



Hybrid Capture[®] 2

CT-ID DNA Test

Bruksanvisning

***digene*[®] HC2 CT-ID DNA Test**

En *in vitro*-nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning och kemiluminescens på mikrotiterplatta för kvalitativ detektion av *Chlamydia trachomatis* (CT) DNA i cervixprover.

Att användas med:

digene[®] HC2 DNA-provtagningsanordning
digene[®] Female Swab Specimen Collection Kit
Hologic PreservCyt[®]-lösning

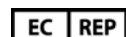
STÖRRE ÄNDRINGAR FRÅN TIDIGARE VERSION AV BIPACKSEDEL

1. Uppdaterad produktmärkning
2. Uppdaterat CE-registreringsnummer
3. Borttagna reflextestreferenser och data.

Endast för professionellt bruk av utbildad och godkänd laboratoriepersonal. Läs dessa instruktioner noggrant innan testet används.



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

©2011 QIAGEN



CE-märkningen visar att *digene* HC2 CT-ID DNA Test uppfyller kraven i direktivet 98/79/EC om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik.

0197

IVD



96

REF 5135-1330

L2171SV Rev. 3

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

NAMN OCH ANVÄNDNINGSSOMRÅDE.....	1
SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING	1
TESTPRINCIP	2
MEDFÖLJANDE REAGENS OCH MATERIEL	3
NÖDVÄNDIGA TILLBEHÖR SOM EJ MEDFÖLJER.....	4
VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER	5
SÄKERHETSFÖRESKRIFTER.....	5
INFORMATION OM SÄKERHET OCH HÄLSORISKER.....	6
ANVÄNDNINGSFÖRESKRIFTER	7
REAGENSTILLVERKNING OCH FÖRVARING.....	8
PROVTAGNING OCH PROVHANTERING	10
CERVIXPROVER I <i>digene</i> STM.....	10
CERVIXPROVER I HOLOGIC PRESERVICYT-LÖSNING	10
TESTFÖRFARANDE.....	11
HÖGKAPACITETSTESTNING MED ANVÄNDNING AV RAPID CAPTURE-SYSTEMET (RCS).....	11
MANUELL METOD	11
DENATURERING.....	12
Prepareringsförfarande för kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover	12
Prepareringsförfarande för prover i PreservCyt-lösning	14
Valfri stoppunkt.....	17
HYBRIDISERING	17
HYBRIDINFÅNGNING	18
HYBRIDDETEKTION	19
TVÄTTNING	19
SIGNALFÖRSTÄRKNING.....	20
KRITERIER FÖR VERIFIKATION AV ANALYSKALIBRERING.....	21
CUTOFF-BERÄKNING.....	22
KVALITETSKONTROLL	23
TOLKNING AV PROVRESULTAT	23
BEGRÄNSNINGAR I TESTFÖRFARANDET.....	24
FÖRVÄNTADE RESULTAT	25
PREVALENS.....	25
POSITIVA OCH NEGATIVA FÖRVÄNTADE VÄRDEN	25
FREKVENSFÖRDELNING: <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST RLU/CO-RESULTAT	26
PRESTANDAEGENSKAPER.....	26
RESULTAT FRÅN KLINISKA STUDIER PER PROV.....	26
REPRODUCERBARHET	30
PRECISION	32
Precision med prover i PreservCyt-lösning	33
ANALYTISK KÄNSLIGHET	34
Andra hänsyn vid prover i PreservCyt-lösning.....	35
ANALYTISK SPECIFICITET	36
EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I TRANSPORTMEDIUM FÖR PROVER.....	38
EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I PRESERVICYT-LÖSNING	38
PRECISIONEN VID CUTOFF FÖR <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST MED KLINISKA PROVER TAGNA I STM.....	38
HISTORISK INFORMATION.....	39
EKVIVALENS MELLAN PROVER I STM OCH PRESERVICYT-LÖSNING.....	40
REFERENSER.....	41
GUIDE FÖR PROBLEMLÖSNING	43
KONTAMINERINGSKONTROLL	48
KONTAKTINFORMATION	49
ÖVERSIKT ÖVER <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST.....	50

NAMN OCH ANVÄNDNINGSMÅL

digene[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) CT-ID DNA Test är en *in vitro*-nukleinsyrehybridiseringsanalys med signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikrotiterplatta för den kvalitativa detektionen av *Chlamydia trachomatis* (CT) DNA i cervixprover som tagits med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning (som består av cervixborste och *digene* Specimen Transport Medium (STM) *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (provtagningsspinne och STM) eller prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp och lagts i Hologic PreservCyt[®]-lösning. *digene* HC2 CT-ID DNA Test är avsett att användas som ett initialt test för att identifiera symtomatiska eller asymtomatiska kvinnor såsom ett bevis för infektion med *Chlamydia trachomatis*.

digene HC2 CT-ID DNA Test kan tillsammans med Rapid Capture[®] System (RCS) användas för att erhålla hög testkapacitet.

För *in vitro*-diagnostisk användning IVD

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Klamydia är en gramnegativ organism med en tvåfasig livscykel med morfologiskt distinkta former för dess smittsamma och reproduktiva stadier.¹ *Chlamydia trachomatis*-genom är relativt litet och mäter ungefär 1×10^6 baspar.² Den smittsamma formen är en elementärkropp som inte kan dela sig och dess enda uppgift är att överföra infektionen från en cell till en annan. Väl inne i värdcellen ansamlas elementärkropparna i membraninneslutna vakuoler för att bilda metaboliskt aktiva reproduktiva klamydiaformer eller retikulära kroppar. Replikationen är helt beroende av värdcellens ATP³ och uppnås genom en binär fission inom de refraktila cytoplasmiska inklusionerna och producerar en ny generation av elementärkroppar som frigörs för att infektera andra celler. Klamydia har också en membranbunden och könsspecifik lipopolysackarid som har fungerat som en antigenkälla för produktionen av diagnostiska antikroppar.

Konventionella metoder för detektion av *Chlamydia trachomatis* i kliniska prover inkluderar jod- eller Giemsa-färgning av organism följt av mikroskopisk utvärdering⁴ eller den mer känsliga användningen av direktfärgning av fluorescein-konjugerade antikroppar (DFA).⁵ Dock så uppnår dessa metoder bara en känslighet på 70-85 % jämfört med optimala odlingstekniker.⁶ Den mest erkända proceduren för detektion av klamydia är infektion av odlade McCoy-celler. Fluorescein-konjugerade antikroppar används därefter för att detektera intracytoplasmiska inklusionskroppar som skapats av de infekterade cellernas reproduktiva element.⁷ Optimal cellodling har en utmärkt känslighet och specificitet för detektion av klamydia, men är en komplex, dyrbar och tidskrävande procedur. Resultat är i allmänhet inte tillgängliga förrän 48-72 timmar efter inokulation.⁸ Immunanalyser med enzymer används också för att detektera klamydia-antigen⁶ och synes vara något mer känsliga och något mindre specifika än direkta fluorescensmetoder med antikroppar.⁹ Nukleinsyratester finns också tillgängliga för detektion av olika klamydia-mål, inklusive kromosomalt DNA, mRNA och den kryptiska plasmiden som är gemensam för det stora flertalet *Chlamydia trachomatis*-stammar. Dessa metoder varierar i känslighet och specificitet men är i stort sett som med odling eller överstiger odlingsmetodernas prestanda.¹⁰⁻¹²

TESTPRINCIP

digene HC2 CT-ID DNA Test använder *digene* hybridinfångning 2 teknik som är en nukleinsyrehybridiseringsanalys med signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikrotiterplatta för detektion. Prover som innehåller mål-DNA hybridiserar med en specifik klamydia RNA-prob. De resulterande RNA:DNA-hybriderna fångas in på en brunn i mikrotiterplattan som är belagd med antikroppar specifika för RNA:DNA-hybrider. De immobiliserade hybriderna får därefter reagera med alkaliskt fosfataskonjugerade antikroppar för RNA:DNA-hybriderna och detekteras med ett kemiluminescenssubstrat. Flera molekyler av alkaliskt fosfatas konjugeras till varje antikropp. Flera konjugerade antikroppar binds till varje infångad hybrid vilket resulterar i en avsevärd signalförstärkning. När substratet klyvs av det bundna alkaliska fosfataset emitteras ljus som mäts såsom relativa ljusenheter (RLU) med en luminometer. Ljusets emitterade intensitet anger frånvaro eller närvaro av mål-DNA i provet.

Ett mätresultat av RLU som är lika med eller större än den angivna kvoten för det positiva cutoff (CO)-värdet indikerar närvaro av klamydia DNA i provet. Ett mätresultat av RLU som är mindre än den angivna kvoten för det positiva cutoff-värdet indikerar frånvaro av de klamydia- eller klamydia DNA-nivåer som ligger under analysens detektionsgräns.

CT-proben innehåller en probblandning som har valts speciellt så att korsreaktivitet med DNA-sekvenser från humanceller, andra bakteriearter eller andra klamydia-arter förutom *Chlamydia trachomatis* elimineras eller minimeras. Den CT-prob som levereras med *digene* HC2 CT-ID DNA Test motsvarar ungefär 39 300 baspar eller 4 % av klamydias genom-DNA (1×10^6 baspar).³ En prob motsvarar till 100 % den kryptiska plasmiden på 7 500 baspar.

Höghöghkapacitetstestning med *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan göras med hjälp av ett vanligt system för automatisk pipettering och spädning såsom Rapid Capture-systemet (RCS). Detta instrument kan med hjälp av en applikation som är specifik för *digene* HC2 CT-ID DNA Test köra upp till 352 prover på åtta timmar. För att möjliggöra höghöghkapacitetstestning så utförs analysens alla procedurmoment av RCS med undantag för denaturering av prover, kemiluminescent signaldetektion och resultatrapportering.

MEDFÖLJANDE REAGENS OCH MATERIEL

Det finns 96 tester i varje sats av *digene* HC2 CT-ID DNA Test (REF 5135-1330). Antalet patientresultat varierar beroende på hur många gånger satsen används:

- 1 gång = 88 patientresultat
- 2 gånger = 80 patientresultat
- 3 gånger = 72 patientresultat
- 4 gånger = 64 patientresultat

Indikatorfärg INDIC Innehåller 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 0,35 ml
Reagens för denaturering* REAG DENAT Spädd natriumhydroxidlösning (NaOH).	1 x 50 ml
Spädningsvätska för prob* DIL PROBE Buffertlösning med 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 5 ml
CT-prob PROBE CT CT-RNA-prob i buffertlösning.	1 x 200 µl
Negativ kalibrator (NK) CAL - Bärr-DNA i transportmedium för prover (STM) med 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 2 ml
CT-positiv kalibrator (PK) CAL CT + 1,0 pg/ml klonad CT-DNA och bärr-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 1 ml
Kvalitetskontroll CT (KK CT) QC CT 5,0 pg/ml klonad CT-DNA och bärr-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 1 ml
Kvalitetskontroll GC (KK GC) QC GC 5,0 pg/ml klonad GC-DNA och bärr-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 1 ml
Fångande mikrotiterplatta PLATE CAPTURE Belagd med anti-RNA:DNA-hybridantikroppar.	1 av varje
Detektionsreagens 1 REAG DET 1 Alkaliskt fosfatas-konjugerade antikroppar för RNA:DNA-hybrider i buffertlösning med 0,05 % vikt/vol natriumazid.	1 x 12 ml
Detektionsreagens 2 REAG DET 2 CDP-Star® med Emerald II (kemiluminiscenssubstrat).	1 x 12 ml
Tvättbuffertkoncentrat* BUF WASH X 30 Innehåller 1,5 % vikt/vol natriumazid.	1 x 100 ml

*Se avsnittet *Varningar och försiktighet* i denna bipacksedel för information om hälsa och säkerhet.

