei koske
95 % CI											
4	236	9	1	4 (2)	0	222 (224)	100,00 69,2–100	98,23 (99,12) 95,5–99,9	100,00 98,4–100	71,43 (83,33) 41,9–97,9	3/4 <sup>4</sup> (1/1 <sup>4</sup> )
95 % CI											
5	1	0	0	0	0	1	Ei koske 2,5–100	100,00 2,5–100	100,00 2,5–100	Ei koske Ei koske	Ei koske
95 % CI											
<b>Kaikki</b>	<b>431</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>7 (3)</b>	<b>0</b>	<b>402 (406)</b>	<b>100,00</b> <b>84,6–100</b>	<b>98,29 (99,27)</b> <b>96,5–99,9</b>	<b>100</b> <b>99,1–100</b>	<b>75,86 (88,00)</b> <b>56,5–97,5</b>	<b>4/7<sup>4</sup> (2/3<sup>4</sup>)</b>
<b>95 % CI</b>											
<b>Potilaspopulaatio, yhteensä</b>											
1	452	50	5	9 (4)	2	386 (391)	96,49 87,9–99,6	97,72 (98,99) 95,7–99,7	99,48 (99,49) 98,2–99,9	85,90 (93,22) 75,0–98,1	5/9 (3/4)
95 % CI											
2	204	12	5	7 (6)	0	180 (181)	100,00 80,5–100	96,26 (96,79) 92,4–98,8	100,00 98,0–100	70,83 (73,91) 48,9–89,8	7/7 (6/6)
95 % CI											
3	300	37	0	3 (1)	1	259 (261)	97,37 86,2–99,9	98,86 (99,62) 96,7–100	99,62 97,9–100	92,50 (97,37) 79,6–99,9	1/2 <sup>4</sup> (1/1)
95 % CI											
4	413	15	4 (3)	4 (2)	0 (1)	390 (392)	100,00 (94,74) 74,0–100	98,98 (99,49) 97,4–99,9	100,00 (99,75) 98,6–100	82,61 (90,00) 61,2–98,8	3/3 <sup>4</sup> (1/1 <sup>4</sup> )
95 % CI											
5	1	0	0	0	0	1	Ei koske 2,5–100	100,00 2,5–100	100,00 2,5–100	Ei koske Ei koske	Ei koske
95 % CI											
<b>Kaikki</b>	<b>1370</b>	<b>114</b>	<b>14 (13)</b>	<b>23 (13)</b>	<b>3 (4)</b>	<b>1216 (1226)</b>	<b>97,71 (96,85)</b> <b>92,4–99,5</b>	<b>98,15 (98,95)</b> <b>97,2–99,4</b>	<b>99,75 (99,67)</b> <b>99,2–100</b>	<b>84,77 (90,71)</b> <b>78,0–95,0</b>	<b>16/21<sup>5</sup> (11/12<sup>4</sup>)</b>
<b>95 % CI</b>											

1 Kahdessa tapauksessa edellytettiin DFA-koetta, mutta sitä ei suoritettu.

2 Nämä tiedot on annettu vain tiedoksi; näytteiden tuloksia ei ratkaistu PCR:llä.

3 Yksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa negatiiviseksi osoittautunut negatiivinen viljelynäyte testattiin turhaan DFA-kokeella ja antoi positiivisen tuloksen. Tämä tulos sisällytettiin suorituslaskelmiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen vääränä negatiivisena tuloksena.

4 PCR-koetta ei suoritettu yhdelle näytteelle.

5 Yhdessä tapauksessa edellytettiin DFA-koetta, mutta sitä ei suoritettu.

NA = Ei koske.

**Taulukko 8.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen tulokset verrattuna CT-viljelyn/DFA-kokeen tuloksiin vanutupolla otettujen näytteiden osalta. RLU/CO-raja-arvoja 0,1 käyttämällä lasketut suorituksen ominaisuudet on esitetty ohessa. Suluissa esitetyt arvot osoittavat suoritustasoa ottaen huomioon RLU/CO-raja-arvon 2,5. 95 %:n luottamusväli (CI) sisältävät molemmat vaihteluvälit tapauksissa, joissa piste-estimaatit poikkesivat arviiduista RLU/CO-raja-arvoista.

Tutkimuskeskus	CT-ID : Viljely: DFA: n	POS POS Ei koske	POS NEG POS	POS NEG NEG <sup>1</sup>	NEG POS Ei koske	NEG NEG Ei koske <sup>3</sup>	Herkkyys	Spesifisyys	NPV	PPV	CT-ID+ Vilj.+ DFA- PCR <sup>2+</sup>
<b>Oireelliset</b>											
1	358	31 (28)	0	5 (3)	7 (10)	315 (317)	81,58 (73,68)	98,44 (99,06)	97,83 (96,94)	86,11 (90,32)	Ei koske
95 % CI							65,67–92,26	96,39–99,49	95,57–99,12	70,50–95,33	
2	94	10	1	3 (1)	1	79 (81)	91,67	96,34 (98,78)	98,75 (98,78)	78,57 (91,67)	2/3 (1/1)
95 % CI							61,5–99,8	89,6–100	93,2–100	49,2–100	
3	5	1	0	0	0	4	100,00	100,00	100,00	100,00	Ei koske
95 % CI							0,84–90,6	47,8–100	29,0–96,3	2,5–100	
5	152	7	0	2 (1)	0	143 (144)	100,00	98,62 (99,31)	100,00	77,78 (87,50)	0/0 <sup>4</sup> (0/0 <sup>3</sup> )
95 % CI							59,0–100	95,1–100	97,5–100	40,0–99,7	
<b>Kaikki</b>	<b>609</b>	<b>49 (46)</b>	<b>1</b>	<b>10 (5)</b>	<b>8 (11)</b>	<b>541 (546)</b>	<b>86,21 (81,03)</b>	<b>98,19 (99,09)</b>	<b>98,54 (98,03)</b>	<b>83,33 (90,38)</b>	<b>2/3<sup>4</sup> (1/1<sup>3</sup>)</b>
<b>95 % CI</b>							<b>74,62–93,85</b>	<b>96,69–99,13</b>	<b>97,15–99,37</b>	<b>71,48–91,71</b>	
<b>Oireettomat</b>											
1	61	4 (3)	0	2 (1)	0 (1)	55 (56)	100 (75,00)	96,49 (98,25)	100 (98,25)	66,67 (75,00)	Ei Koske
95 % CI							39,76–100	87,89–99,57	93,51–100	22,28–95,67	
2	10	0	0	0	0	10	Ei Koske	100,00	100,00	Ei Koske	Ei Koske
95 % CI								69,2–100	69,2–100		
3	2	0	0	1	0	1	Ei Koske	50,00	100,00	0,00	Ei Koske <sup>3</sup>
95 % CI								1,3–98,7	2,5–100	0–97,5	
4	1	0	0	0	0	1	Ei Koske	100,00	100,00	Ei Koske	Ei Koske
95 % CI								2,5–100	2,5–100		
5	176	2	0	0	0	174	100,00	100,00	100,00	100,00	Ei Koske
95 % CI							15,8–100	97,9–100	97,9–100	15,8–100	
<b>Kaikki</b>	<b>250</b>	<b>6 (5)</b>	<b>0</b>	<b>3(2)</b>	<b>0 (1)</b>	<b>241 (242)</b>	<b>100 (83,33)</b>	<b>98,77 (99,18)</b>	<b>100 (99,59)</b>	<b>66,67 (71,43)</b>	<b>Ei Koske<sup>3</sup></b>
<b>95 % CI</b>							<b>54,07–100</b>	<b>96,45–99,75</b>	<b>98,48–100</b>	<b>29,93–92,51</b>	
<b>Potilaspopulaatio, yhteensä</b>											
1	419	35 (31)	0	7 (4)	7 (11)	370 (373)	83,33 (73,81)	98,14 (98,94)	98,14 (97,14)	83,33 (88,57)	Ei Koske
95 % CI							68,64–93,03	96,21–99,25	96,21–99,25	68,64–93,03	
2	104	10	1	3 (1)	1	89 (91)	91,67	96,74 (98,78)	98,89 (91,67)	78,57 (98,78)	2/3 (1/1)
95 % CI							61,5–99,8	90,8–100	94,0–100	49,2–99,8	
3	7	1	0	1	0	5	100,00	83,33	100,00	50,00	Ei Koske <sup>3</sup>
95 % CI							2,5–100	35,9–99,6	47,8–100	1,3–98,7	
4	1	0	0	0	0	1	Ei Koske	100,00	100,00	Ei Koske	Ei Koske
95 % CI								2,5–100	2,5–100		
5	328	9	0	2 (1)	0	317 (318)	100,00	99,37 (99,69)	100,00	81,82 (90,00)	Ei Koske <sup>4</sup>
95 % CI							66,4–100	97,8–100	98,8–100	48,2–99,8	
<b>Kaikki</b>	<b>859</b>	<b>55 (51)</b>	<b>1</b>	<b>13 (7)</b>	<b>8 (12)</b>	<b>782 (788)</b>	<b>87,50 (81,25)</b>	<b>98,36 (99,12)</b>	<b>98,99 (98,50)</b>	<b>81,16 (88,14)</b>	<b>2/3<sup>5</sup> (1/1<sup>4</sup>)</b>
<b>95 % CI</b>							<b>76,85–94,45</b>	<b>97,22–99,13</b>	<b>98,01–99,56</b>	<b>69,94–89,57</b>	

1 Näytteet, jotka edellyttivät DFA-kokeen suorittamista, mutta joille koetta ei tehty, sijoitettiin tähän kategoriaan.

2 Nämä tiedot on annettu vain tiedoksi; näytteiden tuloksia ei ratkaistu PCR:llä.

3 Yhdessä tapauksessa PCR-koetta ei suoritettu.

4 Kahdessa tapauksessa PCR-koetta ei suoritettu.

5 Kolmessa tapauksessa PCR-koetta ei suoritettu.

NA = Ei koske.



*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suorituksen ominaisuudet laskettiin soveltaen raja-arvoina sekä 1,0 ja 2,5, ja ottamatta huomioon näiden käyttöohjeiden kohdassa ”Tulosten tulkinta” kuvattuja ekvivokaalivyöhykkeelle lankeavia presumptiivisia positiivisia näytteitä. Näin ollen, *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suoritusarvo voi vaihdella laboratoriokohtaisesti riippuen siitä, kuinka ekvivokaalivyöhykkeelle lankeavat arvot jakautuvat. Presumptiivisesti positiivisia näytteitä (ekvivokaalivyöhyke) voidaan testata uudelleen siten kuin näiden käyttöohjeiden kohdassa *Tulosten tulkinta* suositellaan (Kriteerit 3). Referenssitietona mainittakoon, että alle 0,8 % (14/1818) niistä näytteistä, jotka testattiin kliinisen monikeskustutkimuksen yhteydessä *digene* HC2 CT-ID DNATest -kokeen suorituksen määrittämiseksi, lankesi tälle alueelle. Lisätietoja tästä aiheesta on RLU/CO-tulosten frekvenssijakaumassa näiden käyttöohjeiden kohdassa *Odotettavissa olevat tulokset*.

Tähän mennessä ei ole saatu kokoon riittävästi tietoa, jotta voitaisiin estimoida *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen ekvivalentti herkkyys ja positiivinen prediktiiivinen arvo käytettäessä *digene* Female Swab Specimen Collection -välinepakkausta näytteiden keräämiseen verrattuna *digene* HC2 DNA -näytteenottoon. Koska *digene* HC2 DNA -näytteenottoon käyttö on kontraindisoitu kerättäessä kohdunkaulanäytteitä raskaana olevilta naisilta, kokeen kyky detekoida CT DNA voi alentua tässä potilaspopulaatiossa tai milloin tahansa *digene* Female Swab Specimen Collection -välinepakkausta käytettäessä näytteiden keräämisessä.

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen kliinistä herkkyyttä ja spesifisyyttä niiden potilaiden detekoinnissa, joilla on kliinisesti aktiivinen infektio, joka voi siirtyä kumppaneille tai aiheuttaa Chlamydiaan liittyviä seurausilmiöitä, ei ole selvitetty verrattuna kaupallisesti saataviin Nucleic Acid Amplification (NAA) -menetelmiin CT DNA:n detekoimiseksi. Kliinisissä tutkimuksissa, joissa kokeissa käytettiin modifioitua kaupallista NAA-analyysia, saatiin positiivinen tulos 12 näytteelle, jotka *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa olivat positiivisia ja 6 presumptiivisesti positiiviselle näytteelle, jotka saatiin 24:ltä CT-viljely-DFA-kokeessa negatiivisiksi osoittautuneelta potilaalta. Samalla on kuitenkin todettava, että ko. tutkimuksen 1637 negatiiviseksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa osoittautunutta näytettä ja 5 positiiviseksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa ja negatiiviseksi CT-viljelyssä-DFA-kokeessa osoittautunutta näytettä jätettiin testaamatta tällä modifioidulla NAA-menetelmällä. Estimoitu herkkyys perustuu *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa saatujen positiivisten tulosten lukumäärään tutkittaessa potilaita, jotka oli todettu positiivisiksi viljely- tai DFA-kokeessa *Chlamydia trachomatisin* suhteen. Näin ollen, *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen herkkyys on pääteltävissä vain suhteessa viljely-/DFA-kokeen positiivisuuteen, jonka herkkyys voi vaihdella välillä 60-85 %. Lisäksi useissa eri tutkimuskeskusten tutkimuksissa on seurattu *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suoritusarvoa verrattuna kaupallisiin ja tutkimuskäytössä oleviin NAA-kokeisiin.<sup>22</sup>

## TOISTETTAVUUS

Toistettavuustutkimus tehtiin osana ns. monikeskustutkimusta tavoitteena selvittää analyysikohtainen, päiväkohtainen, tutkimuskeskuskohtainen ja kokonaistoistettavuus *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen osalta. Käytettiin paneelia, joka koostui *Chlamydia trachomatisin* DNA-kohteista (engl. target) ja *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa positiiviseksi todetuista kliinisistä näytteistä ja *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa negatiiviseksi todetuista kliinisistä näytteistä.

Testattiin 10-jäseninen paneeli naamioituja, denaturoituja kliinisiä ja ei-kliinisiä näytteitä, koostuen 8:sta positiivisesta näytteestä ja 2 negatiivisesta näytteestä. Paneelit testattiin kuuden replikaatteina kahdesti päivässä kolmen päivän ajan kussakin 4 tutkimuskeskuksessa (3 ulkopuolista tutkimuskeskusta ja QIAGEN laboratorio). Kukin tutkimuskeskus tuotti 36 datapistettä jokaista testattua kohdetta (engl. target) kohti. Kaikki näytteet oli denaturoitu ja säilytetty pakastettuina ennen testaamista. 99,9 %:nen yhtäpitävyys todettiin 1152:n odotettavissa olevan positiivisen tuloksen suhteen (1151/1152) ja 99,6 %:nen yhtäpitävyys todettiin 288:n odotettavissa olevan negatiivisen tuloksen suhteen (287/288). Kokonaisyhtäpitävyys oli 99,9 % (1438/1440), kun 95 %:n luotettavuusväli oli 99,5-99,9 ja Kappa = 0,996. Mitään merkittävää analyysikohtaista, päiväkohtaista tai tutkimuskeskuskohtaista vaihtelua ei havaittu ja siksi kaikkien analyysien data kussakin tutkimuskeskuksessa yhdistettiin ja ne on esitetty alla olevassa taulukossa (taulukko 9).

**Taulukko 9.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen toistettavuus monikeskustutkimuksessa.

Kohteen	Tutkimuskeskus 1	Tutkimuskeskus 2	Tutkimuskeskus 3	Tutkimuskeskus 4	Yhteensä
---------	------------------	------------------	------------------	------------------	----------

numero	RLU/CO		%		RLU/CO		%		RLU/CO	Havaittu/Odotettu	%
	CO	yksim	CO	yksim	CO	yksim	CO	yksim			
1	3,7	100	3,2	100	4,1	100	4,2	100	3,8	144/144	100
2	6,7	100	6,0	100	7,4	100	9,8	100	7,5	144/144	100
3	34,2	100	29,3	100	38,6	100	42,8	100	36,2	144/144	100
4	61,9	100	55,0	100	69,4	100	79,1	100	66,4	144/144	100
5	2,7	100	2,5	100	3,2	100	3,4	100	3,0	144/144	100
6	6,4	100	5,4	100	7,4	100	7,4	100	6,6	144/144	100
7	13,9	100	12,0	100	16,0	100	16,3	100	14,5	144/144	100
8	17,3	100	14,8	100	19,2	97,2	23,2	100	18,6	143/144	99,3
9	0,3	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,3	100	0,3	97,2	0,3	100	0,2	100	0,3	143/144	99,3
YHT.										1438/1440	99,9

Toinen pätevyys-/toistettavuustutkimus, jossa käytettiin kokonaisia *Chlamydia trachomatis* (CT) -organismeja lisättyinä epiteelisoluista muodostettuun valekliiniseen näytematriisiin, toteutettiin kolmessa ulkopuolisessa tutkimuskeskuksessa. Testatut näytteet sisälsivät negatiivisia näytteitä, vähäisen positiivisuuden (detekointirajalla tai sen lähellä) ja keskitason positiivisuuden näytteitä, jotka sisälsivät 2 CT -serovareja, sekainfektioita *Neisseria gonorrhoeae* (GC) kanssa sekä verta sisältäviä näytteitä. Kahdentoista näytteen odotettiin olevan positiivisia ja kolmentoista näytteen odotettiin olevan negatiivisia. Suhteellinen yhtäpitävyys *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen havaittujen ja odotettujen tulosten osalta kolmessa tutkimuskeskuksessa ja kaikki tutkimuskeskukset yhdistettynä on esitetty taulukossa 10. Kunkin kohteen herkkyys-, spesifisyys-, yhtäpitävyys- ja kappa-arvot on esitetty taulukossa 11.

**Taulukko 10.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen toistettavuustutkimuksen tulokset.

Tutkimus keskus	n	Havaitut vs. odotetut			Suht. yhtäpitävyys <sup>a</sup>		
		Positiivinen			Lukuunottamatta epämäär. näytteet		
		Negatiivinen	Epämäär.	Positiivinen (≥2,5)	@1,0 Raja-arvo*	@2,5 Raja-arvo	@2,5 Raja-arvo
1	25	13	7	5	25/25 (100 %)	18/25 (72 %)	18/18 (100 %)
2	25	13	3	9	25/25 (100 %)	22/25 (88 %)	22/22 (100 %)
3	25	13	2	10	25/25 (100 %)	23/25 (92 %)	23/23 (100 %)
Yhteensä	75	39	12	24	75/75 (100 %)	63/75 (84 %)	63/63 (100 %)

\*Samat arvot saatiin tulkittaessa "presumptiivisesti positiivisia"-tuloksia, kun raja-arvo = 2,5.

**Taulukko 11.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen yhteenvetotiedot (raja-arvo 1,0).

Tilastoll. mitta	Tutkimuskeskus 1	Tutkimuskeskus 2	Tutkimuskeskus 3	Tutkimuskeskus 4
Herkkyys	100 % (73,54 %-100 %)*	100 % (73,54 %-100 %)	100 % (73,54-100 %)	100 % (90,26-100 %)
Spesifisyys	100 % (75,29 %-100 %)	100 % (75,29 %-100 %)	100 % (75,29-100 %)	100 % (90,97-100 %)
Yhtäpitävyys	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

\*Suluissa olevat luvut tarkoittavat 95 % luotettavuusväliä.

Tavanomaisessa pätevyystestauksessa taulukossa 11 esitettyä 12 epämääräistä näytettä, joista jokainen sisälsi alhaisia CT-organismien pitoisuuksia (~5x10<sup>4</sup> organismia/ml), tulkittaisiin presumptiivisesti positiivisiksi näiden käyttöohjeiden kohdan Näytetulosten tulkinta mukaan. Näin ollen voitiin osoittaa, että analyysi kykenee detekoimaan CT DNA:n näytteistä, joiden pitoisuudet ko. organismien osalta ovat analyysin detekointirajalla tai lähellä sitä. Lisänäyttöä tästä saatiin testattaessa paneeli, jonka näytteet sisälsivät vähäisiä määriä organismeja välillä, jossa detekointi oli tarkoitus suorittaa nukleehinapon vahvistukseen perustuvilla analyyseillä. Kolmessa ulkopuolisessa tutkimuskeskuksessa ja QIAGEN laboratorioissa suoritetuissa kokeissa saatiin 100 %:sti positiiviset (tai presumptiivisesti positiiviset) tulokset sille paneelin näytteelle, joka sisälsi CT-organismeja. Kahdessa tapauksessa RLU/CO-arvot lankesivat analyysin epämääräiselle vyöhykkeelle (ks. taulukko 12).

**Taulukko 12.** CT- ja GC-näytepaneelin tulokset.

Tutkimuskeskus	Näytteen ID	digene HC2 CT/GC DNA -kokeen tulos		Odotettu tulos
		RLU/CO	Tulkinta	
1	1	3,63	<b>POS</b>	<b>POS</b>
	2	0,14	NEG	NEG
	3	0,17	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,21	NEG	NEG
2	1	1,79	<b>EPÄMÄÄR.*</b>	<b>POS</b>
	2	0,11	NEG	NEG
	3	0,10	NEG	NEG
	4	0,09	NEG	NEG
	5	0,14	NEG	NEG
3	1	3,24	<b>POS</b>	<b>POS</b>
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,14	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,13	NEG	NEG
4	1	1,87	<b>EPÄMÄÄR.*</b>	<b>POS</b>
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,53	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,15	NEG	NEG

\*Tulkittiin presumptiivisesti positiiviseksi.

## TARKKUUS

Kolmessa tutkimuskeskuksessa toteutettiin tarkkuustutkimus, jonka tavoitteena oli määrittää analyysin sisäinen ja kokonaistarkkuus käytettäessä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta positiivisista ja negatiivisista naamioiduista simuloiduista kliinisistä STM-näytteistä koostuvaa paneelia. Lisäksi kahden erillisen luminometrin avulla seurattiin laitteiden välistä ja sisäistä tarkkuutta samalla paneelilla. Ko. kaksi luminometrimallia olivat DML 2000 -laitteisto, joka on yksi *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen yhteydessä suositeltavista luminometreistä, ja MLX-luminometri, joka on eräs käytöstä poistunut kliinisessä arviinnissa aikaisemmin käytetty malli. Alkuperäisessä testauksessa, kahdessa tutkimuskeskuksessa saatiin hyväksyttävää tuloksia. Yhdessä tutkimuskeskuksessa koettiin kuitenkin vaikeuksia, jotka johtuivat analyysitekniikasta ja mitä todennäköisimmin teknisestä virheestä, jonka taustalla oli virheellinen tai riittämätön koulutus. Ko. tutkimuskeskuksessa toiminut teknikko oli saanut asianmukaisen koulutuksen, mutta hän ei ollut suorittanut yhtään *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta yli 6 kk:n aikana.

Taulukossa 13 esitetään *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suoritus, mukaan luettuna tutkimuskeskus, jossa teknisiä ongelmia ilmeni. Teknikko sai toistokoulutusta asianmukaisessa analyysitekniikassa ja kokeet uusittiin. Taulukossa 14 esitetyistä tarkkuustiedoista ilmenee analyysin suorituksessa tapahtunut merkittävä kohentuminen.

**Taulukko 13.** Laitteen sisäinen, laitteiden välinen, analyysikohtainen ja kokonaistarkkuusestimaatti RLU/CO-suhdeluvulle kohteen mukaan ennen teknikon uudelleen koulutusta.