NÖDVÄNDIGA TILLBEHÖR SOM EJ MEDFÖLJER

Diagnostisk *in vitro*-utrustning och tillbehör för hybridinfångningssystemet^A

digene Hybrid Capture 2 System ("*digene* HC2 System"), bestående av en QIAGEN-godkänd luminometer ("luminometer"), QIAGEN-godkänd persondator med kringutrustning (bildskärm, tangentbord, mus, skrivare och skrivarkabel), *digene* HC2 systemprogram ("*digene* analysprogram"), *digene* HC2 systemanalysprotokoll för CT/GC, LumiCheck plattprogram samt användarhandbok till *digene* HC2 systemprogram

Roterande skak 1 till hybridinfångningssystemet

Värmeblock för mikrotiterplattor till hybridinfångningssystemet

Automatisk tvättapparat för plattor för hybridinfångningssystemet

MST Vortexer 2 i hybridinfångningssystemet (tillval)^B

Konversionsställ och lock (tillval för manuell användning, behövs när Rapid-Capture-systemet används med *digene* HC2 CT-ID DNA-test och *PreservCyt*-prover)

digene provrörsställ och lock (tillval för manuell användning: (behövs när Rapid-Capture-systemet används med *digene* HC2 CT-ID DNA-test och *digene* HC2-prover som tagits med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning)

EXPAND-4™ pipett och ställ (tillval)^C

digene HC2 DNA provtagningsanordning

digene Female Swab Specimen Collection Kit (består av två provtagningspinnar och *digene* Specimen Transport Medium™)^D

Dispenser för rörförseglingsfilm och avskärningsanordning (används med MST Vortexer 2)

Rapid Capture®-system (tillval för högkapacitetstestning)^E

Tvättapparat

Mikrotiterplattor för hybridisering

Lock för mikrotiterplattor

Tomma strips för mikrotiterplattor (från Costar, modellnr. 2581).

Tillval för användning med automatisk tvättapparat för plattor I

Extra långa pipettspetsar för uttagning av prover

Provtagningsrör

Ställ för provtagningsrör

Skruvlock för provtagningsrör

Reagensbehållare för engångsbruk

DuraSeal® plastfilm för försegling av rör

Utrustning och tillbehör för allmänt laboratoriebruk

65 ± 2 °C vattenbad som rymmer antingen ett konversionsställ (36 x 21 x 9 cm) eller två *digene* provrörsställ (31,7 x 15,2 x 6,4 cm vardera)

Mikrocentrifug (tillval för centrifugering av probflaskor för maximal probvolym)

Vortexblandare med koppfäste

Enkanalsmikropipett; variabel inställning för volymer 20-200 µl och 200-1000 µl

Repeterande PD-pipett såsom Eppendorf® Repeater® Pipette eller likvärdig

8-kanalspipett; variabla inställningar för 25-200 µl

Timer

Natriumhypokloritlösning, 0,5 % slutlig koncentration (eller hushållsblekmedel)

Parafilm® eller likvärdigt

Engångspipettspetsar med aerosolfilter för enkanalspipett (20-200 µl och 200-1000 µl)

Engångsspetsar för Eppendorf Repeater Pipette (25 och 500 µl)

Engångsspetsar för 8-kanalspipett (25 till 200 µl)

Kimtowels® torkduk eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar

Bänkskydd för engångsbruk

Puderfria handskar

5 ml och/eller 15 ml rundbottnade polypropylenrör med snäpplock (för spädning av prob)

2,0 ml polypropylenrör med lock för mikrocentrifug

Extra utrustning och tillbehör för behandling av prover i *PreservCyt*-lösning

Svängrotorscentrifug som kommer upp till 2900 ± 150 x g och rymmer koniska polypropylenrör på 10 eller 15 ml för centrifugering

5 ml serologiska pipetter och överföringspipetter

digene HC2 Sample Conversion Kit^A

Engångsspetsar för Eppendorf Repeater (50 och 100 µl)

För manuellt blandningsförfarande:

Provrör för *digene* HC2 Sample Conversion (15 ml koniska)^F, Sarstedt® 10 ml koniska rör med lock eller 15 ml centrifugrör med lock och konisk botten av polypropylen av märke VWR® eller Corning®

Rörställ för koniska rör på 10 eller 15 ml

För MST Vortexer 2-förfarande

Provrör för *digene* HC2 Sample Conversion (15 ml koniska)^F

MST Vortexer 2-rör

Konversionsställ och lock (specifikt för 15 ml koniska rör)

Dispenser för rörförseglingsfilm och avskärningsanordning

DuraSeal rörförseglingsfilm (används med MST Vortexer 2)

^A Endast utrustning och tillbehör som validerats med *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan erhållas från QIAGEN.

^B Behövs även för den halvautomatiska RCS-tillämpningen.

- ^C Kundens egen utrustning. Andra expanderbara multikanalpipetter kan användas förutsatt att ett spetsavstånd på 3,2 cm kan uppnås i expanderat läge. Alternativt kan en enkanalpipett med en pipetteringskapacitet på 75 µl användas.
- ^D Prestandaegenskaper för *digene* HC2 CT-ID DNA Test fastställdes med de nämnda provtagningsseterna.
- ^E Se *användarhandboken för Rapid Capture-systemet* för anvisningar som är specifika för användning av systemet för högkapacitetstestning med denna analys.
- ^F Provrör för *digene* HC2 Sample Conversion (av märke VWR eller Corning[®]) som kan beställas från QIAGEN måste användas för att tillförsäkra rätt prestanda för analysen vid användning av MST Vortexer 2-förfarandet.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

LÄS ALLA INSTRUKTIONER NOGGRANT INNAN TESTET ANVÄNDS.

SÄKERHETSFÖRESKRIFTER

ALLA PROVER ska behandlas som potentiellt smittförande. Ingen känd testmetod kan helt garantera att prover inte överför infektion. Det rekommenderas att humanprover handhas enligt gällande nationella/lokala säkerhetsföreskrifter för biologiska ämnen.^{13,14,15,16} Dessa biologiska säkerhetsföreskrifter ska tillämpas för alla materiel som innehåller eller misstänks innehålla smittförande ämnen. Dessa försiktighetsåtgärder inkluderar men begränsas inte till det följande:

1. Pipettera inte med munnen.
2. Rök, ät eller drick inte i de lokaler där reagenser eller prover handhas.
3. Använd puderfria engångshandskar när du handskas med reagenser eller prover. Tvätta händerna noggrant när testet slutförts.
4. Rengör och desinficera allt spill från prover med ett desinfektionsmedel som har tuberkulocid effekt såsom 0,5 % v/v natriumhypoklorit, eller annat lämpligt desinfektionsmedel.^{17,18}
5. Dekontaminering och avfallshantering av prover, reagenser och annat potentiellt kontaminerat materiel ska ske enligt gällande nationella och lokala föreskrifter.^{19,20}

Vissa reagenser innehåller natriumazid. Natriumazid har rapporterats bilda bly- eller kopparazid i laboratoriers avloppssystem. Dessa azider kan explodera vid slag, t.ex. med hammare. För att förebygga uppkomsten av bly- eller kopparazid ska avlopp spolats ordentligt med vatten efter borthållning av lösningar som innehåller natriumazid. För att ta bort föroreningar från äldre avloppssystem som misstänks ha ackumulerat azider rekommenderar National Institute for Occupational Safety and Health (USA) följande: (1) sug upp vätskan från vattenlåset med en gummi- eller plastslang, (2) fyll på med 10-procentig v/v natriumhydroxidlösning, (3) låt stå i 16 timmar och (4) spola ordentligt med vatten.

INFORMATION OM SÄKERHET OCH HÄLSORISKER

MATERIELEN NEDAN HAR UTVÄRDERATS ENLIGT KRAVEN I EG-DIREKTIVET 99/45/EG.



T

Tvättbuffertkoncentrat. Innehåller natriumazid: Giftigt (T)

R25: Giftigt vid förtäring.

R52/53: Skadligt för vattenlevande organismer, kan orsaka långvariga negativa effekter på vattenmiljöer.

S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

S45: Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.



C

Reagens för denaturering innehåller natriumhydroxid: Frätande (C)

R35: Starkt frätande.

S26: Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.

S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

S45: Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten.



Xi

Spädningsmedel för prob. Innehåller BES och ättiksyra: Irriterande (Xi)

R36/38: Irriterande för ögon och hud.

S26: Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.

S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

AKUTINFORMATION DYGNET RUNT


MEDICINSK AKUTINFORMATION PÅ ENGELSKA, FRANSKA OCH TYSKA KAN ERHÅLLAS
DYGNET RUNT FRÅN:

GIFTINFORMATIONSCENTER MAINZ, TYSKLAND


TEL: +49-6131-19240

Se användarhandboken till Rapid Capture-systemet för ytterligare varningar och försiktighetsåtgärder som speciellt gäller för det systemet vid högkapacitetstestning med denna analys.

ANVÄNDNINGSFÖRESKRIFTER

1. För *in vitro*-diagnostisk användning
2. Cervixborste får endast användas på kvinnor som inte är gravida.
3. Använd inte reagenserna efter det utgångsdatum som anges vid symbolen  på ytterkartongens etikett.
4. Om testet görs utanför de angivna tids- och temperaturintervallen kan resultaten bli ogiltiga. Analyser som inte gjorts inom de etablerade tids- och temperaturintervallen är ogiltiga och måste göras om.
5. Testförfarandet för *digene* HC2 CT-ID DNA, kriterier för verifikation av analyskalibrering, kvalitetskontroll och tolkning av provresultat måste noggrant följas för att erhålla pålitliga testresultat.
6. Det är viktigt att pipettera den indikerade reagensvolymen exakt och att blanda väl efter tillsättning av varje reagens. Underlåtenhet att utföra detta kan resultera i felaktiga testresultat. Kontroll av att de angivna färgförändringarna inträffar bekräftar att dessa villkor har uppfyllts.
7. Satsens komponenter har testats som en enhet. **Byt inte** ut komponenter med komponenter från andra källor eller andra satser.
8. Nukleinsyror är mycket känsliga för degradering från nukleas i omgivningen. Nukleaser finns på människohud och på ytor eller materiel som har vidrörts av människor. Rengör och täck arbetsytor med bänkskydd för engångsbruk **och använd puderfria handskar för analysens alla moment.**
9. Var försiktig under analysens utförande för att förhindra kontaminering av fångande mikrotiterplatta och detektionsreagens 2 med exogent alkaliskt fosfatas. Substanser som kan innehålla alkaliskt fosfatas inkluderar detektionsreagens 1, bakterier, saliv, hår och oljor från huden. **Att fångande mikrotiterplatta täcks efter tvättmomentet och under inkuberingen med detektionsreagens 2 är speciellt viktigt eftersom alkaliskt fosfatas kan reagera med detektionsreagens 2 och ge falskt positiva resultat.**
10. Skydda detektionsreagens 2 mot långvarig exponering för direkt ljus. Använd reagenset inom angiven tidsram omedelbart efter alikvotering och undvik direkt solljus.
11. Den repeterande pipetten ska fyllas före dispensering av reagens och regelbundet kontrolleras för stora luftbubblor. Överdrivet stora luftbubblor i den repeterande pipettens spets kan medföra felaktig volym. Detta kan undvikas genom att fylla pipetten, dispensera all vätska och återfylla. Se pipetternas bruksanvisningar för detaljerade användningsinstruktioner.
12. Multikanalpipettering för dispenseringen av detektionsreagens 1 och 2 ska utföras med den omvända pipetteringstekniken (se *Hybriddetektion*). Kontrollera att varje pipettspets på multikanalpipetten är korrekt fastsatt och påfylld.
13. Var noggrann under tvättning för att tillförsäkra att varje mikrobrunn tvättas ordentligt såsom anges i instruktionerna för manuell tvättning. Otillräcklig tvätt medför ökat bakgrundsbrus och kan ge upphov till falskt positiva resultat. Kvarvarande tvättbuffert i brunnarna kan ge en minskad signal eller dålig reproducerbarhet.
14. Tillåt minst 60 minuter efter en kallstart för att värmeblocket för mikrotiterplatta I ska stabiliseras vid $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Om denna uppvärmningsperiod inte utförs kan detta resultera i att mikrotiterplattan för hybridisering smälter. Se användarhandboken Värmeblock för mikrotiterplatta I för detaljerad information.