Paneeli-jäsen	n	K'arvo RLU/CO	Laitteen sisäinen		Laitteiden välinen		Analyysikohtainen		Yhteensä	
			Keski-hajonta (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	17,6152	2,7418	15,5647	0,6011	3,4123	45,8628	260,3593	53,8172	305,5160
2	54	6,9076	0,8102	11,7297	0,2198	3,1819	17,9588	259,9861	20,9987	303,9941
3	54	3,0293	0,0969	3,1981	0,0930	3,0685	0,6870	22,6801	0,6739	22,2459
4	54	5,4674	0,3348	6,1231	0,1485	2,7156	10,0455	183,7341	11,4415	209,2673
5	54	13,6956	0,4045	2,9536	0,5280	3,8555	1,7475	12,7599	1,8065	13,1904
6	54	16,9526	0,7011	4,1359	0,6187	3,6497	22,1095	130,4199	25,9379	153,0027

Yhdistettyjen kohteiden tarkkuustulokset on esitetty taulukossa 14. Vaikka ne eivät käykään ilmi tästä taulukosta, kolmen kohteen kvalitatiiviset tulokset olivat 100 %:sesti (54/54) (93,4–100 %, 95 %:n luott.väli) yhtäpitäviä odotettujen tulosten kanssa sen jälkeen kun kaikki teknikot ovat saaneet asianmukaisen koulutuksen *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen käytössä.

**Taulukko 14.** Laitteen sisäinen, laitteiden välinen, analyysikohtainen ja kokonaistarkkuusestimaatti RLU/CO-suhdeluvulle kohteen mukaan teknikon uudelleen koulutuksen jälkeen.

Paneeli-jäsen	n	K'arvo	Laitteen sisäinen		Laitteiden välinen		Analyysikohtainen		Yhteensä	
			Keski-hajonta (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	0,1441	0,0224	15,5507	0,0000	0,0000	0,0603	41,8765	0,0629	43,6874
2	54	0,1256	0,0212	16,8771	0,0000	0,0000	0,0210	16,7125	0,0234	18,6069
3	54	2,7720	0,0996	3,5933	0,0888	3,2046	0,4732	17,0719	0,4749	17,1332
4	54	1,8643	0,0647	3,4683	0,0635	3,4051	0,4015	21,5358	0,3956	21,2227
5	54	13,2050	0,4129	3,1266	0,5281	3,9989	1,7018	12,8873	1,6604	12,5743
6	54	7,8674	0,2725	3,4633	0,3946	5,0157	1,5361	19,5250	1,5118	19,2160

Paneelin jäsenien 3 ja 4 osalta, joista molemmat sisälsivät vähäisiä määriä CT-organismia, niiden RLU/CO-arvot olivat epämääräisen vyöhykkeen 1,0-2,5 sisällä tai lähellä sitä.

Näitä analyysejä ajatellen, positiivisiksi tulkittiin kaikki ne RLU/CO-arvot, jotka lankeivat epämääräisen vyöhykkeen sisällä tai joiden arvo ylitti 2,5.

Lisätutkimus suoritettiin QIAGEN-yhtiön taholla tavoitteena selvittää *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen kokonaistarkkuus DML 2000 -laitteistoa käytettäessä. Kuusijäseninen tarkkuuspaneeli valmisteltiin simuloidusta kliinisistä näytematriisista, jossa oli viljeltyjä epiteelisiä soluja *digene* STM-näytteenkuljetusaineeseen suspensioituina. Itse näytteet koostuivat kahdesta negatiivisesta näytteestä, kahdesta alhaisen positiivisuuden näytteestä ja kahdesta keskitason positiivisesta näytteestä, ja kaikki sisälsivät harjan näytteenottovälineenä. Kukin paneeli testattiin kolmena toistona, kaksi paneelia per levy, kahden laboratorioteknikon toimesta 5 päivän kuluessa. Tuore denaturoitu paneeli otettiin käyttöön kullekin levylle. *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen kokonaistarkkuustulokset kaikilta viideltä päivältä on esitetty taulukossa 15. Vaikka se ei näistä taulukoista käykään ilmi, tuloksien kvalitatiivinen tulkinta oli 100 %:sesti yhtäpitävä odotettujen tulosten kanssa (120/120; 97,0–100 %, 95 % CI), kun käytetty RLU/CO-arvo = 1,00.

**Taulukko 15.** Kokonaistarkkuus *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen osalta.

Paneeli-jäsen	n	Keskim. RLU/CO	SD	CV%	Kesk 2xSD	Kesk +2xSD
1	120	0,15	0,0326	21,24	0,09	0,22
2	120	0,16	0,0479	29,25	0,07	0,26
3	120	3,07	0,7078	23,05	1,66	4,49
4	120	4,00	0,5585	13,97	2,88	5,12
5	120	11,61	1,6955	14,60	8,22	15,00
6	120	12,01	1,9818	16,50	8,05	15,98

## PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN TARKKUUS

PreservCyt-liuosnäytteiden testaukseen käytetyn analyysin laboratorikohtaista ja päivittäistä tarkkuutta kartoitettiin monikeskustutkimuksen avulla. Kahdessa QIAGEN ulkopuolisessa tutkimuskeskuksessa testattiin 12-jäseninen paneeli simuloituja potilasnäytteitä, jotka oli kerätty PreservCyt-liuokseen. Kukin laboratorio toisti sen jälkeen paneelin analyysin kolmeen kertaan, kaksi kertaa päivässä kolmen päivän ajan käyttäen reagenssien samaa valmistuserää. 12-jäseninen paneeli simuloituja PreservCyt-liuoksessa olevia näytteitä oli valmistettu käyttämällä vaihtelevia määriä CT:tä (Serovar D; ATCC VR885), joilla saatiin taulukossa 16 näkyvä paneeli.

**Taulukko 16.** Tarkkuuspaneelin koostumus

Kokonaisnäyte	Paneelijäsenet*	<i>digene</i> HC2 CT/GC DNA -testin odotetut tulos	Keskimäär. RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Alh. CT-positiivinen	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Keskivahva CT-positiivinen	~10
C	5N, 11N	Negatiivinen	~0,20
D	6N, 12N	Voimakas negatiivinen	~0,70

\*Näytteen tunniste osoittaa tunnetun *C. trachomatis* -statuksen [positiivinen(P) tai negatiivinen(N)]

NCCLS:n kvalitatiivisten *in vitro* diagnostisten kokeiden seosaatiota koskevan ohjeen EP-12A mukaisesti paneelijäsenet 6N ja 12N, joista molemmat olivat peräisin kokonaisnäytteestä "D", otettiin mukaan tarkkuuden analysoimiseksi heti analyysin negatiivisen raja-arvon 1,0 RLU/CO alapuolella.

Data-analyysiä varten samasta kokonaisnäytteestä peräisin olevat paneelijäsenet yhdistettiin.

**Taulukko 17.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koemenetelmän kvalitatiiviset tulokset kokonaisnäytteen mukaan

Kok.näytekokoelma	CT-positiivinen n (%)	Epämääräinen n (%)	Negatiivinen n (%)	Yhteensä
Negatiivinen (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Vahvasti negatiivinen (6N, 12N)	0 (0,0)	12 (11,2)	90 (88,8)	108
Yhteensä negatiiv.	0 (0,0)	12 (5,6)	204 (94,4)	216
CT alh. positiivinen (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
CT keskivahva positiivinen (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Yhteensä positiiv.	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Taulukko 18.** Tarkkuuden keskihajonta (SD) ja variaatiokerroin (CV) laboratorion ja päivän mukaan: *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe PreservCyt-liuoksessa

Näyte	N	Keskiarvo RLU/CO	Anal.koht. keskihajonta	Analyysien välinen keskihaj.	Päiväkoht. keskihaj.	Tutk.kesk. välinen keskihaj.	Keskihajonta yhteensä	% CV
Negatiiv. (5N, 11N)	108	0,215	0,038	0,020	0,010	0,037	0,058	27,0
Vahvasti negatiiv. (6N, 12N)	108	0,648	0,304	0,210	0*	0	0,370	57,1
CT keskiv. positiiv. (2P, 3P, 8P, 9P)	216	12,64	1,444	0,733	1,013	1,070	2,189	17,3
CT alh. positiiv. (1P, 2P, 7P, 8P)	216	4,637	0,490	0,485	0,285	0,288	0,800	17,3

\*Negatiiviset variaatioluvut asetettiin nollassi.

## ANALYYTTINEN HERKKYYS

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen analyyttiset detekoinnin herkkyysrajat (limits of detection, LOD) määritettiin testaamalla suoraan ei-kliinisen paneelin laimennuksia, joiden kokoonpano oli seuraava: 15 *Chlamydia trachomatis* -serovaria sekä *Chlamydia psittaci* ja *Chlamydia pneumoniae*. Kustakin serovarista valmistetut neljän pisteen laimennussarjat testattiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeella tavoitteena määrittää organismikuormaestimaatti suurimmalle positiivisen *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetuloksen antavalle laimennukselle. Kunkin kohdetyypin konsentraatio testattiin kolminkertaisena sarjana noudattaen selosteessa annettua *digene* HC2 CT-ID DNA Test -käyttöohjeita.

Kunkin Chlamydia-serovarin detekointiraja on esitetty taulukossa 19. Ko. raja-arvo oli se serovariokohtainen laimennus, joka detekoitiin analyysin epämääräisen vyöhykkeen sisällä (RLU/CO = 1,0-2,5) tai yläpuolella. Detekoitavissa oleva alue vaihteli välillä 1000–500000 embryoidikappaletta/ml, johon vaikutti kulloinenkin testattu serovari. Kun kokeessa detekoidaan 50–25000 embryoidikappaletta, se vastaa 1000–500000 embryoidikappaletta alkuperäisessä näytteessä (per millilitra STM-näytteenkuljetusainetta).

Yleisimmät Yhdysvalloissa havaitut CT-serovarit alle 30-vuotiailla oireettomilla naisilla ovat E-, I- ja D-serovarit (laskevassa yleisyysjärjestyksessä).<sup>23</sup> Suurkaupunkien keskustan gynekologisilla klinikoilla asioivilla iältään 17-68 vuotta olevilla naisilla yleisimmin tavatut CT-serovarit olivat F-, E- ja G-serovarit (laskevassa yleisyysjärjestyksessä). On tärkeää todeta, että *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen alaraja kaikkien yleisimpien CT-serovarien detekoinnissa, E-serovaria lukuun ottamatta, oli 50 embryoidikappaletta/ analyysi; E-serovarin detekointiraja on korkeampi, 2500 embryoidikappaletta/analyysi, kuten edellä on todettu. Tämän julkaisun tekijät ovat sitä mieltä, että tietyt serovarit saattavat liittyä oireellisiin (ts. G-serovari) tai oireettomiin (ts. D- ja I-serovari) infektoihin. Näiden serovarien osalta *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe demonstroi detekoinnin alarajaksi arvon 50 embryoidikappaletta/analyysi.

**Taulukko 19.** Yhteenveto CT-serovareihin liittyvistä herkkyuden detekoinnin raja-arvoista.

Serovari	Detekoitavissa oleva konsentraatio	
	Embryoidikappaleita/ml	Embryoidikappaleita/koe
A	1000 - >10000	50 - >500
B	10000–100 000	500–5000
Ba	5000–50000	250–2500
C	10000	500
D	1000–10000	50–500
E	50000	2500
F	1000	50
G	1000–10000	50–500
H	10000–100000	500–5000
I	1000–10000	50–500
J	5000–500000	2500–25000
K	20000	1000
L1	2000	100
L2	2000–20000	100–1000
L3	10000	500

## PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN MUITA TIETOJA

Edellisessä näytteenkuljetusainetta (STM) koskevassa luvussa esitettyjä detekointirajatutkimuksia ei toistettu PreservCyt-liuosnäytteillä, koska kokeen analyttisen herkkyuden odotetaan olevan riippumaton joko STM:stä tai PreservCyt-liuoksessa olevan näytteen tyypistä, etenkin koska PreservCyt-liuoksessa olevat näytteet altistetaan konversiomenetelmälle (ks. lisätietoja *digene* HC2 Sample Conversion Kit käyttöohjeista), joka tekee PreservCyt-liuoksessa olevien näytteiden koostumuksesta STM-näytteiden koostumusta vastaavan ennen niiden käyttöä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa.

Koska PreservCyt-liuosnäytteet sentrifugoidaan konversiovaiheessa, on kuitenkin tarpeen arvioida sentrifugoinnin mahdollinen vaikutus *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen analyttiseen herkkyuteen. Sentrifugoinnin mahdollista vaikutusta analyttiseen herkkyuteen arvioitiin siten, että kahdeksankymmentä kahdeksan (88) paria *C. trachomatis* DNA-negatiivista STM-näytettä ja PreservCyt-liuoksessa olevaa näytettä valmistettiin samansuuruisilla määrillä CT (serovar G) -organismeja. Parittain yhdistetyt näytteet analysoitiin ja analyttinen herkkyys määritettiin vertaamalla saatuja keskimääräisiä RLU/CO-arvoja [(PreservCyt:STM) x 100].

Tietojen parittain yhdistetty T-koe taulukossa 20 osoittaa, että *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen analyttinen herkkyys ei ole tilastollisesti erilainen ( $p = 0,33$ ) analysoitaessa PreservCyt-liuoksessa ja näytteenkuljetusaineessa (STM) olevia näytteitä.

**Taulukko 20.** Analyyttisen herkkyuden vertailu – *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe – PreservCyt-liuos- ja STM-näyteparit.

	<i>digene</i> HC2 CT-ID DNA Test -koe RLU/CO	
	STM	PreservCyt
<b>Näytteiden lkm</b>	88	88
<b>Keskimääräinen RLU/CO</b>	3,38	3,48
<b>Mediaani RLU/CO</b>	3,41	3,44
<b>Keskihajonta</b>	0,41	0,54
<b>Maksimi RLU/CO</b>	4,42	5,01
<b>Minimi RLU/CO</b>	2,44	2,27

Lisätutkimuksen avulla tehtiin samanlainen vertailu pareittain yhdistetyillä, simuloituilla potilasnäytteillä. PreservCyt-liuokseen kerätyt potilasnäytteet saatiin QIAGEN ulkopuolella olevalta tutkimuskeskukselta ja ne seulottiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen avulla positiivisten näytteiden tunnistamiseksi. Nämä positiiviset potilasnäytteet yhdistettiin kaiken kaikkiaan 10 tiivistetyn näytteen PreservCyt-näytekokoilman muodostamiseksi. Näistä kokoelmista valmistettiin kaksi alikvoottia, jotka prosessoitiin solupellettien muodostamiseksi. Solupelletit resuspendoitiin fosfaattipuskurisuolaliuoksessa (PBS). Alikvootti A valmistettiin lisäämällä resuspendoitu pelletti näytteenkuljetusaineeseen (STM) ja alikvootti B valmistettiin lisäämällä resuspendoitu pelletti PreservCyt-liuokseen. Molemmat alikvoottit analysoitiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeella. Tulokset olivat seuraavat:

Tietojen pareittain yhdistetty T-koe taulukossa 21 osoittaa, että *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen analyttinen herkkyys ei ole tilastollisesti erilainen ( $p = ,98$ ) analysoitaessa PreservCyt-liuoksessa tai näytteenkuljetusaineessa (STM) olevia kohdunkaulanäytteitä.

**Taulukko 21.** Analyyttisen herkkyuden vertailu – *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe – simuloituiden PreservCyt-liuoksessa olevat potilasnäytteet, jotka on yhdistetty pareittain STM-näytteiden kanssa.

	<i>digene</i> HC2 CT-ID DNA Test -koe	
	STM (alikootti A)	PreservCyt (alikootti B)
<b>Näytteiden lkm</b>	10	10
<b>Keskimääräinen RLU/CO</b>	30,92	24,90
<b>Mediaani RLU/CO</b>	3,56	3,00
<b>Keskihajonta</b>	47,27	38,91
<b>Maksimi RLU/CO</b>	125,62	115,08
<b>Minimi RLU/CO</b>	1,15	1,26

## ANALYYTTINEN SPESIFISYYS

Joukko bakteereita, viruksia ja plasmideja, joita on mahdollista tavata naisen anogenaalisessa kanavassa, testattiin tavoitteena selvittää tapahtuuko ristiin reaktiivisuutta *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa käytettävien koettimien suhteen. Kaikki mikro-organismit testattiin  $10^5$  ja  $10^7$  organismia per ml konsentraatioissa sekä mahdollisuuksien mukaan myös konsentraatioissa  $10^9$  organismia per ml. Virusten ja plasmidien puhdistettua DNA:ta testattiin 4 ng per ml konsentraatioissa.

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeella testatut bakteerit on mainittu taulukossa 22. Kaikki muut paitsi *Chlamydia psittaci* antoivat negatiivisen tuloksen *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa. *Chlamydia psittaci* on todettavissa joidenkin henkilöiden iholta, jotka työssään käsittelevät siipikarjaa, mutta tätä organismia ei ole detekoitu anogenaalisessa kanavassa.<sup>24</sup> Näin ollen, *Chlamydia psittacin* ja CT-koettimen välillä todetun ristiin reaktiivisuuden ei uskota aiheuttavan kliinisesti sekavia tuloksia anogenaalisesta kanavasta otettujen näytteiden analysoinnissa.

CT-koetin ei johtanut ristiin reagointiin *Neisseria gonorrhoeae* kanssa, mikä osoitti, että *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen koettimet eivät ristiin reagoi GC-ID -koettimien kohteiden kanssa *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kanssa.

**Taulukko 22.** Ristiin reagoinnin suhteen testatut mikro-organismit.

---

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i>
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <sup>c</sup>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria species</i> <sup>d</sup> *
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava</i> (biovar flava)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>a</sup>	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</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> (kliininen isolaatti) <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i> (HB101) <sup>b</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grp B)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grp A)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grp B)
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> <sup>e</sup>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	

---

<sup>a</sup> Testatut konsentraatiot olivat  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  ja  $1 \times 10^8$  organismia/ml.

<sup>b</sup> Sekä *E. coli* -kanta, jota käytettiin plasmidien (HB101) kasvattamisessa että *E. coli* klininen isolaatti testattiin.

<sup>c</sup> Testatut konsentraatiot olivat  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^7$  ja  $2 \times 10^8$  organismia/ml.

<sup>d</sup> Testatut konsentraatiot olivat  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  ja  $2 \times 10^9$  organismia/ml.

<sup>e</sup> Tutkitut konsentraatiot olivat  $1 \times 10^5$  ja  $1 \times 10^6$  organismia/ml.

\* ATCC *Neisseria* -kanta, jolla on sekä *Neisseria gonorrhoeae* että *Neisseria meningitidis* piirteitä (ATCC #43831).

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen tulokset liittyen virus- tai plasmidiperäisen DNA:n tai ihmisperäisen seerumin analyysiin on esitetty taulukossa 23. Presumptiivista ristiin reaktiivisuutta havaittiin plasmidivektoreilla pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Zf ja pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). Näiden homologisten sekvenssien olemassa olo on todettu ihmisen sukupuolielimistä otetuissa näytteissä ja väärä positiivisia tuloksia voi ilmetä tilanteissa, joissa mukana on suuria määriä bakteeriperäistä plasmidiainesta. *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa positiivisiksi todetun 106:n kliinisen näytteen joukosta, joka edusti 1818:n potilaan populaatiota, kahden todettiin sisältävän pBR322:ta. Toinen näistä todettiin positiiviseksi CT- viljelyssä ja DFA-kokeessa, ja toinen positiiviseksi CT DNA PCR-kokeessa. Näin ollen, homologisten pBR322-, pGEM3Z- ja pGEM3Z(-) -sekvenssien aiheuttamaa väärää positiivisuutta ei havaittu näissä 106:ssa kliinisessä näytteessä. Näiden plasmidien löytymisfrekvenssiä naisen anogenitaalisesta kanavasta ei ole lopullisesti määritetty. Kyse on edustavasta populaatiosta ja tulokset viittaavat siihen, että ne eivät välttämättä kuvasta pBR322:n esiintymisfrekvenssiä kaikissa testatuissa populaatioissa.



**Taulukko 23.** Ristiin reagoinnin suhteen testatut virus- tai plasmidiperäiset DNA-näytteet ja ihmisperäiset seeruminäytteet.

Cytomegalovirus	Human Whole Blood
Epstein Barr Virus	Human Papillomavirus type 6
Hepatitis B Surface Antigen Positive Serum	Human Papillomavirus type 11
Herpes Simplex I	Human Papillomavirus type 16
Herpes Simplex II	Human Papillomavirus type 18
Human epithelial cells	pGEM <sup>®</sup> 3Z
Human Immunodeficiency Virus (HIV) <sup>a</sup>	pGEM <sup>®</sup> 3Zf(-)
Human Genomic DNA	pBR322
Human Placental DNA	SV40

<sup>a</sup> Testatut konsentraatiot olivat  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  ja  $2 \times 10^8$  organismia/ml.

## VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS STM-NÄYTTEISIIN

Veren ja muiden potentiaalisesti häiriötä aiheuttaviksi määritettyjen aineiden vaikutukset arvioitiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeella. Kokoverta, alapesuainetta, siententorjuntavoidetta ja ehkäisyhyttelöä (joita kaikkia tyypillisesti tavataan kohdunkaulanäytteistä) lisättiin 1 %:n ja 5 %:n konsentraatioina sekä negatiivisiin että positiivisiin näytteisiin STM-näytteenkuljetusaineessa (kliiniset näytekoelmat ja ei-kliiniset näytteet). Vääriä positiivisia tuloksia ei havaittu yhdenkään em. neljän aineen yhteydessä missään konsentraatiossa. Tutkimus, joka kohdistettiin määrittelemättömiin aineisiin, joita tavattiin 117 negatiivisen kliinisen näytteen populaatiossa, osoitti, että määrittelemättömät aineet saattavat hieman, mutta eivät merkittävästi, lisätä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen detekoimaa *Chlamydia trachomatisin* DNA-signaalia. Tällä vaikutuksella ei ole merkitystä, sillä se on inhihoivalle vaikutukselle vastakkainen.

## VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS PRESERVCYT-LIUOKSESSA OLEVIIN NÄYTTEISIIN

Edellisessä luvussa STM-näytteille esitettyjä, tiettyjen häiritsevien aineiden arviointeja ei tehty PreservCyt-liuosnäytteillä. PreservCyt-liuosnäytteiden häiriöprofiilien ei kuitenkaan odoteta olevan erilaisia verrattuina STM-näytteisiin, koska kohdunkaulan näytteenotto kohta on täsmälleen sama sekä PreservCyt-liuosnäytteille että STM-näytteille ja koska PreservCyt-liuoksessa oleva näyte käy läpi konversiovaiheen (kuten *digene* HC2 -näytteenkonversiopakkauksen [Sample Conversion Kit] käyttöohjeissa on yksityiskohtaisesti esitetty), joka tekee sen koostumuksesta samankaltaisen verrattuna STM-näytteeseen. Pieniä määriä näytteenkonversiopuskuria (SCB)<sup>1</sup> saattaa olla jäljellä täysin konvertoituissa PreservCyt-liuosnäytteissä. Siksi tehtiin analyttinen tutkimus *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen analyttisen suoritusarvon verifiointiseksi, kun mukana on vaihtelevia määriä SCB:tä. Eri konsentraatioita plasmidiperäistä GC DNA:ta valmistettiin STM:ssä. Näytteisiin lisättiin sitten ylimääräisiä määriä SCB:tä, ja kolme alikvoottia kustakin näytteestä analysoitiin jokaisen näytteen keskimääräisen RLU/CO:n määrittämiseksi, kun mukana oli joko PreservCyt-liuosta tai SCB:tä. Vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia ei saatu vertailtaessa näitä kunkin näytteen keskimääräisiä RLU/CO-arvoja kunkin STM-kontrollinäytteen keskimääräisiin RLU/CO-arvoihin.