REAGENSTILLVERKNING OCH FÖRVARING

1. När satsen mottagits, förvara den vid 2-8 °C. Tvättbuffertkoncentratet, reagens för denaturering och indikatorfärg kan förvaras vid 2-30 °C enligt önskemål.
2. Använd inte efter utgångsdatumet som anges vid symbolen  på ytterkartongens etikett eller efter utgångsdatumet för de beredda reagenserna (se nedan).
3. Alla medlevererade reagenser är färdiga för användning utom reagens för denaturering, CT-probblandning och tvättbuffert.

Se användarhandboken till Rapid Capture-systemet för beredning av CT-probblandning, tvättbuffert, detektionsreagens 1 och 2 då dessa instruktioner är specifika för tillämpning av högkapacitetstestning med det systemet.

Metod för reagenstillverkning

<p>Reagens för denaturering</p>	<p>TILLVERKA FÖRST: Tillsätt 5 droppar indikatorfärg till flaskan med reagens för denaturering och blanda ordentligt. Reagenset för denaturering ska ha en genomgående, mörkviolett färg.</p> <p>När det väl är berett så är reagens för denaturering stabilt i tre månader om det förvaras vid 2-8 °C. Märk det med det nya utgångsdatumet. Om färgen bleknar, tillsätt ytterligare 3 droppar indikatorfärg och blanda väl före användning.</p> <p>Varning: Reagens för denaturering är frätande. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd. Var försiktig vid hanteringen.</p>																		
<p>CT-probblandning (beredd från CT-prob och spädningsvätska för probreagenser)</p>	<p>TILLVERKA UNDER INKUBATIONSDENATURERINGEN AV PROV:</p> <p>VIKTIGT: IBLAND FASTNAR PROBEN I FLASKANS LOCK.</p> <p>Observera: Var utomordentligt försiktig i detta steg för att förhindra RNAs kontaminering av prob och probblandning. Använd pipettspetsar med aerosolfilter för att pipettera prob. Spädningsvätska för prob är viskös. Var noggrann för att tillförsäkra ordentlig blandning när CT-probblandning bereds. En synlig virvel måste bildas i vätskan under blandningsmomentet. Otillräcklig blandning kan ge en minskad signal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugera flaskan med CT-prob, kortvarigt, för att få vätskan till flaskans botten. Knacka försiktigt på röret för att blanda. • Bestäm den nödvändiga mängden probblandning (25 µl/test). Det rekommenderas att lite extra probblandning görs för att kompensera för den volym som kan förloras i pipettspetsar eller till flaskans sida. Se föreslagna volymer i listan nedan. Det minsta rekommenderade antalet brunnar för varje analys är 24. Om färre än 24 brunnar per analys önskas så kan det totala antalet tester per sats minska pga. begränsade volymer av prob och spädningsvätska för prob. • Överför den behövliga volymen av spädningsvätska för prob till en ny engångsbehållare. Beroende av antalet tester så rekommenderas antingen ett 5 ml eller 15 ml rundbottnat polypropylenrör. För att bereda probblandning gör en spädnings 1:25 av CT-prob i spädningsvätska för prob. <table border="1" data-bbox="548 1522 1258 1743"> <thead> <tr> <th><u>Antal tester/strips</u></th> <th><u>Volym av spädningsvätska för prob*</u></th> <th><u>Probvolym*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4, ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Per brunn</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p><small>*Dessa värden inkluderar den rekommenderade extravolymer.</small></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipettera prob till spädningsvätska för prob genom att placera pipettspetsen mot rörets innervägg precis ovanför menisken och töm innehållet. Doppa inte ned spetsen i spädningsvätskan för prob. • Blanda under minst fem sekunder med maximal hastighet för att blanda ordentligt. En synlig virvel måste bildas. Märk som CT-probblandning och förvara i slutna behållare tills den ska 	<u>Antal tester/strips</u>	<u>Volym av spädningsvätska för prob*</u>	<u>Probvolym*</u>	96/12	4, 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 brunn	0,045 ml	1,8 µl
<u>Antal tester/strips</u>	<u>Volym av spädningsvätska för prob*</u>	<u>Probvolym*</u>																	
96/12	4, 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 brunn	0,045 ml	1,8 µl																	

användas. **Oanvänd probblandning ska kasseras.**

Tvättbuffert	<p>TILLVERKA UNDER INFÅNGNINGSMOMENTET:</p> <p>Tvättbuffert för automatiserad tvättapparat för plattor kan beredas såsom beskrivs nedan och förvaras i en täckt behållare eller bered en liter åt gången och placera den i behållarna på den automatiserade tvättapparaten för plattor. Se tabellen nedan för blandningsvolymer.</p> <p>För anvisningar om skötsel och underhåll, se användarhandboken till automatisk tvättapparat för plattor.</p> <p>Varning: Tvättbuffertkoncentrat är giftigt att förtära. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd. För att minska exponering, tillsätt vatten till tvättbuffertkoncentrat vid beredningen.</p> <table><thead><tr><th>Volym av tvättbuffertkoncentrat</th><th>Mängd av destillerat eller avjoniserat vatten</th><th>Slutlig volym av tvättbuffert</th></tr></thead><tbody><tr><td>33,3 ml</td><td>966,7 ml</td><td>1 L</td></tr><tr><td>66,6 ml</td><td>1 933,4 ml</td><td>2 L</td></tr><tr><td>100,0 ml</td><td>2 900,0 ml</td><td>3 L</td></tr></tbody></table> <p>Observera: Det är mycket viktigt att automatiserad tvättapparat för plattor alltid är påslagen hela tiden. Det medger att underhållssköljning kan utföras när den inte använts på åtta timmar.</p> <p>Före varje analys se till att avfallsbehållaren för den automatiserade tvättapparaten för plattor är tom och att dess sköljbehållare är fylld med destillerat eller avjoniserat vatten.</p> <p>För anvisningar om skötsel och underhåll, se användarhandboken till automatisk tvättapparat för plattor.</p> <p>Metod för manuell tvättning av plattor:</p> <ul style="list-style-type: none">• Blanda tvättbuffertkoncentratet väl.• Späd ut 100 ml tvättbuffertkoncentrat med 2,9 liter destillerat eller avjoniserat vatten och blanda väl (slutlig volym ska vara 3 liter).• Försegla behållaren för att förebygga kontaminering eller avdunstning. <p>När tvättbufferten är beredd är den stabil i tre månader vid 2-30 °C. Märk den med det nya utgångsdatumet. Om tvättbufferten har kylts ned låt den komma i jämvikt vid 20-25 °C innan den används.</p> <p>Det rekommenderas att tvättapparaten och rörledningar rengörs med 0,5 % natriumhypokloritlösning och sköljs ordentligt med destillerat eller avjoniserat vatten var tredje månad för att förebygga möjlig kontaminering från alkaliskt fosfat som finns i bakterier och mögel.</p>	Volym av tvättbuffertkoncentrat	Mängd av destillerat eller avjoniserat vatten	Slutlig volym av tvättbuffert	33,3 ml	966,7 ml	1 L	66,6 ml	1 933,4 ml	2 L	100,0 ml	2 900,0 ml	3 L
Volym av tvättbuffertkoncentrat	Mängd av destillerat eller avjoniserat vatten	Slutlig volym av tvättbuffert											
33,3 ml	966,7 ml	1 L											
66,6 ml	1 933,4 ml	2 L											
100,0 ml	2 900,0 ml	3 L											

Volymer för användningsfärdiga reagenser

Detektionsreagens 1 och detektionsreagens 2	<p>OMEDELBART FÖRE ANVÄNDNING:</p> <p>Blanda reagenserna ordentligt och mät därefter upp noggrant tillämplig volym av detektionsreagens 1 eller detektionsreagens 2 till en ren reagensbehållare enligt riktlinjerna nedan. För att undvika kontamination får dessa reagenser INTE hållas tillbaka till originalflaskorna. Kassera oanvänt materiel efter användning. Om en 8-kanalspipett inte används kan en lämplig repeterande pipett användas i stället. I detta fall ska alikvoter av reagenset tillsättas ett polypropylenrör av tillräcklig storlek för att hålla den behövliga volymen som anges nedan.</p> <table><thead><tr><th>Antal tester/strips</th><th>Volym av detektionsreagens 1 eller 2 flaskans innehåll</th></tr></thead><tbody><tr><td>96/12</td><td>7,0 ml</td></tr><tr><td>72/9</td><td>5,0 ml</td></tr><tr><td>48/6</td><td>3,0 ml</td></tr><tr><td>24/3</td><td>0,125 ml</td></tr><tr><td>1 test</td><td></td></tr></tbody></table>	Antal tester/strips	Volym av detektionsreagens 1 eller 2 flaskans innehåll	96/12	7,0 ml	72/9	5,0 ml	48/6	3,0 ml	24/3	0,125 ml	1 test	
Antal tester/strips	Volym av detektionsreagens 1 eller 2 flaskans innehåll												
96/12	7,0 ml												
72/9	5,0 ml												
48/6	3,0 ml												
24/3	0,125 ml												
1 test													

PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Cervixprover som tagits och transporterats med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning (som består av en cervixborste och *digene* transportmedium för prover) och *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (swab och *digene* transportmedium för prover) eller prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp och lagts i Hologic PreservCyt-lösning är de enda prover som rekommenderas för användning med *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Prover som tagits med annan provtagningsutrustning eller transporterats i andra transportmedia har inte godkänts för användning med detta test. Satsens prestandaegenskaper har fastställts enbart för de angivna provtagningssatserna. Cervixprover måste tas före applikation av ättiksyra eller jod om kolposkopiundersökning utförs. Se bruksanvisningen för *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning för ytterligare provtagnings- och hanteringsförfaranden.

CERVIXPROVER I *digene* STM

STM-prover kan förvaras i rumstemperatur i upp till två veckor och transporteras utan kylning till testlaboratoriet. Prover ska transporteras i en isolerad behållare med antingen över-natten-leverans eller tvådagars leverans. På testlaboratoriet ska proverna förvaras vid 2-8 °C om testet ska utföras inom en vecka. Om testet ska utföras senare än efter en vecka förvaras proverna vid -20 °C i högst tre månader. Ett konserveringsmedel har tillsatts *digene* transportmedium för prover för att hämma bakteriell tillväxt och för att bevara DNA:s integritet. Det är **inte avsett** för att bevara organismers eller cellers livsduglighet. Prover som tagits med *digene* transportmedium för prover kan inte användas för odling för andra testmetoder.

Hållbarheten för STM-proverna: två veckor i rumstemperatur plus ytterligare en vecka vid 2-8 °C baseras på egna tester av 90 simulerade kliniska prover. I dessa 90 prover ingick 40 som innehöll låga koncentrationer av CT-organismer (på eller nära analysens detektionsgräns [Limit of Detection, LOD]), 35 som var måttligt positiva prover (ungefär 2-5 gånger LOD) och fem som var höggradigt positiva prover vilka överskred tio gånger LOD. De övriga tio proverna var negativa för CT, men fem innehöll en hög nivå av GC-organismer. Analysens uppskattade prestanda baseras på prover förvarade vid 2-8 °C eller frysta och testade inom 1-2 veckor efter provtagning.