<sup>1</sup> Näytteensekoituspuskuri on puskuriliuos, jossa on eosini Y:tä ja 0,05 % (w/v) natriumatsidia, joka on tarpeen PreservCyt-näytteen sekoittamiseen. Ks. lisätietoja QIAGEN *digene* HC2 Sample Conversion Kit -käyttöohje.

## ***digene* HC2 CT-ID DNA TEST -KOKEEN TARKKUUS CO-RAJA-ARVOLLA STM-NÄYTTEENKULJETUSAINEESEEN KERÄTTYJEN KLIINISTEN NÄYTTEIDEN ANALYSOINNISSA**

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen toistettavuus STM-näytteenkuljetusaineeseen kerättyjen kliinisten näytteiden osalta määritettiin ottamalla käyttöön 30 kliinistä näytekokoelmaa (15 positiivista ja 15 negatiivista), jotka oli valmistettu yhdistämällä aikaisemmin denaturoidut ja testatut STM-näytteenkuljetusaineeseen kerätyt serviksharjanäytteet. Näytteet testattiin neljän näytteen replikaatteina päivittäin viitenä päivänä siten, että jokaisesta näytteestä analysoitiin 20 replikaattia. Kokeet suoritettiin *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeina. Kullekin näytteelle määritettiin keskimääräinen RLU/CO-arvo, 95 % luotettavuusväli keskiarvolle (luotett.v.) sekä prosentuaaliset positiiviset tulokset kaikille viidelle päivälle, ja tulokset on esitetty taulukossa 24.

**Taulukko 24.** Keskim. RLU/CO, luotettavuusväli sekä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen positiivisten tulosten prosentuaalinen osuus (laskeva järjestys keskimääräisen RLU/CO-arvon mukaan).

Nro	RLU/CO	95 % luotett.v.	% Positiiv.
1	2,14	2,06–2,22	100 (20/20)
2	1,43	1,35–1,51	100 (20/20)
3	1,41	1,36–1,47	100 (20/20)
4	1,37	1,26–1,48	90 (18/20)
5	1,31	1,24–1,39	100 (20/20)
6	1,29	1,21–1,36	100 (20/20)
7	1,28	1,20–1,36	95 (19/20)
8	1,19	0,94–1,62	90 (18/20)
9	1,18	1,00–1,37	75 (15/20)
10	1,17	0,62–1,71	30 (6/20)
11	1,15	1,10–1,20	95 (19/20)
12	1,08	1,02–1,13	75 (15/20)
13	1,05	1,00–1,09	65 (13/20)
14	1,04	0,99–1,09	70 (14/20)
15	1,02	0,97–1,06	60 (12/20)
16	0,99	0,95–1,04	45 (9/20)
17	0,93	0,87–1,00	30 (6/20)
18	0,93	0,88–0,99	35 (7/20)
19	0,91	0,85–0,96	25 (5/20)
20	0,91	0,85–0,97	25 (5/20)
21	0,90	0,87–0,93	10 (2/20)
22	0,90	0,84–0,95	25 (5/20)
23	0,86	0,76–0,96	5 (1/20)
24	0,85	0,81–0,88	5 (1/20)
25	0,82	0,77–0,88	10 (2/20)
26	0,80	0,78–0,82	0 (0/20)
27	0,48	0,46–0,50	0 (0/20)
28	0,48	0,46–0,50	0 (0/20)
29	0,45	0,42–0,47	0 (0/20)
30	0,24	0,22–0,25	0 (0/20)

Ne näytteet, joiden keskimääräinen RLU/CO-arvo ylitti raja-arvon 20 %:lla tai enemmän, olivat positiivisia 98 %:ssa tapauksista, kun taas ne näytteet, joiden keskimääräinen RLU/CO alitti raja-arvon 20 %:lla tai enemmän, olivat negatiivisia 100 % tapauksista. Nämä tulokset indikoivat, että näytteet, joiden RLU/CO-arvo oli 20 % tai kauempana raja-arvosta, todennäköisesti tuottavat yhteneväisiä tuloksia *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeessa.

Lähellä analyysin raja-arvoa olevat näytteet olivat pääosin positiivisia tai negatiivisia; raja-arvon yläpuolella mutta enintään 20 % sen yläpuolella olevat näytteet olivat positiivisia 70 %:ssa tapauksista. Raja-arvon alapuolella mutta enintään 20 % sen alapuolella olevat näytteet olivat negatiivisia 79 %:ssa tapauksista.

Nämä tulokset osoittavat, että *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koe tuottaa toistettavia tuloksia sellaisia kliinisiä näytteitä tutkittaessa, jotka on kerätty STM-näytteenkuljetusaineeseen ja joiden RLU/CO-arvot ovat 20 %:n sisällä analyysin raja-arvosta.

## HISTORIATIETOA

Dynex Model MLX -luminometriä käytettiin DML 2000 -laitteiston rinnalla tuottamaan dataa ja määrittämään *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen suorituksen ominaispiirteet. MLX-luminometri ei enää ole markkinoilla ja vain DML 2000 -laitteistoa käytetään edelleen tulosten tuottamisessa. Seuraavassa esitettävät tiedot kerättiin monikeskustutkimuksesta, kun haluttiin määrittää positiivisen kalibraattorin ja negatiivisen kalibraattorin toistettavuus. Mainitut tiedot esitetään ohessa historiatietoina.

Positiivisen kalibraattorin ja negatiivisen kalibraattorin toistettavuuden määrittämiseksi, 81 analyysia käsittävien kliinisten arviointien tulokset käytettäessä *digene* HC2 CT-ID DNA Test -koetta koottiin yhteen (ks. taulukko 25). Saadut tulokset osoittivat, että näiden 81 analyysin keskimääräinen %CV oli 6,4 % ja mihinkään analyysiin ei liittynyt yli 150 RLU-yksikön menevää keskimääräistä negatiivista kalibraattoriarvoa. Positiivisen kalibraattorin toistettavuus tapauksissa, joissa CV-arvo ylitti 25 % todettiin vain 2:ssa näistä 81:sta analyysistä (2,5 %:issa analyyseista). Minkään analyysin %CV-arvo ei jäänyt yli 25 %:n, mikä osoittaa, että kaikki analyysit olivat päteviä.

**Taulukko 25.** Positiivisen kalibraattorin ja negatiivisen kalibraattorin suorituskyky. Monikeskustutkimuksen ja tarkkuustutkimuksen yhdistetyt tiedot (n = 81 analyysia).

Laitte	Anal. lkm	S/N-suhdelukujen keskiarvo	Kalibraattorin tyyppi	Laskennall. k.arvon k.arvo (RLU)		Laskennall. %CV-arvojen k.arvo	
				Kolme replikaattia	Korjattu poikkeavat huomioiden	Kolme replikaattia	Korjattu poikkeavat huomioiden
DML2000	9	5,49	Negatiivinen	44,89	39,15	26,10	13,75
			Positiivinen	231,41	231,41	7,35	7,35
MLX*	72	5,33	Negatiivinen	0,075	0,074	16,59	12,90
			Positiivinen	0,265	0,263	6,34	4,86

\*Laitte ei ole enää markkinoilla.

## STM- JA PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VASTAAVUUSTIEDOT

STM- ja PreservCyt-liuosnäytteiden vastaavuutta tutkittiin 1231 pareittain yhdistettyä kohdunkaulanäytettä käsittävissä kliinisessä arvioinnissa. PreservCyt-liuoksessa oleva näyte prosessoitiin *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan käyttöohjeiden mukaisesti ja analysoitiin STM-näyteparin kanssa *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeella. Tämän arvioinnin tulokset on esitetty taulukossa 26. Kliininen suorituskyky testattiin käyttämällä jäännöstilavuudeltaan yli 6,5 ml PreservCyt-liuosnäytteitä. Jäännöstilavuudeltaan 4,0–6,5 ml näytteiden testaus on validoitava laboratoriossa.

**Taulukko 26.** Tilastotietojen yhteenveto STM- ja PreservCyt-liuokseen kerättyjä kohdunkaulanäytepareja koskevan *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen yhtäpitävyydestä.

Tietojen analyysikohortti	Kappa (95 % CI)	Positiivinen yhtäpitävyys (n/N) 95 % CI	Negatiivinen yhtäpitävyys (n/N) 95 % CI	Kokonais-yhtäpitävyys (n/N) 95 % CI
Epämäär. alueen tiedot poissuljettu	0,92 (0,88, 0,96)	92,16 (94/102) 85,13; 96,55	99,36 (1092/1099) 98,69; 99,74	98,75 (1186/1231) 97,95; 99,30
Epämäär. alueen uusintatest. algoritmi*	0,90 (0,86; 0,94)	90,09 (100/111) 82,96; 94,95	99,20 (1111/1120) 98,48; 99,63	98,30 (1211/1231) 97,50; 99,00

\*Näytteet, joiden RLU/CO-arvo oli 1,0–2,5, testattiin uudelleen kahteen kertaan. Näytteiden luokittelu määritettiin sen jälkeen käyttäen "kaksi kolmesta" -sääntöä.

*digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen toistettavuutta arvioitiin osana kliinistä arviointia tarkoituksena esittää, että saatiin yhtäpitävät *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen tulokset, kun PreservCyt-liuoksessa olevan 20 näytteen paneelia analysoitiin 3 päivän ajan kolmessa laboratoriossa. Tämän toistettavuustutkimuksen tulokset on esitetty taulukossa 27.

**Taulukko 27.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test -kokeen prosentuaalinen yhtäpitävyys – tutkimuskeskusta kohti

Tutkimuskeskus	Havaitut/odotetut <sup>a</sup>	Yhtäpitävyys-% (95 % CI)
1	60/60	100 (94,04 – 100)
2	60/60	100 (94,04 – 100)
3	60/60	100 (94,04 – 100)
Yhdistetyt keskukset	180/180	100 (97,97 – 100)

<sup>a</sup>20 jäsentä x 3 päivää x 3 keskusta

1. Litwin J. The growth cycle of the psittacosis group of micro-organisms. *J Infect Dis* 1959;105:129-60.
2. Matsumoto A, Higashi N. Electron microscopic observations of DNA molecules of the mature, elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. *Ann Rep Inst Virus Res ,Kyoto Univ* 1973;16:33-9.
3. Moulder JW. Characteristics of Chlamydiae. In: Barron AL, editor. *Microbiology of Chlamydia*. 1 ed. Boca Raton,FL: CRC Press; 1988. p 3-19.
4. Schachter J. Chlamydiae (psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group). In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr., Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 1985. p 856-62.
5. Stephens RS, Tam MR, Kuo C-C, Nowinski RC. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol* 1982;128(3):1083-9.
6. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(2):119-36.
7. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1983;17(4):666-8.
8. Ripa KT, Mardh P-A. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide-treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977;6(4):328-31.
9. Chernesky MA, Mahony JB, Castriciano S, Mores M, Stewart IO, Landis SJ, Seidelman W, Sargeant EJ, Leman C. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J Infect Dis* 1986;154(1):141-8.
10. Horn JE, Quinn T, Hammer M, Palmer L, Falkow S. Use of nucleic acid probes for the detection of sexually transmitted infectious agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:101S-9S.
11. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986;16:52-62.
12. Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990;28(9):1968-73.
13. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
14. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
15. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
16. 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.
17. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
18. 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.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
20. 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.
21. Martin LS, McDougal JS, Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 1985 Aug;152(2):400-3.

22. Girdner JL, Cullen AP, Salama TG, He L, Lorincz A, Quinn TC. Seosation of the Digene Hybrid Capture II CT-ID test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. J Clin Microbiol 1999 May;37(5):1579-81.
23. Lan J, Melgers I, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Roosendaal R, Burger C, Bleker OP, van den Brule AJC. Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR. J Clin Microbiol 1995 Dec;33(12):3194-7.
24. Schachter J.Chlamydiae. Manual of Clinical Microbiology. Balows, A., Hausler, William J., Jr., Herrmann, Kenneth L., Isenberg, Henry D., and Shadomy, H. Jean. 1045-53. 1991.

# VIANETSINTÄOPAS

## digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOE

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
Väärä väri tai ei värinmuutosta denaturoinnin aikana.	Denaturointireagenssia ei lisätty tai denaturointireagenssi valmistettu virheellisesti.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verifioi, että denaturointireagenssi sisältää osoitinväriä ja että se on tummanvioletti värittään.</li> <li>2. Verifioi, että denaturointireagenssia on lisätty näytteeseen mittaamalla näytteen tilavuus (1,5 ml on oletustilavuus). Jos tilavuusmittaus osoittaa, että denaturointireagenssia ei ole lisätty, lisää tarvittava määrä, sekoita ja jatka analyysiä jos asianmukainen värinmuutos todetaan.</li> </ol>
	Verinen näyte saattaa peittää värinmuutoksen.	Kuvattua tarkkaa värinmuutosta ei ole odotettavissa näillä näytetyypeillä, mutta analyysin tulokset eivät välttämättä kärsi.
	Näytteen pH saattaa olla epätavallisen hapan.	Näytteen pH saattaa olla epätavallisen hapan ja siksi odotettua värinmuutosta ei tapahdu. Kerää uusi näyte <u>ennen</u> etikkahapon lisäämistä kohdunkaulaan, koska virheellisellä näytteen pH-arvolla on haitallinen vaikutus koetuloksiin.
Laaduntarkkailukontrollit antavat vääriä tuloksia	Testiä varten on valittu väärä ohjelmistoprotokolla	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jos ohjelmistoprotokolla on väärä testiä varten, kuoppalevy on luettava uudelleen 30 minuutin kuluessa detekointireagenssi 2:n lisäämisen jälkeen ja oikeaa protokollaa käyttäen.</li> </ul>
	QC CT:n ja QC GC:n käänteinen sijainti	Testaa näytteet uudestaan.
Väärä värinmuutos havaittu hybridisaation aikana.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riittämätön koetinsekoitteen sekoittaminen denaturoituun kalibraattoriin, laatukontrolliin ja/tai näytteisiin.</li> <li>• Koetinseosta ei lisätty.</li> <li>• Virheellinen määrä reagenssia lisätty.</li> </ul>	Ravista hybridisaatiokuoppalevyä vielä 2 minuuttia. Jos purppuranpunaisia tai harmaita kaivoja esiintyy edelleen, lisää vielä 25 µl koetinseosta ja sekoita hyvin. Jos asianmukaista värinmuutosta ei tapahdu koettimen lisäämisen ja uudelleen sekoittamisen jälkeen, ja näytteessä ei ollut verta tai muita materiaaleja, testaa näyte uudelleen.
	Verinen näyte saattaa peittää värinmuutoksen.	Kuvattu tarkka värinmuutos ei ole odotettavissa näillä näytteillä, mutta analyysin tulokset eivät välttämättä kärsi.
	Näytteessä oli <1000 µl digene STM-näytteenkuljetusainetta.	Tarkista alkuperäisen näytteen tilavuus. Sen tulee olla 1425 µl ± 20 µl (kun on poistettu 75 µl). Jos tilavuus <1405 µl, alkuperäinen näyte sisälsi <1000 µl STM-näytteenkuljetusainetta. Hanki uusi näyte.
Analyysin kalibroinnin verifiointikriteerit ei täytetty. Ei havaittu signaalia positiiv. kalibraattorissa, laaduntarkkailukontrolleissa eikä näytteissä.	Koetinlaimentimeen ei lisätty koetinta.	Valmista CT-koetinseos noudattaen näiden käyttöohjeiden kohdassa <i>Reagenssin valmistus ja säilytys</i> olevia ohjeita. Sekoita perusteellisesti. Varusta putki oikealla nimilapulla. Toista analyysi käyttämällä tuoretta koetinseosta.
	Koetin kontaminoitunut RNase:lla valmistuksen yhteydessä.	Käytä aerosolin estäviä pipetinkärkiä koettimen pipetointiin ja puuterittomia käsiaineita. Laimenna koetin steriiliin astiaan. Käytä vain puhtaita uusia kertakäyttöisiä reagenssiastioita.
	Koetinseos ja -laimennin riittämättömästi sekoittuneet.	Kun koetin on lisätty koetinlaimentimeen, sekoita perusteellisesti vorteksoimalla suurella nopeudella vähintään 5 sekuntia. Näkyvä pyörre tulee muodostua.
	Laimennettu koetin ja denaturoitu näyte riittämättömästi sekoittuneet.	Kun koetinseos on lisätty denaturoituun näytteeseen, peitä hybridisaatiokuoppalevy ja ravista tasoravistin I:llä nopeudella 1100 ± 100 kierr./min 3 ± 2 minuuttia; ks. kuvaus käyttöohjeiden kohdassa Koemenetelmä, Hybridisaatio, vaihe 6. Seuraa värinmuutoksen tapahtumista jokaisessa kaivossa purppuranpunaisesta keltaiseksi.
	Väärä aika tai lämpötila hybridisaatiovaiheessa.	Hybridisoi 60 ± 5 minuuttia lämpötilassa 65 ± 2 °C näiden käyttöohjeiden kohdassa Koemenetelmä, Hybridisaatio, vaiheessa 7 esitettyjä ohjeita noudattaen. Tarkista kuoppalevyn lämmitin I:n lämpötila. Varmista, että lämmitin on asetettu lämmittämään näytteet oikeaan lämpötilaan ja että se oli esikuumentettu 1 tunti ennen käyttöä.

**digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOE**

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
	Riittämätön sekoittaminen sieppausvaiheessa.	Ravista tasoravistin 1:ssä nopeudella 1100 ± 100 kierr./min 60 ± 5 minuutin ajan lämpötilassa 20–25 °C, kuten kuvattu näiden käyttöohjeiden kohdassa Koemenetelmä, Hybridisieppaus, vaihe 4. Verifioidaan tasoravistin 1:n nopeus kalibroimalla se siten kuin toimenpide on kuvattu Tasoravistimen nopeuden kalibrointi -kohdassa, Tasoravistin 1:n käyttöoppaassa.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ei ole lisätty oikeaa määrää detekointireagenssi 1:tä.</li> <li>Ei ole inkuboitu määrättyä aikaa.</li> </ul>	<p>Pipetoi 75 µl detekointireagenssi 1:tä jokaiseen kaivoon käyttäen 8-kanavaista annostelijaa.</p> <p>Inkuboi 20-25 °C:n lämpötilassa 30-45 minuuttia.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ei ole lisätty oikeaa määrää detekointireagenssi 2:ta.</li> <li>Ei ole inkuboitu määrättyä aikaa.</li> </ul>	<p>Pipetoi 75 µl detekointireagenssi 2:tä jokaiseen kaivoon käyttäen 8-kanavaista annostelijaa.</p> <p>Inkuboi 20-25 °C:n lämpötilassa 15-30 minuuttia.</p>
	Luminometrin toimintavirhe tai virheellinen ohjelmointi.	Ks. lisätietoja käytetyn <i>digene</i> analyysimääritysohjelmiston käyttöohjeiden kunnostusta ja huoltoa sekä vianetsintää koskevista osista, tai ota yhteys QIAGENin paikalliseen edustajaan.
<p><b>Kohonneet RLU-arvot kalibraattoreissa, kontroleissa ja/tai näytteissä (≥150 RLU:ta monissa tai kaikissa kaivoissa). Analyysi saattaa olla täyttämättä validointikriteereitä</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Denaturointireagenssia ei lisätty; tai lisätty virheellinen tilavuus; tai riittämätön denaturointireagenssin sekoittuminen kalibraattoreihin, laatukontroleihin tai näytteisiin.</li> <li>Vesihautteen riittämätön lämpötila ja vedenpinnan korkeus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verifioi, että sarja-annostelija annostelee tarkasti ennen denaturointireagenssin lisäämistä. Kalibroidut pipetit välttämättömiä. Lisää puoli tilavuutta denaturointireagenssia jokaiseen putkeen ja sekoita hyvin. Vältä vääriä positiivisia tuloksia varmistamalla, että neste pesee putken koko sisäpinnan (käännä putkea kerran ylösalaisin jos sekoitus tehdään manuaalisesti). Kalibraattorin, laatukontrollien ja näytteiden tulee muuttua purppuranpuanaisiksi kun denaturointireagenssi lisätään. Tarkista moninäyteputkivortexin nopeuden kalibrointi.</li> <li>Tarkistetaan vesihautteen lämpötila ja vedenpinnan korkeus.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Valovuoto luminometrissä</li> <li>Tiiviste on rikkoontunut.</li> <li>Laitteiston luukku ei ole tiivis.</li> </ul>	Tarkista luminometrin taustalukema (raakatiemittaus) lukemalla tyhjä mikrokuoppalevy. Yli 50 RLU:n lukema on osoitus valovuodosta. Ks. lisätietoja käytetyn <i>digene</i> analyysimääritysohjelmiston käyttöohjeiden kunnostusta ja huoltoa sekä vianetsintää koskevista osista, tai ota yhteys QIAGENin paikalliseen edustajaan..
	Detekointireagenssi 2 tai sieppauskuoppalevykaivot ovat detekointireagenssi 1:n tai eksogeenisen alkaisen fosfataasin kontaminoimia.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
	Kontaminoitunut pesupuskuri.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
	Kontaminoitunut automaattinen kuoppalevypesuri.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
	Riittämätön sieppauskuoppalevykaivojen pesu detekointireagenssi 1:n inkuboinnin jälkeen.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunoja joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria. Kaivoissa ei saa näkyä vaaleanpunaisen nesteen jäämiä pesun jälkeen. Ks. <i>Automaattisen kuoppalevypesurin käyttöoppaassa</i> annettuja ohjeita kontaminaatio- ja virhetoimintotilanteisiin liittyvistä kokeista.
	Detekointireagenssi 1:n aiheuttama kuoppalevykaivojen kontaminoituminen.	Varmistetaan, että kaikki työpinnat ovat puhtaita ja kuivia. Noudatetaan huolellisuutta detekointireagenssi 1:n käsittelyssä. Vältetään aerosoleja.
	Hybridisaatioliuosta on kuivattu Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan vähänukkaiset paperipyyhkeen samaan kohtaan.	Älä kuivaa hybridisaatioliuosta Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan vähänukkaiset paperipyyhkeen samaan kohtaan.
	On käytetty väärää kuivauspyyhkeitä.	Käytä Kimtowels-pyyhkeitä tai vastaavia vähänukkaisia paperipyyhkeitä kuivaamiseen.



**digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOE**

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
	CT-laaduntarkkailukontrollien materiaalia käytetty positiivisena kalibraattorina. Analyysin ei täytä validointikriteereitä.	Varmista kalibraattoreiden ja laatuksentrollien oikea sijainti.
<p><b>Alhainen PC/NC-suhdeluku tai suuri lukumäärä matala-positiivisia näytteitä (&gt;20 % näytteiden kokonaisuudesta) joiden RLU/CO-suhdeluku &lt;2,0. Analyysi saattaa olla täyttämättä validointikriteereitä</b></p>	Näyteen riittämätön valmistus.	Lisää tarvittava määrä denaturointireagenssia ja sekoita hyvin vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi varmista, että neste huuhtelee putken sisäpinnan kauttaaltaan käyttämällä moninäyteputkivorteksi 2:n menetelmää vähintään 5 sekuntia (jos käytät manuaalista vorteksointimenetelmää, vorteksoi vähintään 5 sekuntia ja käännä putki kerran ylösalaisin). Tällöin värin tulee selkeästi muuttua kirkaasta tumman purppuranpunaiseksi. Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $45 \pm 5$ minuuttia. PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä näitä hybridejä on todennäköisesti näyteen konversioputken sisäseinämässä. Denaturoimattomien solujen siirtymisen estämiseksi pipetin kärki ei saa koskettaa näyteen konversioputken laitoja denaturoituja näytteitä siirrettäessä mikrokuoppalevylle, jota käytetään CT/GC-koettimen hybridisaatioon. Katso lisäohjeita <i>digene HC2</i> -näyteen konversiopakkausten käyttöohjeista.
	Koetin riittämättömästi sekoittunut tai analyysihin ei ole lisätty riittävästi koetinseosta.	Preparoi koetinseos kuvatulla tavalla. Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla ja varmista, että näkyvä pyörre muodostuu. Koetinseos on lisättävä kaivoihin monikanavaisella tai sarjapipetillä täsmällisen annostelun varmistamiseksi.
	Lisätty riittämätön määrä koetinseosta kuhunkin hybridisaatiokuoppalevyn kaivoon.	Verifioi, että 8-kanavainen pipetti annostelee tarkasti ennen koetinsekoitteen lisäämistä hybridisaatiokuoppalevylle. 25 µl koetinseosta tulee lisätä denaturoituun näytteeseen kunkin kuoppalevykaivon pohjalle. Varmista, että 8-kanavainen pipetti annostelee tarkasti, ennen kuin lisää koetinseosta hybridisaatiokaivoihin. Värinmuutos purppuranpunaisesta keltaiseen tulee tapahtua sen jälkeen, kun koetinseos on lisätty ja sekoitettu perusteellisesti.
	Detekointireagenssi 1:n toiminnon menetys.	Säilytä detekointireagenssi 1 lämpötilassa 2-8 °C. Käytä pakkauksen ulkoiseen nimilappuun merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään mennessä.
	Riittämätön RNA: DNA-hybridien sieppaus.	Sieppausvaihe tulee suorittaa siten, että tasoravistin I on asetettu toimimaan nopeudella $1100 \pm 100$ kierrosta minuutissa. Verifioi tasoravistin 1:n nopeus kalibroimalla se tasoravistin I:n käyttöoppaan kohdassa 'Tasoravistimen nopeuden kalibrointi' kuvatulla tavalla.
	Riittämätön pesu.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojaan joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria.
	Kontaminoitunut pesupuskuri.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
<p><b>Sarja positiivisia näytteitä, joiden RLU-arvot ovat jokseenkin samat.</b></p>	Sieppauskuoppalevyn kaivojen kontaminoituminen analyysin yhteydessä.	Peitä sieppauskuoppalevyn kaivot inkuboinnin yhteydessä. Vältä altistamista sieppauskuoppalevyn kaivoja aerosolperäiselle kontaminoitumiselle analyysin aikana. Käytetään puuterittomia käsitelyssä.
	Denaturointireagenssi 2:n kontaminoituminen.	Reagenssin kontaminoitumista on varottava pipetoitaessa sitä kuoppalevyn kaivoihin. Vältä detekointireagenssi 2:n kontaminoitumista detekointireagenssi 1:stä peräisin olevien aerosolien kautta tai laboratoriopölyn, yms. johdosta.
	Automaattisen kuoppalevypesurin virhetoiminto.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta tai katso <i>Automaattisen kuoppalevypesurin käyttöoppaan</i> kohdassa Vianetsintä annettuja ohjeita kontaminaatio- ja virhetoimintotilanteisiin liittyvistä testeistä.
<p><b>Laajaa vaihtelua replikaattien % CV-arvoissa.</b></p>	Epätarkkuutta pipetoinnissa (ts. ilmakuplia, pipetti kalibroimaton).	Tarkista, että pipetin annostelumäärät ovat toistettavia. Kalibroi pipetit säännöllisin välein.
	Riittämätön sekoittaminen.	Sekoita perusteellisesti joka vaiheessa. Vorteksoi ennen denaturointi-inkubointia ja sen jälkeen. Varmista, että näkyvä pyörre muodostuu.
	Epätäydellinen nesteen siirto hybridisaatiokuoppalevyltä sieppauskuoppalevyn kaivoihin.	Ole huolellinen siirtovaiheessa hybridisaatiokuoppalevyltä sieppauskuoppalevylle toistettavien määrien siirron varmistamiseksi.

**digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOE**

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
	Puutteelliset pesuolosuhteet.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria ja asianmukaisia automaattisen kuoppalevypesurin protokollia.
	Detekointireagenssi 1:n aiheuttama kuoppalevykaivojen kontaminoituminen.	Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaita ja kuivia. Noudata huolellisuutta detekointireagenssi 1:n käsittelyssä. Vältä aerosoleja.
	Pipetinkärjen kontaminoituminen denaturoimattomalla aineella denaturoidun näytteen siirtämisen aikana kuoppalevykaivoon, jota käytetään CT-koettimen hybridisaatioon.	Näytteen prosessoinnin denaturointivaihe on suoritettava näiden käyttöohjeiden mukaisesti. Näytteen väärä vorteksointi, putken kääntäminen ylösalaisin ja ravistelu voivat aiheuttaa epätäydellisen denaturoinnin kohdunkaulanäytteiden endogeenisissä, ei-spesifisissä RNA:DNA-hybrideissä. Kun käytetään PreservCyt-liuoksessa olevia näytteitä, näitä hybridejä on todennäköisesti näytteenkonversioputkien sisäseinämissä. Tämän denaturoimattoman soluaineen mahdollisen siirtymisen estämiseksi pipetinkärki ei saa koskettaa näytteenkonversioputken seinämiä denaturoidun näytteen siirron aikana kuoppalevykaivoon, jota käytetään CT-koettimen hybridisaatioon.
	Samalla Kimtowel-pyyhkeen kohdalla on kuivattu useita rivejä.	Älä kuivaa kohteita Kimtowel-pyyhkeen samaan kohtaan.
<b>Väärät positiiviset tulokset tunnetuista negatiivisista näytteistä.</b>	Denaturointireagenssi 2 kontaminoitunut.	Varo näytteiden ristiinkontaminoitumista detekointireagenssi 2:n lisäyksen yhteydessä. Jos käytät vain osaa pakkauksesta, alikvo analyysiin tarvittava määrä puhtaaseen reagenssiastian ennen pipetin täyttöä.
	Detekointireagenssi 1:n aiheuttama kuoppalevykaivojen kontaminoituminen.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria. Kaivoissa ei saa näkyä vaaleanpunaisen nesteen jäämiä pesun jälkeen.
	Pipetinkärjen kontaminoituminen denaturoimattomalla aineella denaturoidun näytteen siirtämisen aikana kuoppalevykaivoon, jota käytetään CT-koettimen hybridisaatioon.	Näytteen prosessoinnin denaturointivaihe on suoritettava näiden ohjeiden mukaisesti. Näytteen väärä vorteksointi, putken kääntäminen ylösalaisin ja ravistelu voivat aiheuttaa epätäydellisen denaturoinnin kohdunkaulanäytteiden endogeenisissä, ei-spesifisissä RNA:DNA-hybrideissä. Kun käytetään PreservCyt-liuoksessa olevia näytteitä, näitä hybridejä on todennäköisesti näytteenkonversioputkien sisäseinämissä. Tämän denaturoimattoman soluaineen mahdollisen siirtymisen estämiseksi pipetinkärki ei saa koskettaa näytteenkonversioputken seinämiä denaturoidun näytteen siirron aikana kuoppalevykaivoon, jota käytetään CT-koettimen hybridisaatioon.
	Riittämätön näytteen valmistus.	Lisää tarvittava määrä denaturointireagenssia ja sekoita hyvin vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on varmistettava, että neste huuhtelee putken sisäpinnan kauttaaltaan ja tämä tehdään käyttämällä moninäyteputkivortexi 2:n menetelmää vähintään 5 sekuntia (jos käytät manuaalista vorteksointimenetelmää, käännä putki kerran ylösalaisin). Tällöin värin tulee selkeästi muuttua kirkaasta tumman purppuranpunaiseksi. Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $45 \pm 5$ minuuttia. PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä näitä hybridejä on todennäköisesti näytteen konversioputken sisäseinämissä. Denaturoimattomien solujen siirtymisen estämiseksi pipetin kärki ei saa koskettaa näytteen konversioputken laitoja denaturoituja näytteitä siirrettäessä mikrokuoppalevylle, jota käytetään CT/GC-koettimen hybridisaatioon. Katso lisäohjeita <i>digene</i> HC2 -näytteen konversiopakkausten käyttöohjeista.
	Puutteelliset pesuolosuhteet.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria ja asianmukaisia automaattisen kuoppalevypesurin protokollia.
<b>Kohonneet negatiiviset kalibraattorin RLU-arvot (&gt; 150 RLU-yksikköä). Muu osa analyysistä toimi</b>	Detekointireagenssia 2 inkubointi yli 20-25 °C:n lämpötilassa.	Koe on epäpätevä johtuen korkeista negatiivisista kalibraattoriarvoista. Suorita koe uudelleen ja varmista, että sieppaus- ja detekointivaiheet inkuboidaan 20-25 °C:n lämpötilassa.
	Detekointireagenssi 2:n inkubointi kestänyt yli 30 minuuttia.	Lue levy 15 minuutin inkuboinnin jälkeen (enintään 30 minuutin kuluttua) lämpötilassa 20-25 °C.

**digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOE**

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
odotetulla tavalla.	Detekointireagenssi 2 tai pesupuskuri on alkalisen fosfataasin tai detekointireagenssi 1:n kontaminoima.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.

**KONTAMINAATIOTARKISTUS**

Arvioitu reagenssi	Kontaminaatiotarkistusmenetelmä	Tulosten tulkitseminen
<b>Huomautus:</b> Pipetoi detekointireagenssi 2 huolellisesti kontaminaation estämiseksi. Käytä suojakäsineitä ja vältä koskemasta työskentelytasojä pipetin kärjellä.		
<b>Detekointireagenssi 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipetoi 75 µl alikvoitua, jäljelle jäänyttä tai alkuperäistä detekointireagenssia 2 tyhjän keräysmikrolevyn kaivoon.</li> <li>Inkuboi 20–25 °C:ssa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta.</li> <li>Lue mikrolevyn kaivot luminometrillä.</li> </ul> <p><b>Huomautus:</b> Detekointireagenssin 2 testaaminen kolmena kappaleena tuottaa optimaalisen suorituskyvyn arvioinnin.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detekointireagenssin 2 kontrollin tulisi olla &lt;50 RLU:ta.</li> <li>Jos detekointireagenssin 2 arvot ovat &lt;50 RLU:ta, detekointireagenssia 2 voidaan käyttää arvion toistamiseen.</li> <li>Jos kontaminoitunut (&gt;50 RLU:ta), ota käyttöön uusi pakkaus ja toista arvio.</li> </ul>
<b>Pesulaite ja/tai vesilähde</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipetoi 75 µl detekointireagenssia 2 neljään erilliseen keräysmikrolevyn kaivoon.</li> <li>Merkitse kaivot numeroilla 1–4.</li> <li>Kaivo 1 on detekointireagenssin 2 kontrolli.</li> <li>Pipetoi 10 µl pesupuskuria pesuainepullosta kaivoon 2.</li> <li>Anna pesupuskurin virrata pesuletkun läpi.</li> <li>Pipetoi 10 µl pesupuskuria letkusta kaivoon 3.</li> <li>Hanki alikvotti vedestä, jota käytettiin pesupuskurin valmisteluun. Pipetoi 10 µl vettä kaivoon 4.</li> <li>Inkuboi 20–25 °C:ssa 15 minuuttia. Suojaa suoralta auringonvalolta.</li> <li>Lue mikrolevyn kaivot luminometrillä.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detekointireagenssin 2 kontrollin (kaivo 1) tulisi olla &lt;50 RLU:ta.</li> <li>Vertaa RLU-arvoa kaivoista 2, 3 ja 4 detekointireagenssin 2 kontrollin RLU-arvoon (kaivo 1). Yksittäisten RLU-arvojen kaivoista 2, 3 ja 4 tulisi olla korkeintaan 50 RLU:ta detekointireagenssin 2 kontrollin RLU-arvosta (kaivo 1).</li> <li>Arvot, jotka ovat yli 50 RLU:ta detekointireagenssin 2 kontrollista, tarkoittavat kontaminaatiota. Katso pesulaitteen puhdistus- ja kunnossapito-ohjeita reagenssin valmistelu- ja säilytysohjeista.</li> </ul>
<b>Automaattinen levyn pesulaite</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipetoi 75 µl detekointireagenssia 2 viiteen erilliseen keräysmikrolevyn kaivoon.</li> <li>Merkitse kaivot numeroilla 1–5.</li> <li>Kaivo 1 on detekointireagenssin 2 kontrolli.</li> <li>Pipetoi 10 µl pesupuskuria levyn pesuainepullosta (merkintä <i>Wash</i>) kaivoon 2.</li> <li>Pipetoi 10 µl huuhteluaainetta levyn pesuainepullosta (merkintä <i>Rinse</i>) kaivoon 3.</li> <li>Paina levyn pesulaitteen näppäimistön Prime-näppäintä, jolloin pesupuskuri virtaa letkujen läpi.</li> <li>Pipetoi 10 µl pesupuskuria syvennyksestä kaivoon 4.</li> <li>Paina levyn pesulaitteen näppäimistön Rinse-näppäintä, jolloin huuhteluaaine virtaa letkujen läpi.</li> <li>Pipetoi 10 µl pesupuskuria syvennyksestä kaivoon 5.</li> <li>Peitä ja inkuboi 15 minuuttia 20–25 °C:ssa. Suojaa suoralta auringonvalolta.</li> <li>Lue mikrolevyn kaivot luminometrillä.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detekointireagenssin 2 kontrollin (kaivo 1) tulisi olla &lt;50 RLU:ta.</li> <li>Vertaa RLU-arvoa kaivoista 2, 3, 4 ja 5 detekointireagenssin 2 kontrollin RLU-arvoon (kaivo 1). Yksittäisten RLU-arvojen kaivoista 2, 3, 4 ja 5 tulisi olla korkeintaan 50 RLU:ta detekointireagenssin 2 kontrollin RLU-arvosta (kaivo 1).</li> <li>Arvot, jotka ovat yli 50 RLU:ta detekointireagenssin 2 kontrollista, tarkoittavat levyn pesulaitteen kontaminaatiota.</li> <li>Katso dekontaminaatiomenetelmiä automaattisen levyn pesulaitteen käyttöoppaasta.</li> </ul>