Observera:

1. En icke-denaturerad alikvot av samtliga 90 prover utsattes för extrem temperatur för att simulera transportförhållanden (förvaring vid -20 °C i tre dagar sedan vid 50 °C i fem dagar och ytterligare två veckor vid rumstemperatur). Förlust av signal (RLU/CO) kunde iaktas efter åtta dagar under dessa förhållanden, men den kvalitativa tolkningen av resultaten påverkades inte. Efter ytterligare två veckors inkubering vid rumstemperatur observerades kvalitativa skillnader för prover som innehöll en låg nivå av organismer.
2. För att förhindra att locket lossnar på provrör som transporteras eller förvaras fryst:
 - Täck locket med Parafilm® före transport av provrör som varit frysta. Prover kan transporteras frysta eller vid 20-25 °C.
 - När prover tas ur frysen för test ska locket omedelbart bytas ut mot skruvlock för provtagningsrör.
3. *Digene* HC2 DNA-provtagningsanordning ska **inte** användas för provtagning på gravida kvinnor. Endast *digene* Female Swab Specimen Collection Kit får användas för provtagning på gravida kvinnor.

CERVIXPROVER I HOLOGIC PRESERVCYT-LÖSNING

Prover som tas med en provtagningsanordning av borsttyp och läggs i PreservCyt-lösning för att göra objektglas för Hologic ThinPrep Pap-test kan användas för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Prover ska tas enligt rutinerna och objektglas för ThinPrep Pap-testet bereds enligt anvisningar från Hologic.

Prover i PreservCyt-lösning kan behållas i upp till en månad vid rumstemperatur (20-25 °C) sedan de tagits innan de behandlas för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Prover i PreservCyt-lösning kan inte frysas. För behandling av prover, se *Prepareringsförfarande för prover i PreservCyt-lösning*.

TESTFÖRFARANDE

Prover kan innehålla smittsamma ämnen och ska hanteras i enlighet därmed. *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan utföras manuellt (enligt instruktionerna i denna bruksanvisning) eller med användning av RCS-instrumentet för högkapacitetstestning.

HÖGKAPACITETSTESTNING MED ANVÄNDNING AV RAPID CAPTURE-SYSTEMET (RCS)

Rapid Capture System (RCS) är ett vanligt system för automatisk pipettering och spädning som kan användas med *digene* HC2 CT-ID DNA Test för högkapacitetstestning. Detta system har en kapacitet på upp till 352 prover/åtta timmar, vilket inkluderar en 3,5 timmars period när användaren inte behöver ingripa och upp till 704 provresultat kan erhållas inom 13 timmar. Denaturering av proverna som bereds för test görs, oberoende av RCS och innan dessa placeras i RCS-systemet, i det ursprungliga provtagningsröret på samma sätt som beskrivs nedan för den manuella metoden för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Dessutom utförs kemiluminescent signaldetektion och resultatrapportering med ett offline QIAGEN-godkänt luminometersystem som är gemensamt för både den manuella och RCS-metoden. Varje moment i *digene* HC2 CT-ID DNA Test utförs i exakt samma sekvens som för den manuella testmetoden. RCS-tillämpningen medger att testförloppet kan spridas ut för upp till fyra mikrotiterplattor där varje platta innehåller prover och de nödvändiga kalibratorerna och kvalitetskontrollerna för analysen.

Vid användning av Rapid Capture-systemet, se *användarhandboken till Rapid Capture-systemet* som medföljer instrumentet för nödvändig information om processer och beskrivningar i tillägg till denna bruksanvisning.

MANUELL METOD

Inställning

1. Tillåt minst 60 minuter från en kallstart för att värmeblocket för mikrotiterplatta I ska komma i jämvikt vid $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Se *användarhandboken för värmeblock för mikrotiterplatta I* för detaljerad information.
2. Bekräfta att vattenbadet är 65 °C varmt och att vattennivån är tillräckligt hög för att täcka hela volymen i provrören.
3. Tag ut proverna och **alla** behövliga reagenser från kylskåpet **innan analysen påbörjas**. Tillåt dessa att uppnå $20\text{--}25\text{ °C}$ under 15 till 30 minuter.
4. Gör en layout för plattan med hjälp av *digene* analysprogrammet med *digene* analysprotokoll för CT. Se tillämplig programanvändarhandbok för detaljerad information.
5. Negativ kalibrator, positiv kalibrator och kvalitetskontroller måste beredas **färska** för varje analys. Blanda kalibratorer och kvalitetskontroller ordentligt. Om (MST) Vortexer 2 används så ska $500\text{ }\mu\text{l}$ av varje överföras till lämpligt märkta, tomma provtagningsrör. Alternativt tag bort $200\text{ }\mu\text{l}$ av varje och överför till lämpligt märkta 2 ml mikrocentrifugrör av polypropylen.
6. **Den negativa kalibratören och den positiva kalibratören måste testas FÖRST**, trefaldigt för varje sats av prover som testas. Kvalitetskontrollerna och proverna ska testas en gång. Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska testas med en konfiguration med kolumner på åtta mikrotiterplattbrunnar på så sätt att den negativa kalibratörens (NK) replikat placeras i A1, B1, C1; den positiva kalibratören (PK) i D1, E1, F1; KK CT i G1; KK GC i H1; och proverna börjar med A2. Se exempel på layout nedan. Se *användarhandböckerna till lämplig QIAGEN-godkänd luminometer och lämpligt analysprogram* för hur man korrekt ställer in programvaran för kalibrator/kvalitetskontroll/prov.

EXEMPEL PÅ LAYOUT FÖR ETT TEST MED 24 MIKROTITERPLATTBRUNNAR:

Rad	Kolumn		
	1	2	3
A	NK	Prov 1	Prov 9
B	NK	Prov 2	Prov 10
C	NK	Prov 3	Prov 11
D	PK	Prov 4	Prov 12
E	PK	Prov 5	Prov 13
F	PK	Prov 6	Prov 14
G	KK CT	Prov 7	Prov 15
H	KK GC	Prov 8	Prov 16

DENATURERING

Observera:

- **Försiktighet:** Reagens för denaturering är frätande. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd. Var försiktig och använd puderfria handskar vid hanteringen.
- **Viktigt:** Vissa cervixprover kan innehålla blod eller annat biologiskt materiel, vilket kan maskera färgförändringarna när reagens för denaturering tillsätts. Prover som uppvisar en mörk färg före tillsättningen av reagens för denaturering kanske inte ger en riktig färgförändring vid dessa moment. I dessa fall även om den avsedda färgförändringen inte inträffar så påverkar detta inte analysens resultat. Riktig blandning kan verifieras genom att observera färgförändring på kalibrаторer och kvalitetskontroller.
- Se till att vattennivån i vattenbadet under denatureringsmomentet är tillräcklig för att sänka ned rörets hela provvolym.
- Prover kan beredas upp till och med denatureringssteget och förvaras vid 2-8 °C över natten eller i upp till tre månader vid -20 °C. Maximalt så kan tre frys/upptiningscykler göras med max. två timmar i rumstemperatur för varje upptiningscykel. Blanda väl före användning.
- Kalibrаторer och kvalitetskontroller kan beredas upp till och med denatureringssteget och förvaras vid 2-8 °C över natten, **men de får inte frysas**. Om kalibrаторer och kvalitetskontroller har blivit frysta så måste de kasseras.
- Efter denaturering och inkubering anses prover inte längre vara smittsamma.²¹ Laboratoriepersonal ska emellertid fortfarande följa nationella/lokala försiktighetsåtgärder.

PREPARERINGSFÖRFARANDE FÖR KALIBRATORER, KVALITETSKONTROLLER OCH STM-PROVER

Observera:

- Ta inte ut provtagningsanordningen före denatureringen.
- För att undvika falskt positiva resultat är det mycket viktigt att allt kalibrатор-, kvalitetskontroll- och STM-provmateriel kommer i kontakt med reagenset för denaturering. Blandning efter tillsats av reagenset för denaturering är ett kritiskt moment: **Se till att MST Vortexer 2 är inställd på 100 (maxhastighet) och att en synlig vätskevirvel bildas under blandningen så att vätskan sköljer över hela inre ytan av röret. Vid manuell blandning måste man se till att varje kalibrатор, kvalitetskontroll och prov blandas individuellt genom att blandas i minst fem sekunder vid full hastighet så att vätskevirveln sköljer över hela inre ytan av röret. Vänd sedan röret en gång.**

1. Ta av och kassera locken till kalibrator-, kvalitetskontroll- och STM-provrören.

Observera: Lock som tas av provrören ska betraktas som potentiellt smittsamma. Kassera dem enligt nationella/lokala bestämmelser.

2. Pipettera reagens för denaturering med indikatorfärg till varje kalibrator, kvalitetskontroll eller STM-prov med en repeterande eller justerbar pipett. Lakttag försiktighet så att rörets sidor inte vidrörs annars kan korskontamination av prover ske. Den volym av reagens för denaturering som behövs är ekvivalent med halva provvolymen. Exakt volym för varje typ av kalibrator, kvalitetskontroll och prov anges i tabellen nedan.

- **Späd ut resterande reagens för denaturering i en flaska innan det kasseras enligt nationella/lokala laborieföreskrifter.**

Kalibrator, kvalitetskontroll eller prov	Volymbehov av reagens för denaturering
Negativ kalibrator, positiv kalibrator och kvalitetskontroll, 200 µl	100 µl
Negativ kalibrator, positiv kalibrator och kvalitetskontroll 500 µl	250 µl
Cervixprov, 1 ml	500 µl

3. Blanda proverna enligt en av de två metoderna nedan.

MST Vortexer 2-metod (för flera provrör)

Observera: QIAGEN-prover som blandas med MST Vortexer 2 **måste** hybridiseras med hybridiseringsmetoden mikroplatta och värmeblock för mikrotiterplattor I. Se användarhandboken till MST Vortexer 2 för mer information om det behövs.

- a) Täck kalibrator-, kvalitetskontroll- och STM-provrören med DuraSeal[®] plastfilm för förslutning av rör genom att dra filmen över rören i provrörsstället.
- b) Placera provrörsställets lock över de filmtäckta rören och fäst det med de två sidspännena. Skär av filmen med avskärningsanordningen.
- c) Placera stället på MST Vortexer 2 och fäst stället med spännet. Verifiera att hastigheten är inställd på 100 (maxhastighet) och ställ MST Vortexer strömbrytare i läge "PÅ". Blanda rören i tio sekunder.

Manuell/individuell metod för blandning

- a) Sätt på rena skruvlock för provtagningsrör på kalibrator-, kvalitetskontroll- och STM-provrören.
- b) Blanda varje rör ordentligt genom att blanda individuellt med hög hastighet under fem sekunder.
- c) Vänd varje provrör upp och ned en gång för att skölja rörets insida, lock och kant.
- d) Sätt tillbaka rören i stället.

4. Oavsett vilken blandningsmetod som används **så måste en vätskevirvel ses inne i varje rör under blandningen så att vätskan sköljer rörets hela inneryta**. Kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och proverna ska bli violetta.

5. Inkubera rören i provrörsstället i ett vattenbad med 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter (denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och prover kan testas omedelbart. Kalibratorer och kvalitetskontroller kan förvaras vid 2-8 °C över natt såsom beskrivs under **Observera** ovan). För förvaring av prover, se *Valfri stoppunkt*. Bered CT-probblandning under denna inkubation. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*.

PREPARERINGSFÖRFARANDE FÖR PROVER I PRESERVCYT-LÖSNING

Observera:

- Se bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion Kit för fullständiga uppgifter.
- Behandling av en alikvot på 4 ml PreservCyt-lösning ger tillräcklig volym för två tester vid manuell testning. Minsta volym som kan behandlas är 4 ml. Se avsnittet *Ekvivalens mellan prover i digene STM och PreservCyt-lösning* för uppgifter om minsta restvolym.
- Bered högst 36 prover i PreservCyt-lösning i samma sats, annars kan cellpelleten fastna när supernatanten dekanteras. Detta är viktigt för att cellpelletens integritet ska behållas under dekanteringen. Om fler flaskor med PreservCyt-lösning ska beredas bör det inte göras förrän den första satsen är klar.

Reagenstillverkning

Använd antingen reagenset för denaturering (DNR) som följer med *digene* HC2 CT-ID DNA Test (se *Reagenstillverkning och förvaring*) eller det DNR som följer med *digene* HC2 Sample Conversion Kit. För att bereda det DNR som följer med *digene* HC2 Sample Conversion Kit, tillsätt tre droppar indikatorfärg i flaskan med DNR och blanda väl. Lösningen ska anta en jämn mörkt violett färg. För att avgöra hur stor volym som behövs, använd tabell 1.

Tabell 1. Volymbehov: Reagenstillverkning

Antal tester	Volym PreservCyt-lösning	Volym konversionsbuffert
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. Märk ett *digene* HC2 Sample Conversion-rör, ett 10 ml koniskt Sarstedt-rör eller ett 15 ml koniskt rör av märke VWR eller Corning med lämpligt identifikationsnummer för provet.
2. Hantera ett prov åt gången:
 - a. Skaka PreservCyt-flaskan kraftigt tills cellerna verkar vara jämnt spridda.
 - b. Cellerna sjunker mycket snabbt, så pipettera omedelbart in lämplig volym PreservCyt-prov i det märkta röret. Pipettera in PreservCyt-lösningen längst ned i det koniska röret så att så litet cellmateriel som möjligt fastnar på insidan av röret.
3. Tillsätt lämplig volym Sample Conversion-buffert till varje rör (se tabell 1).
4. Sätt på locket igen och blanda innehållet i varje rör noga med en vortexblandare med kopffäste.

Observera: MST Vortexer 2-förfarandet har inte validerats för blandning av prover i PreservCyt-lösning före centrifugering och därför får det inte användas i detta moment.
5. Centrifugera rören i en svängrotor vid $2\,900 \pm 150 \times g$ i 15 ± 2 minuter.
6. Bered under tiden STM/DNR-blandningen (*digene* Specimen Transport Medium/reagens för denaturering) i kvoten 2:1, enligt tabell 2.

Observera: STM/DNR-blandningen måste beredas på nytt varje dag som testet utförs.

- a. För att avgöra hur mycket STM/DNR-blandning som behövs totalt, använd startvolymen för proverna i PreservCyt-lösning och multiplicera volymen STM och DNR som behövs per rör med antalet prover som ska behandlas (se tabell 2).

Tabell 2. Volymbehov: STM/DNR.

Antal tester	Volym PreservCyt-lösning	STM-volym per rör för slutlig blandning*	DNR-volym per rör för slutlig blandning*	STM/DNR-blandning som tillsätts till röret
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

* Volymerna som anges i tabellen ska inte tillsättas direkt till provröret.

b. Blanda lösningen noga genom att använda vortexblandare.

7. Ta ut rören ur centrifugen ett i taget och ställ i ett provrörsställ eller konversionsställ. En rosa/orange cellpellet ska finnas i botten på varje rör.

Observera: Prover som inte har en synlig cellpellet efter centrifugering kan inte användas för testning och ska kasseras.

8. Hantera varje rör för sig:

a. Ta av locket och ställ åt sidan på en lågluddande pappershandduk.

b. Dekanterera supernatanten försiktigt.

c. Håll röret fortfarande i vinkel och torka (ca sex gånger) på absorberande lågluddande pappershandduk tills det inte längre droppar någon vätska från röret. Använd ett rent område av handduken varje gång. Låt **inte** cellpelleten glida ned utefter röret under avtorkningen.

Observera:

- Torka inte på samma område av den absorberande lågluddande pappershandduken mer än en gång.
- Det är viktigt att avlägsna så mycket PreservCyt-lösning som möjligt vid avtorkningen. Det är emellertid normalt att det blir någon PreservCyt-lösning kvar efter avtorkning.

d. Ställ röret i ett ställ eller i konversionsstället.

Blandning och denaturering

Manuellt blandningsförfarande

1. Tillsätt lämplig volym STM/DNR till varje cellpellet (se tabell 2). Sätt tillbaka locket på varje rör och suspendera pelleten på nytt genom att blanda varje rör individuellt i minst 30 sekunder vid högsta hastighet. Om det är svårt att få en pellet att suspenderas igen kan röret blandas i ytterligare 10-30 sekunder eller tills pelleten flyter loss från botten av röret. Om pelleten fortfarande inte är upplöst efter ytterligare blandning (högst två minuter sammanlagt), anteckna provets identifikation och gå till nästa moment.
2. Ställ rören i ett ställ.
3. Ställ stället i ett vattenbad med 65 ± 2 °C i 15 ± 2 minuter. Se till att det finns så mycket vatten i badet att det står över all vätska i rören.
4. Ta ut stället med prover ur vattenbadet och blanda proven individuellt i 15-30 sekunder.

Observera: Se till att alla cellpelletar är helt suspenderade igen. Prover som fortfarande har en synlig cellpellet kan inte användas för testning och ska kasseras.

5. Ställ tillbaka stället i vattenbadet med 65 ± 2 °C och fortsätt denatureringen i ytterligare 30 ± 3 minuter.
6. Gå till momentet *Hybridisering* nedan eller läs under *Valfri stoppunkt* hur denaturerade prov ska förvaras och behandlas.

MST Vortexer 2-förfarande

Observera:

- MST Vortexer 2-förfarandet har validerats för behandling av prover i PreservCyt-lösning efter centrifugering och dekantering av supernatanten.
 - Det är bara MST Vortexer 2 som är avsedd för behandling av prover i PreservCyt-lösning.
 - Konversionsstället med lock är speciellt utformat för att rymma *digene* HC2 Sample Conversion-rören (15 ml koniska rör av märke VWR eller Corning). Endast en rörtyp åt gången ska användas på konversionsstället. Andra märken har inte validerats för användning.
 - Det är viktigt att man följer de angivna blandningstiderna för konversionsstället med lock.
 - Konversionsstället med lock kan inte användas för att blanda kalibratorer eller kvalitetskontroller för *digene* HC2 DNA-testsatsen. Höjden på STM-rören gör att de inte kan blandas ordentligt i konversionsstället med lock.
1. Efter att ha torkat av alla de märkta koniska 15 ml rören, ställ dem var och en på sin plats i konversionsstället.
 2. Tillsätt lämplig volym STM/DNR-blandning till varje cellpellet (tabell 2).
 3. Täck de koniska 15 ml rören med DuraSeal förseglingsfilm genom att dra filmen över rören, där de står i stället.
 4. Lägg ställocket över de filmöverdragna rören och lås fast locket med de båda sidspännena. Skär av filmen med avskärningsanordningen sedan locket har satts fast säkert.
 5. Lyft upp spaken med rött handtag till horisontellt läge.
 6. Ställ konversionsstället på MST Vortexer 2 så att det största diagonala hörnet på konversionsstället kommer i det högra främre hörnet. Ställ stället med lock på MST Vortexer 2-plattformen så att det sitter ordentligt mellan stöden. Sätt fast stället genom att sänka spaken med rött handtag till vertikalt läge. Då är stället fastlåst.
 7. Kontrollera att hastigheten är inställd på 100 (maxhastighet och att vippkontakten för momentanstyrning står i läget AV.
 8. Ställ strömbrytaren för Vortexer i läget PÅ. **Blanda rören i 30 sekunder.**
 9. Ställ strömbrytaren för Vortexer i läget AV.
 10. Ta ut konversionsstället med lock ur MST Vortexer 2 genom att lyfta upp spaken med rött handtag.
 11. Ställ stället i ett vattenbad med 65 ± 2 °C i 15 ± 2 minuter. Se till att vattnet når upp över hela vätskan i alla rören.
 12. Efter 15 minuters inkubering, ta ut stället med prov från vattenbadet.
 13. För att undvika stänk, torka av det mesta av vattnet på stället innan det ställs på MST Vortexer 2.
 14. Sätt fast konversionsstället med lock på MST Vortexer 2 som beskrivs i *steg 6*.
 15. Kontrollera att hastigheten är inställd på 100 och ställ in strömbrytaren för Vortexer i läget PÅ. **Blanda rören i en minut.**
 16. Ställ strömbrytaren för Vortexer i läget AV.
Observera: I MST Vortexer 2-förfarandet standardiseras blandningshastigheten, tiderna och behandlingen. Det betyder att cellpelleten inte behöver kontrolleras visuellt, vilket måste göras om man använder sig av manuellt blandningsförfarande.
 17. Ställ tillbaka stället i vattenbadet med 65 ± 2 °C och fortsätt denatureringen i 30 ± 3 minuter.
 18. Ta ut stället ur vattenbadet, torka av stället och sätt fast det på Vortexer.
 19. Ställ strömbrytaren för Vortexer i läget PÅ. **Blanda i tio sekunder på högsta inställning.**
 20. Ställ strömbrytaren för Vortexer i läget AV. Ta ut stället.
 21. Ta omedelbart bort ställocket och DuraSeal-filmerna från proverna.
 22. Fortsätt till momentet *Hybridisering* nedan eller läs under *Valfri stoppunkt* hur denaturerade prov ska förvaras och behandlas.

VALFRI STOPPUNKT

Efter denaturering kan STM-prover och konverterade PreservCyt-prover förvaras vid 2-8 °C över natt eller vid -20 °C i upp till tre månader. För kylförvaring över natt kan proverna lämnas kvar i konversionsstället med DuraSeal-filmen och ställocket på. Före förvaring vid -20 °C måste ställocket och DuraSeal-filmen tas bort och rören förses med lock. I vilket fall måste proverna komma i jämvikt vid 20-25 °C och noga blandas innan man går till hybridiseringsmomentet.

Observera: Förvara eller transportera inte denaturerade prover på kolsyresnö.

Högst tre frysnings/upptiningscykler får utföras med högst två timmar vid rumstemperatur i varje upptiningscykel.

HYBRIDISERING

Observera:

- CT-probblandning är viskös. Var försiktig för att tillförsäkra ordentlig blandning och att den nödvändiga mängden är helt dispenserad till varje brunn på hybridiseringsmikrotiterplattan. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*.
- Om denaturerade prover har förvarats vid -20 °C, låt dessa tina vid 20-25 °C och blanda proverna ordentligt innan hybridisering påbörjas.
- Förvärm värmeblocket för mikrotiterplatta I till 65 ± 2 °C under minst 60 minuter innan det används. Vid behov se *användarhandboken för värmeblock för mikrotiterplatta I* för ytterligare instruktioner.

1. Tag en hybridiseringsmikrotiterplatta och märk den.
2. Tag ur kalibratorer, kvalitetskontroller och prover från vattenbadet efter inkubationen. Om MST Vortexer 2 används så ska hela stället med STM-prov blandas under minst fem sekunder med maximal hastighetsinställning. För prover i PreservCyt-lösning, blanda hela konversionsstället i minst tio sekunder på högsta hastighet. Alternativt så kan varje rör blandas individuellt under minst fem sekunder.
3. Pipettera 75 µl av vardera kalibrator, kvalitetskontroll eller prov till **botten** av en tom brunn på en hybridiseringsmikrotiterplatta enligt den layout som gjordes under *Inställning*. Undvik att vidröra brunnarnas sidor och begränsa bildningen av luftbubblor. Använd en ren, extra lång pipettspets för varje överföring för att undvika korskontamination av kalibratorer, kvalitetskontroller eller prover. För STM-prover ska man inte ta bort provtagningsanordningen från provets transportrör. Denaturerade prover kan tillslutas med skruvlock för provtagningsrör och kan förvaras med provtagningsanordningen kvar i rören. För denaturerade PreservCyt-prover kan de ursprungliga locken användas.