## QIAGEN YHTEYSTIEDOT

Yhteyttä QIAGEN paikalliseen edustajaan voit ottaa käyttämällä tuotteen mukana toimitettuja yhteystietoja.

QIAGEN<sup>®</sup>, *digene*<sup>®</sup>, Hybrid Capture<sup>®</sup> ja Rapid Capture<sup>®</sup> ovat QIAGENin rekisteröityjä tavaramerkkejä.

Hybrid Capture -tekniikka on suojattu eurooppalaisella patentilla nro 0 667 918, joka on rekisteröity Itävallassa, Belgiassa, Sveitsissä, Liechtensteinissa, Saksassa, Tanskassa, Espanjassa, Ranskassa, Yhdistyneessä kuningaskunnassa, Kreikassa, Irlannissa, Italiassa, Luxemburgissa, Alankomaissa ja Ruotsissa.

Yhdysvaltalaiset Hybrid Capture -patentit, nro: 6,228,578B1

Rekisteröityihin tavaramerkkeihin liittyvät maininnat:

ThinPrep<sup>®</sup> ja PreservCyt<sup>®</sup>: Hologic Corporation  
Kimtowels<sup>®</sup>: Kimberly-Clark Corporation  
Eppendorf<sup>®</sup> ja Repeater<sup>®</sup>: Eppendorf-Netheler-Hinz  
CDP-Star<sup>®</sup>: Tropix, Inc.  
Parafilm<sup>®</sup>: American Can Co.  
DuraSeal<sup>®</sup>: Diversified Biotech, Inc  
Sarstedt<sup>®</sup>: SARSTEDT AG & Co.  
pGEM<sup>®</sup>: Promega Corporation  
VWR<sup>®</sup>: VWR International, Inc.  
Corning<sup>®</sup>: Corning, Inc.

# digene HC2 CT-ID DNA TEST -KOKOONLIIKKE

**Tärkeää:** Menetelmään tulee tutustua yksityiskohtaisesti ennen tämän yhteenvedon soveltamista.

TEHTÄVIEN SUORITUSJÄRJESTYS					
<b>Denaturointi</b> (Ks. PreservCyt-liuoksessa olevien näytteiden valmistusmenetelmä, kun prosessoit PreservCyt-liuoksessa olevia näytteitä)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Manuaalinen vorteksimenetelmä:</th> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Moninäyteputki vortexi 2-menetelmä</th> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                     Luo kuoppalevyn layout.                      Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimilapulla.                      Valmista denaturointireagenssi.                      ↓                      Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin.                      Vorteksioi kutakin näytettä, kalibraattoria ja laatukontrollia erikseen 5 sekunnin ajan suurella nopeudella ja käännetään ylösalaisin (ks. käyttöohjeissa annetut yksityiskohtaiset ohjeet).                      Varmista, että kaikki putket ovat purppuranpunaisia.                      ↓                      Inkuboi <math>65 \pm 2</math> °C:n lämpötilassa <math>45 \pm 5</math> minuuttia.                      ↓                      Valmistele CT-koetinseos.                      ↓                      ↓                      ↓                      ↓                 </td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                     Luo kuoppalevyn layout                      Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimilapulla.                      Valmista denaturointireagenssi.                      ↓                      Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin.                      Varmista, että kaikki putket ovat purppuranpunaisia.                      ↓                      Peitä teline kalvolla ja kannella.                      ↓                      Vorteksioi 10 sekunnin ajan maksiminopeudella.                      Inkuboi <math>65 \pm 2</math> °C:n lämpötilassa <math>45 \pm 5</math> minuuttia.                      ↓                      Valmistele CT-koetinseos.                      ↓                 </td> </tr> </table>	Manuaalinen vorteksimenetelmä:	Moninäyteputki vortexi 2-menetelmä	Luo kuoppalevyn layout. Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimilapulla. Valmista denaturointireagenssi. ↓ Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin. Vorteksioi kutakin näytettä, kalibraattoria ja laatukontrollia erikseen 5 sekunnin ajan suurella nopeudella ja käännetään ylösalaisin (ks. käyttöohjeissa annetut yksityiskohtaiset ohjeet). Varmista, että kaikki putket ovat purppuranpunaisia. ↓ Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $45 \pm 5$ minuuttia. ↓ Valmistele CT-koetinseos. ↓ ↓ ↓ ↓	Luo kuoppalevyn layout Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimilapulla. Valmista denaturointireagenssi. ↓ Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin. Varmista, että kaikki putket ovat purppuranpunaisia. ↓ Peitä teline kalvolla ja kannella. ↓ Vorteksioi 10 sekunnin ajan maksiminopeudella. Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $45 \pm 5$ minuuttia. ↓ Valmistele CT-koetinseos. ↓
Manuaalinen vorteksimenetelmä:	Moninäyteputki vortexi 2-menetelmä				
Luo kuoppalevyn layout. Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimilapulla. Valmista denaturointireagenssi. ↓ Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin. Vorteksioi kutakin näytettä, kalibraattoria ja laatukontrollia erikseen 5 sekunnin ajan suurella nopeudella ja käännetään ylösalaisin (ks. käyttöohjeissa annetut yksityiskohtaiset ohjeet). Varmista, että kaikki putket ovat purppuranpunaisia. ↓ Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $45 \pm 5$ minuuttia. ↓ Valmistele CT-koetinseos. ↓ ↓ ↓ ↓	Luo kuoppalevyn layout Varusta hybridisaatiokuoppalevy nimilapulla. Valmista denaturointireagenssi. ↓ Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontrolleihin ja näytteisiin. Varmista, että kaikki putket ovat purppuranpunaisia. ↓ Peitä teline kalvolla ja kannella. ↓ Vorteksioi 10 sekunnin ajan maksiminopeudella. Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $45 \pm 5$ minuuttia. ↓ Valmistele CT-koetinseos. ↓				
<b>Hybridisaatio</b>	<b>Kuoppalevyn lämmitin I -menetelmä</b> Sekoita denaturoidut näytteet hyvin ja pipetoi 75 µl denaturoitua kalibraattoria, laatukontrollia tai näytettä kuoppalevykaivoihin. ↓ Inkuboi 10 minuuttia $20-25$ °C:n lämpötilassa. ↓ Pipetoi 25 µl:a CT-koetinseosta kuoppalevykaivoihin. ↓ Peitä kuoppalevy kannella ja ravista tasoravistin I:ssä nopeudella $1100 \pm 100$ kierrosta/min $3 \pm 2$ minuutin ajan. <i>Tarkista, että kaikki kaivot ovat keltaisia.</i> (PreservCyt-liuoksessa olevat näytteet muuttuvat vaaleanpunaisiksi.) ↓ Inkuboi $65 \pm 2$ °C:n lämpötilassa $60 \pm 5$ minuuttia. ↓ Valmista sieppauskuoppalevy. ↓				
<b>Hybridinsieppaus</b>	Siirrä kunkin hybridisaatiokuoppalevyn kaivon sisältö vastaavaan kaivoon sieppauskuoppalevyllä 8-kanaavaista pipettiä käyttäen. ↓ Peitä kuoppalevyn kannella tai tiivisteellä. Ravista nopeudella $1100 \pm 100$ kierrosta/min $20-25$ °C:n lämpötilassa $60 \pm 5$ minuuttia. Valmistele pesupuskuri. ↓ Dekantoi ja kuivaa sieppauskuoppalevy (ks. lisätietoja käyttöohjeista). ↓				
<b>Hybridin detekointi</b>	Pipetoi 75 µl:a detekointireagenssi 1:ta sieppauskuoppalevyn jokaiseen kaivoon. Peitä sieppauskuoppalevy kuoppalevyn kannella, Parafilm-kalvolla tai vastaavalla. <b>Inkuboi <math>20-25</math> °C:n lämpötilassa <math>30-45</math> minuuttia. Pese kuoppalevy haluttua menetelmää käyttäen.</b> ↓				
<b>Peseminen</b>	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Manuaalinen pesumenetelmä</th> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Automaattinen kuoppalevy pesuri -menetelmä</th> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                     Tyhjennä ja kuivaa sieppauskuoppalevy (ks. lisätietoja pakkausselosteesta).                      ↓                      Pese 6 kertaa.                      ↓                      Kuivaa vähänukkaisiin paperipyyhkeisiin.                      ↓                 </td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                     Aseta kuoppalevy pesulaitteeseen ja paina "START/STOP".                      Siirry seuraavaan vaiheeseen.                      ↓                      ↓                      ↓                      ↓                 </td> </tr> </table>	Manuaalinen pesumenetelmä	Automaattinen kuoppalevy pesuri -menetelmä	Tyhjennä ja kuivaa sieppauskuoppalevy (ks. lisätietoja pakkausselosteesta). ↓ Pese 6 kertaa. ↓ Kuivaa vähänukkaisiin paperipyyhkeisiin. ↓	Aseta kuoppalevy pesulaitteeseen ja paina "START/STOP". Siirry seuraavaan vaiheeseen. ↓ ↓ ↓ ↓
Manuaalinen pesumenetelmä	Automaattinen kuoppalevy pesuri -menetelmä				
Tyhjennä ja kuivaa sieppauskuoppalevy (ks. lisätietoja pakkausselosteesta). ↓ Pese 6 kertaa. ↓ Kuivaa vähänukkaisiin paperipyyhkeisiin. ↓	Aseta kuoppalevy pesulaitteeseen ja paina "START/STOP". Siirry seuraavaan vaiheeseen. ↓ ↓ ↓ ↓				
<b>Signaalin vahvistus</b>	Pipetoi 75 µl:a detekointireagenssi 2:ta sieppauskuoppalevyn jokaiseen kaivoon. <b>Peitä kuoppalevyn kannella. Inkuboi <math>20-25</math> °C:n lämpötilassa <math>15-30</math> minuuttia.</b> ↓				
<b>Lukeminen</b>	Lue sieppauskuoppalevy QIAGENin hyväksymällä luminometrillä. ↓ Validoi analyysi ja tulkitse näytteen tulokset.				