Observera:

- **Falskt positiva resultat kan inträffa om alikvoter av prover inte överförs noggrant. Vid överföringen av prov, låt inte pipettspetsen vidröra rörets insida när alikvoten på 75 µl tas bort.**
4. När det sista provet har överförts **ska plattan täckas över med ett plattlock och hybridiseringsmikrotiterplattan inkuberas i tio minuter vid 20-25 °C.**
 5. Alikvotera den beredda och ordentligt blandade probblandningen till reagensbehållare för engångsbruk. Pipettera försiktigt 25 µl av probblandningen till varje brunn som innehåller kalibratorer, kvalitetskontroller och prover med hjälp av en 8-kanalspipett och med nya spetsar för varje rad. Dispensera probblandningen till varje hybridiseringsbrunn och undvik returstänk. Undvik att vidröra brunnarnas sidor.

Observera: För ovanstående moment, använd en 8-kanalspipett som har 25-200 µl spetsar och kan leverera 25-75 µl. Vid ett litet antal brunnar, använd en enkanalspipett (med 25-200 µl spetsar) i stället för en 8-kanalspipett.

6. Täck hybridiseringsmikrotiterplattan med ett plattlock. Skaka hybridiseringsmikrotiterplattan på roterande skak I som ställts in på 1100 ± 100 varv/min under 3 ± 2 minuter. *Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska bli gula efter skakning*. Brunnar som förblir violetta har kanske inte fått korrekt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare 25 µl probblandning till de prover som fortfarande är violetta och skaka igen. Testa om proverna om brunnarna förblir violetta efter denna procedur.

- Inkubera i ett förvämt värmeblock för mikrotiterplatta I som är stabiliserat till 65 ± 2 °C under 60 ± 5 minuter.

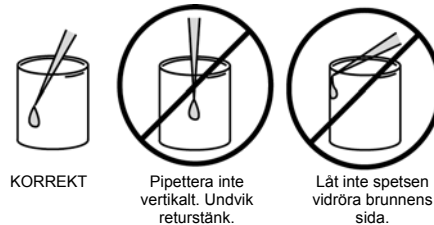
Observera:

- Var försiktig när hybridiseringsmikrotiterplattan placeras i värmeblock för mikrotiterplatta I så att stänk inte uppkommer.
- Efter skakning ska prover i PreservCyt-lösning gå från gult till rosa.

HYBRIDINFÅNGNING

- Tag bort alla utom de behövliga antalet brunnar från den fångande mikrotiterplattans ram. Lägg tillbaka de oanvända mikrotiterplattbrunnarna i originalpåsen och förseglade. Med en märkpena ska man numrera varje kolumn 1, 2, 3... och märk mikrotiterplattan med lämplig kod. Proverna tillsätts brunnarna enligt exemplet på layout som gavs under *Inställning*.
- Tag försiktigt bort hybridiseringsmikrotiterplattan som innehåller kalibratorer, kvalitetskontroller och prover från värmeblock för mikrotiterplatta I. Tag omedelbart bort plattlocket och lägg det på en ren yta.
- Överför hela innehållet (cirka 100 µl) i kalibratorer, kvalitetskontroller och prover från hybridiseringsmikrotiterplattans brunnar till botten av motsvarande brunnar på den fångande mikrotiterplattan med en 8-kanalspipett. Använd nya pipettspetsar till 8-kanalspipetten för varje kolumn som överförs och låt varje pipettspets rinna av ordentligt för att tillförsäkra en fullständig provöverföring. Om så föredras så kan pipetten stödjas genom att låta **mitten** av pipettspetsarna vila på toppkanten av brunnarna på den fångande mikrotiterplattan (se diagram 1).

DIAGRAM 1: KORREKT PIPETTERING



- Täck mikrotiterplattan med plattlocket och skaka med roterande skak I med 1100 ± 100 v/min vid $20-25$ °C under 60 ± 5 minuter.
- Under denna inkubation: Bered tvättbufferten och kontrollera, om tillämpligt, skölj- och avfallsbehållarna på den automatiserade tvättapparaten för plattor. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*.
- När infångningssteget är fullständigt, tag bort den fångande mikrotiterplattan från den roterande skaken I och tag försiktigt bort plattlocket. Tag bort vätskan från brunnarna genom att hålla den i slasken. Vänd plattan helt upp och ned över slasken och skaka hårt med en nedåtgående rörelse och var försiktig så att detta inte orsakar returstänk genom att dekantera den för nära slaskens botten. **Vänd inte på plattan igen.** Torka av genom att knacka bestämt 2-3 gånger mot en ren Kimtowels® torkduk eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar. Se till att all vätska är borttagen från brunnarna och att plattans översida är torr.

HYBRIDDETEKTION

Observera:

- Gör tillsättningar tvärsöver plattan i riktning från vänster till höger med en 8-kanalspipett.
- Det rekommenderas att den omvända pipetteringstekniken används för att förbättra reagenstillställningens enhetlighet. Med denna teknik så överfylls pipettspetsarna initialt genom att använda pipettens andra stoppläge på kontrollen för aspirera/dispensera (kolv). Se procedur nedan. Torka av spetsen på reagensbehållaren för engångsbruk eller på en ren, lågluddande pappershandduk för att ta bort överflödigt reagens före dispensering till platta.
- Om så föredras så kan pipetten stödjas genom att låta mitten av pipettspetsarna vila på mikroplattbrunnarnas toppkant. Iakttag försiktighet så att mikroplattbrunnarnas sidor inte vidrörs annars kan korskontamination av prover ske. Referera till diagram 1 ovan.

1. Alikvotera lämplig volym detektionsreagens 1 till en reagensbehållare (se avsnittet *Reagenstillverkning och förvaring* för instruktioner). Pipettera, med den omvända pipetteringstekniken som beskrivs nedan, försiktigt 75 µl av detektionsreagens 1 till varje brunn på fångande mikrotiterplatta med en 8-kanalspipett.

Omvänd pipetteringsteknik:

- a) Sätt på spetsar på en 8-kanalspipett och se till att alla spetsar sitter ordentligt fast.
- b) Tryck pipettens kolv förbi det första stoppläget till det andra stoppläget.
- c) Sänk ned spetsarna i lösningen med detektionsreagens 1.
- d) Frigör kolven sakta och låt lösningen fylla spetsarna.
- e) Dispensera lösningen till mikrotiterplattbrunnarna (75 µl) genom att trycka kolven till det första stoppläget. Frigör inte kolven förrän pipettspetsarna åter har sänkts ned i lösningen med detektionsreagens 1.
- f) Fyll spetsarna igen och repetera tills alla brunnar är fyllda. Fyll mikrotiterplattbrunnar från vänster till höger. *Verifiera att alla brunnar har fyllts korrekt genom att observera den rosa färgens intensitet. Alla brunnar ska ha liknande intensitet.*

2. Täck plattorna med plattlock och inkubera vid 20-25 °C under 30-45 minuter.

TVÄTTNING

Tvätta den fångande mikrotiterplattan med en av de två metoderna nedan.

Metod med automatiserad tvättapparat för plattor:

Observera: Automatiserad tvättapparat för plattor ska alltid vara påslagen. Se till att sköljbehållaren är fylld och avfallsbehållaren är tom. Den automatiserade tvättapparaten för plattor kommer rutinmässigt att skölja systemet för rengöring. Se användarhandboken till *den automatiserade tvättapparaten för plattor* för ytterligare instruktioner om så behövs.

FÖRE VARJE ANVÄNDNING:

- Verifiera att tvättbehållaren är fylld med tvättbuffertlösning till åtminstone 1 litersmärket. Om så inte är fallet, bered tvättbuffertlösningen. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*.
 - Verifiera att sköljbehållaren är fylld med avjoniserat eller destillerat vatten.
 - Verifiera att avfallsbehållaren är tom och att locket är ordentligt påskruvat.
 - Automatiserad tvättapparat för plattor kommer att automatiskt fylla sig själv före varje tvätt och skölja efter varje tvätt.
1. Tag bort plattlocket och lägg plattan på plattformen på automatiserad tvättapparat för plattor.
 2. Verifiera att strömförsörjningen är påslagen och att displayen visar "Digene Wash Ready" eller "P1".

Observera: Om endast en del av infångningsbrunnar används så måste tomma mikrotiterplattbrunnar placeras på den fångande mikrotiterplattan för att komplettera kolumnen innan tvättning sker. För beställningsinformation, se avsnittet *Tillbehör*.

3. Ange antalet strips som ska tvättas genom att trycka på knappen "Rows" och därefter på "+" eller "-" för att justera. Tryck på knappen "Rows" för att återgå till "Digene Wash Ready" eller "P1".
4. Tryck på "Start/Stop" för att börja.
5. Automatiserad tvättapparat för plattor utför sex påfyllnings- och aspirationscykler vilket tar ungefär tio minuter. Det är en kort paus under programmets gång så var säker på att plattorna inte tas ut för tidigt. När den automatiserade tvättapparaten för plattor har avslutat tvätten så visas "Digene Wash Ready" eller "P1".
6. Tag bort mikrotiterplattan från tvättapparaten när programmet avslutats. Plattan ska vara vit och inga rester av rosa vätska ska finnas kvar i mikrotiterplattbrunnarna.

Metod med manuell tvättning

Observera: Otillräcklig tvättning kan medföra ökat bakgrundsbrus och falskt positiva resultat (pga. rester av alkaliskt fosfatas). För att tillförsäkra effektiv tvättning med tvättapparaten så ska den placeras åtminstone 61 cm och inte mer än 91 cm ovanför tvättområdet på så sätt att plattan kommer att vara mellan 61 cm och 91 cm under tvättapparaten när den tvättas. Huvudkranen till tvättapparaten ska vara helt "öppen" när den används och helt "avstängd" när den inte används. Vid användning måste tvättapparaten innehålla minst 1,0 liter tvättbuffert för att ha tillräckligt tryck.

1. Tag bort detektionsreagens 1 från brunnarna genom att placera rena Kimtowels torkdukar eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar på plattans översida och försiktigt vända den upp och ned. Innan den vänds upp och ned, se till att pappret har kontakt med plattans hela överyta. Låt plattan rinna av i 1-2 minuter. Torka av ordentligt på rena Kimtowels torkdukar eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar. Tag försiktigt bort och kassera använda lågluddande pappershanddukar för att undvika kontamination med alkaliskt fosfatas i senare moment.
2. Handtvätta plattan sex gånger med hjälp av tvättapparaten. Varje brunn ska tvättas så att den svämmar över för att ta bort detektionsreagens 1 från brunnarnas översida. Tvättningen börjar med brunn A1 och fortsätter på ett slingrande sätt till höger och nedåt. Efter alla brunnar fyllts så ska vätskan hållas ned i slasken med en kraftig nedåtriktad rörelse. Den andra tvätten börjar med brunn H12 och rör sig med en slingrande rörelse till vänster och uppåt. Sekvensen för dessa två tvättar repeteras ytterligare två gånger så att varje brunn får totalt sex tvättar.
3. Efter tvättningen torkas plattan av genom att vända den upp och ned på en ren Kimtowels torkduk eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar och knacka den bestämt 3-4 gånger. Byt ut de lågluddande pappershanddukarna och torka av igen. Låt plattan ligga upp och ned och låt den rinna av i fem minuter. Torka av plattan en gång till.
4. Plattan ska vara vit och inga rester av rosa vätska ska finnas kvar i mikrotiterplattbrunnarna.

SIGNALFÖRSTÄRKNING

Observera:

- Använd ett nytt par puderfria handskar för hantering av detektionsreagens 2.
 - Alikvotera **endast** den mängd reagens som behövs för att utföra analysen till reagensbehållaren för att undvika kontaminering av detektionsreagens 2. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*. **HÅLL INTE tillbaka detektionsreagens 2 till originalflaskan. Kassera oanvänt materiel efter användning.**
 - Tillsättning av detektionsreagens 2 ska göras utan avbrott. Inkuberingstiden för alla brunnar måste vara så lika som möjligt.
 - Iakttag försiktighet så att mikrotiterplattbrunnarnas sidor inte vidrörs eller att reagens stänker tillbaka upp på spetsarna då detta kan orsaka korskontamination av proverna (Se diagram 1).
1. Pipettera, med den omvända pipetteringstekniken som tidigare beskrivits, försiktigt 75 µl av detektionsreagens 2 till varje brunn på fångande mikrotiterplatta med en 8-kanalspipett. *Alla mikrobrunnarna ska bli gula.* Verifiera att alla brunnar har fyllts korrekt genom att observera färgens intensitet. Alla brunnar ska ha liknande intensitet.

2. Täck mikrotiterplattorna med plattlock eller ren Parafilm (eller liknande) och inkubera vid 20-25 °C under 15 minuter. Undvik direkt solljus.
3. Läs av mikrotiterplattan med den QIAGEN-godkända luminometern efter 15 minuters inkubation (och inte senare än 30 minuter efter inkubation).
4. *digene* analysprogram tillåter inmatning av relevant analysinformation direkt i programvaran.
5. Om en full mikrotiterplatta inte användes så ska använda mikrotiterplattbrunnar tas bort från mikrotiterplattans hållare, skölj hållaren noggrant med avjoniserat vatten, torka och spara för nästa analys.

KRITERIER FÖR VERIFIKATION AV ANALYSKALIBRERING

Verifikation av analyskalibrering utförs för att tillförsäkra att reagenserna och medföljande kalibrator- och kvalitetskontrollmateriel fungerar riktigt, vilket medger en noggrann bestämning av analysens cutoffvärde. Kriterierna för verifikation beräknas automatiskt och verifieras som giltig eller ogiltig av *digene* analysprogram. *digene* HC2 CT-ID DNA Test behöver kalibreras för varje analys. Det är därför nödvändigt att verifiera varje analys med de följande kriterierna. Denna verifikationsprocedur är inte avsedd som en ersättning för test av den interna kvalitetskontrollen.

1. Negativ kalibrator

Negativ kalibrator måste testas trefaldigt vid varje analys. Den negativa kalibratorns RLU-medelvärde måste vara ≥ 10 och ≤ 150 för kunna fortsätta. Resultaten för den negativa kalibratorns replikat ska visa en variationskoefficient (%CV) på ≤ 25 %. Om %CV är > 25 % så kommer programvaran att kassera det RLU-värde som avviker mest från medelvärdet som avvikande och de två kvarvarande replikaten används för att beräkna medelvärdet och %CV. Det omräknade %CV ska vara ≤ 25 %. I annat fall är **verifikationen av analyskalibreringen ogiltig och analysen måste repeteras för alla patientprover. Följaktligen ska resultaten från patientproverna inte rapporteras.**

2. Positiv kalibrator

Den positiva kalibratorn måste testas trefaldigt vid varje analys. %CV för de positiva kalibratorreplikaten ska vara ≤ 20 %. Om %CV är > 20 % så kommer programvaran att kassera det RLU-värde som avviker mest från medelvärdet som avvikande och de två kvarvarande replikaten används för att beräkna medelvärdet och %CV. Det omräknade %CV ska vara ≤ 20 %. I annat fall är **kalibreringsverifikationen ogiltig och analysen måste repeteras för alla patientprover. Följaktligen ska resultaten från patientproverna inte rapporteras.**

3. Kvot: Medelvärde PK/Medelvärde NK

Medelvärdet för de positiva kalibratorreplikaten (medelvärde PK) och medelvärdet för de negativa kalibratorreplikaten (medelvärde NK) används för att beräkna kvoten. Programvaran beräknar kvoten: medelvärde PK/medelvärde NK. Denna kvot måste uppfylla de följande kriterierna för att verifiera analysens kalibrering **innan provresultaten kan tolkas**. Om kvoten är $\geq 2,0$ och ≤ 20 fortsätter programmet till nästa steg. Om kvoten är $< 2,0$ eller > 20 så är **kalibreringsverifikationen ogiltig och måste repeteras för alla patientproverna. Följaktligen ska resultaten från patientproverna inte rapporteras.**

Observera: För att bestämma kalibratorernas reproducerbarhet i *digene* HC2 CT-ID DNA Test så sammanställdes de data som erhöles med *digene* luminometer för mikrotiterplattor (DML 2000) vid interna studier omfattande 63 analyser utförda med Rapid Capture-system och 43 analyser utförda med den manuella metoden (tabell 3). Resultatet visade att den positiva kalibratorns medelvärde för %CV av 106 analyser var lika med eller lägre än 5,8 % och den negativa kalibratorns var lika med eller lägre än 11,2 %. Fastän ett maximalt medelvärde på 88 RLU för den negativa kalibratorn i genomsnitt erhöles vid manuella analyser så har RCS-tillämpningen visats ge RLU-värden för NK som flyttat sig något uppåt i förhållande till den manuella metoden. Denna förskjutning har inte påvisats ha någon effekt på de erhållna testresultaten med endera metod. Den negativa kalibratorns tröskelvärde för RLU har definierats som 250 RLU baserat på statistiska beräkningar för ± 3 SD (standardavvikelser) av RLU-medelvärde för den negativa kalibratorn för *digene*

HC2 CT/GC DNA Test-system som erhöles från omfattande tester som gjordes under utvecklingen av RCS-tillämpningen. Den övre gränsen för ± 3 SD (standardavvikelse) utökades ytterligare 20 % för att tillförsäkra att tröskelvärdet för NK RLU kan uppnås med rutinmässig klinisk praxis.

Den negativa kalibrators medelvärde för RLU ska rutinmässigt vara ≤ 150 och CV ≤ 25 %. Varje laboratorium ska övervaka kvalitetskontroll och kalibreringsresultat enligt National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) dokument C24-2A. Vid användning av RCS-tillämpningen så kan medelvärdet för RLU tillfälligtvis överskrida 150, möjligen med en motsvarande minskning av PK/NK, som enligt tabell 3 har visats ge ett medelvärde på 7,11 efter kalibrering. I detta fall är resultaten godtagbara under förutsättning att NK RLU förblir ≤ 250 och att PK/NK-kvoten är $\geq 2,0$ och ≤ 20 . Om NK RLU överskrider 250 eller PK/NK ligger under 2,0 eller över 20 så är analysen ogiltig.

Tabell 3. Statistisk sammanfattning av värdena för negativ kalibrator och positiv kalibrator för analyser med RCS-tillämpning och manuell metod.

Metod	Antal plattor	Beräknat medel-PK/NK				Testsatskvalitetskontroller Medelvärde RLU/CO	
		Medel-värde	Median	Min	Max	KK CT	KK GC
RCS	63	7,11	6,87	5,24	10,23	3,8	0,24
Manuell	43	6,75	5,70	4,60	11,25	3,5	0,16

Metod	Kalibrator	Beräknat medel-RLU				Medelvärde för beräknat
		Medel-värde	Median	Min	Max	%CV
RCS	Negativ	52	50	29	84	9,2
	Positiv	362	369	179	505	5,3
Manuell	Negativ	41	37	28	88	11,2
	Positiv	275	274	135	428	5,8

CUTOFF-BERÄKNING

När en analys har bekräftats enligt kriterierna angivna ovan så används de giltiga positiva kalibratorreplikaten för att etablera cutoff RLU-värdena för bestämning av positiva prover. Cutoff RLU-värden beräknas enligt följande:

Cutoff RLU-värde = medelvärde för positiv kalibrator RLU

Exempel på cutoff-beräkning

	NK RLU-värden	PK RLU-värden
	97	312
	101	335
	91	307
Medelvärde	96	318
%CV	4,9	4,7
Medelvärde	EJ	3,31
PK/medelvärde NK	TILLÄMPLIGT	

Således är cutoff RLU-värdet (medelvärde PK) = 318

RLU-värdena för alla prover omvandlas till en kvot till det tillämpliga cutoff (CO) RLU-värdet av *digene* analysprogrammet. Till exempel ska alla analyser uttryckas som prov-RLU/CO.

Observera: RLU/CO-värden och positiva/negativa resultat för alla testade prover rapporteras i dataanalysrapporten i *digene* analysprogrammet.

KVALITETSKONTROLL

Prover för kvalitetskontroll medföljer *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Se användarhandboken till tillämpligt *digene* analysprogram för instruktioner för hur man matar in kvalitetskontrollernas satsnummer och utgångsdatum. Dessa kvalitetskontroller måste inkluderas i varje analys och RLU/CO för varje kvalitetskontroll måste ligga inom följande acceptabla intervall för att analysen ska anses giltig. **Om kvalitetskontrollerna inte ligger inom dessa intervall är analysen ogiltig och måste repeteras.** Således ska inga patientresultat rapporteras för någon analys som är ogiltig.

	KK CT	KK GC
Minimum RLU/CO	1,00	0
Maximum RLU/CO	20,00	0,9999
Maximum %CV	20,00	20,00

1. Kvalitetskontrollerna som medföljer satsen är klonade CT och GC mål-DNA som består av samma plasmidstruktur för varje enskild organism (en för CT och en för GC) likväl som för den positiva kalibratoren som medföljer *digene* HC2 CT-ID DNA Test.
2. Detta kvalitetskontrollmateriel är inte detsamma som CT i provmatrisen och fungerar inte som en lämplig kvalitetskontroll för behandlingen av *digene* transportmedium för prover eller PreservCyt-lösning.
3. Den positiva kalibratoren används för att normalisera provresultat genom att fastställa cutoff RLU. Kvalitetskontrollerna som medföljer denna testsats måste användas vid intern kvalitetskontroll. Ytterligare kvalitetskontroller kan testas enligt riktlinjer eller krav från olika lokala, regionala och/eller nationella föreskrifter eller anmälda organ.
4. För att testa effektiviteten av provens lysning och denaturering ska laboratorerna regelbundet tillsätta > 100 000 *C. trachomatis*-elementärkroppar (serovarer E eller J rekommenderas och är tillgängliga från ATCC såsom ATCC VR348B respektive VR886) till ett nytt STM-rör. Inkubera provet åtminstone en timme vid rumstemperatur innan det testas på samma sätt som för vanliga kliniska prover. Ett RLU/CO $\geq 2,50$ ska uppnås om provet har behandlats korrekt. Alternativt så kan kommersiellt tillgängliga provtestpaneler som innehåller CT-organismer också användas för detta ändamål.
5. Acceptabla intervall för de negativa och positiva kalibratorerna har endast fastställts för QIAGEN-godkända luminometrar. De negativa och positiva kvalitetskontrollerna reagerar endast för avsevärd reagensavvikelse och garanterar inte noggrannheten av analysens cutoff.

TOLKNING AV PROVRESULTAT

Tolkning med kriterier för *digene* HC2 CT-ID DNA Test:

1. Prover med ett kvotvärde för RLU/CO $\geq 2,50$ anses "Positiva för *Chlamydia trachomatis* DNA." Någon slutsats angående *Chlamydia trachomatis*-organismens viabilitet och/eller infektivitet kan inte dras då mål-DNA kan närvara i frånvaro av viabla organismer.
2. Prover med ett kvotvärde för RLU/CO < 1,00 innehåller inte *Chlamydia trachomatis* DNA eller innehåller DNA-nivåer under analysens detektionsgräns. Dessa ska tolkas såsom "Ingen *Chlamydia trachomatis* DNA detekterad". Ett negativt resultat utesluter inte infektion med *Chlamydia trachomatis* då resultatet beror på tillfredsställande provtagning och tillräckligt med DNA för detektion.
3. Prover med ett kvotvärde RLU/CO på $\geq 1,00$ och < 2,50 anses tvetydiga. Resultaten kan anses som presumtvt positiva för *Chlamydia trachomatis* DNA. Emellertid rekommenderas att testet repeteras med nya prover från patienten eller att ytterligare tester görs med en alternativ testmetod pga. det reducerade förväntade värdet av ett positivt testresultat med dessa RLU/CO-värden.*

4. Det rekommenderas att positiva resultat bekräftas med annan metod om det är sannolikt att infektion med *C. trachomatis* är osäker eller ifrågasatt. Analytiska studier med detta test har visat presumtiv korsreaktivitet med vissa andra DNA-sekvenser som kan orsaka falskt positiva resultat. Även om frekvensen för pBR322 och andra DNA-sekvenser i genitala prover inte har blivit helt utvärderad så har ingen korsreaktivitet observerats i en population på 1818 patienter i vilka 106 CT-positiva prover testades för närvaro av pBR322. Detta är en representativ population och tyder på att dessa resultat kanske inte reflekterar frekvensen i alla testade populationer av förekomsten av pBR322. För ytterligare information, se Analytisk specificitet.
- * Under den kliniska utvärdering av *digene* HC2 CT-ID DNA Test så bekräftades 7/14 resultat i detta tvetydiga område som positiva vid odling, DFA eller Polymerase Chain Reaction (PCR) testning. De resterande 7 var uppenbarligen falskt positiva. Emellertid så var dessa 7 falskt positiva prover bland de totalt 11 prover som inte var negativa med *digene* HC2 CT-ID DNA Test utav de 1643 prover som bekräftades odlingsnegativa för CT (99,3 %), korrekt identifierade i förhållande till odling/DFA med hänsyn tagen till PCR-testresultat. I en följande utvärdering så hade dessa 7 initialt positiva prover ett initialt RLU/CO på 1,00-2,50 varav 3 av dessa prover var negativa med alla andra utförda tester (alla 3 av dessa prover var negativa när *digene* HC2 CT-ID DNA Test repeterades två gånger). De kvarvarande 4 proverna var alla odling/DFA/PCR-positiva och bäge omtesterna av replikaten med *digene* HC2 CT-ID DNA Test gav ett RLU/CO \geq 1,00.

BEGRÄNSNINGAR I TESTFÖRFARANDET

Se användarhandboken för Rapid Capture-systemet för ytterligare begränsningar i testförfarandet som speciellt gäller för användningen av systemet vid högkapacitetstestning.

- Enbart för *in vitro*-diagnostisk användning.
- Testförfarandet för *digene* HC2 CT-ID DNA Test, kvalitetskontroll och tolkningen av provresultat måste noggrant följas för att erhålla pålitliga testresultat.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan endast användas för cervixprover tagna med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning och placerade i STM, cervixprover som tagits med *digene* Female Swab Specimen Collection Kit och placerats i STM eller prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp och placerats i Cytoc PreservCyt-lösning.
- Resultatet av denna analys ska endast tolkas tillsammans med tillgänglig information från klinisk utvärdering av patienten och från andra procedurer.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test ger kvalitativa resultat. Det numeriska värdet (kvoten) över det cutoff-värde som fastställts för patientprovet har inte visats korrelera till mängden CT DNA närvarande i patientprovet.
- Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten av infektion med *Chlamydia trachomatis* då detektion är beroende av antalet närvarande organismer i provet och påverkas av provtagningsmetod, patientfaktorer, infektionsstadium och/eller infekterande *Chlamydia trachomatis*-stam.
- Positiva prover, som för alla icke-odlingsmetoder, kan inte tolkas som ett tecken på närvaro av viabla *Chlamydia trachomatis*-organismer.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test är inte avsett för att bedöma behandlingsframgång.
- *digene* HC2 CT-ID DNA Test har endast validerats för användning med automatiserad tvättapparat för plattor med de inställningar som specificeras i analysens instruktioner. Denna valideringsstudie utfördes internt och de data som stöder dess användning är arkiverade hos QIAGEN. Andra platttvättapparater eller andra inställningar för platttvättapparater är inte godtagbara för användning med *digene* HC2 CT-ID DNA Test.
- För att minimera variabiliteten av resultaten som erhålls med *digene* HC2 CT-ID DNA Test så är det nödvändigt att laboratoriepersonalen som utför analysen uppnår en acceptabel nivå av teknisk färdighet. Varje laboratorium måste också övervaka teknisk färdighet med analysen. För att uppnå detta så föreslår vi att kommersiellt tillgängliga provtestpaneler som innehåller CT-organismer eller CT DNA testas regelbundet i enlighet med laboratoriets procedurer för kvalitetssäkring.

FÖRVÄNTADE RESULTAT

PREVALENS

Prevalensen av prover positiva för *Chlamydia trachomatis* varierar beroende på populationens egenskaper såsom ålder, kön och riskfaktorer. Prevalensen av *Chlamydia trachomatis* som observerades i den kliniska studiepopulationen där *digene* HC2 CT-ID DNA Test användes var 3,3 % till 14,6 %. Prevalensen beräknades med antagandet att de 14 proverna med tvetydiga resultat i studien var positiva för CT DNA (tabell 4). Sju av dessa 14 prover bekräftades som positiva genom CT-odling/DFA eller CT PCR.

Tabell 4. Prevalensen av positiva resultat per testcenter med *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Testcenter	Antal positiva/antal testade	% prevalens
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
Totalt	181/1818	10,0

POSITIVA OCH NEGATIVA FÖRVÄNTADE VÄRDEN

De hypotetiska positiva och negativa förväntade värdena (PPV och NPV) för olika prevalensvärden för *digene* HC2 CT-ID DNA Test beräknades med hjälp av den totala känsligheten och specificiteten i förhållande till CT-odling/DFA fastställda individuellt för prover tagna med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning (cervixborste) och för prover tagna med *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (provtagningspinne). Tabell 5 visar det hypotetiska PPV och NPV för borstprover (total känslighet 97,71 % och specificitet 98,15 %) och tabell 6 visar det hypotetiska PPV och NPV för prover tagna med provtagningspinne (total känslighet 87,50 % och specificitet 98,36 %).

Tabell 5. Hypotetiska förväntade värden för *digene* HC2 CT-ID DNA Test vid olika prevalensvärden (borste).

Prevalensvärde (%)	Känslighet (%)	Specificitet (%)	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

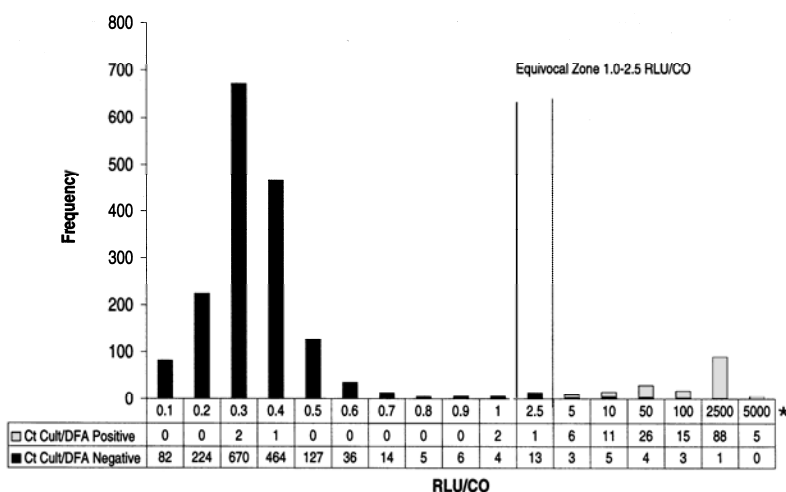
Tabell 6. Hypotetiska förväntade värden för *digene* HC2 CT-ID DNA Test vid olika prevalensvärden (provtagningspinne).

Prevalensvärde (%)	Känslighet (%)	Specificitet (%)	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

FREKVENSFÖRDELNING: *digene* HC2 CT-ID DNA TEST RLU/CO-RESULTAT

Distributionen av RLU/CO-kvoter för *digene* HC2 CT-ID DNA Test som erhöles under den kliniska multicenterstudien visas nedan (figur 1). Dessa data inkluderar alla prover som utfördes med *digene* HC2 CT-ID DNA Test och resultat från CT-odling/DFA fanns tillgängliga (antal = 1818). Tolkningen av resultaten gjordes enligt följande kriterier. Prover med RLU/CO-värden < 1,00 ansågs negativa. Prover med RLU/CO-värden $\geq 2,50$ ansågs positiva. Prover med ett RLU/cutoff-värde på $\geq 1,00$ och < 2,50 ansågs tvetydiga.

Figur 1. Frekvensfördelning av *digene* HC2 CT-ID DNA Test RLU/CO-resultat.



En klar separation av RLU/CO-kvoterna uppvisas mellan positiva och negativa resultat för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Nittionio procent (99 %, 1620/1637) av *digene* HC2 CT-ID DNA Test-negativa resultat har RLU/CO-värden mellan 0 och 0,7. Totalt så hamnade < 1 % (14/1818) av provresultaten i analysens tvetydiga zon av vilka 7,1 % (1/14) var positiva vid CT-odling/DFA och ytterligare 6 (46 %) som var positiva med CT PCR. Åttiofem procent (85 %, 142/167) av *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positiva resultat har RLU/CO-värden mellan 10 och 5000.

PRESTANDAEGENSKAPER

RESULTAT FRÅN KLINISKA STUDIER PER PROV

Prestandaegenskaper för *digene* HC2 CT-ID DNA Test fastställdes genom att jämföra analysresultaten med resultaten från klamydiaodling och DFA. Ettusenåttahundra och arton (1818) prover togs och testades senare från patienter vid fem olika centra, inklusive STD-, familjeplanerings- och obstetrik/gynekologikliniker. DFA-testning utfördes på sedimentet efter centrifugering av CT-odlingstransportmedium från de prover som var *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positiva/odlingsnegativa. PCR-test utfördes på prover som var positiva för *digene* HC2 CT-ID DNA Test men negativa för odling/DFA. Resultaten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test påverkades INTE av PCR-testresultat och därför hade inte PCR någon inverkan på beräkningarna av prestandaegenskaper för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Två olika luminometer-modeller (Dynex Models MLX och ML2200) användes för att generera data som användes för att bestämma prestandaegenskaper för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Resultaten för de prover i kliniska prövningen som tagits med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning (cervixborste) visas i tabell 7 och prover tagna med *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (provtagningspinne) i tabell 8.

Tabell 7. *digene* HC2 CT-ID DNA Test kontra CT-odling/DFA-resultat för borstprover.

Prestandaegenskaper beräknade med RLU/CO cutoff-värden på 1,0 visas nedan. Värden angivna inom parentes visar utförande för RLU/CO-cutoff på 2,5. Konfidensintervallet 95 % inkluderar bägge intervallen när de beräknade datavärdena skiljde sig för varje RLU/CO cutoff-värde som utvärderades.

Center	CT-ID odling: DFA: Antal	POS POS EJ TILLÄMPLIGT	POS NEG POS	POS NEG NEG ¹	NEG POS EJ TILLÄMPLIGT	NEG NEG EJ TILLÄMPLIGT ³	Känslighet	Specificitet	NPV	PPV	CT-ID+ odling- DFA- PCR ²⁺	
Symtomatisk												
95 % CI	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 ⁴ (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	N/A
	All	939	93	13 (12)	16 (10)	3 (4)	814 (820)	97,25 (96,33)	98,07 (98,80)	99,63 (99,51)	86,89 (91,30)	12/15⁴ (9/10)
95 % CI								90,9-99,4	96,9-98,9	98,8-99,9	79,6-95,8	
Asymtomatisk												
95 % CI	1	101	8	0	2 (0)	0	91 (93)	100,00	97,85 (100,00)	100,00	80,00 (100,00)	0/2 (N/A)
95 % CI	2	12	1	0	1	0	10	63,1-100 100,00	92,5-100 90,91	96,0-100 100,00	44,4-100 50,00	1/1
95 % CI	3	81	3	0	0	0	78	2,50-100 100,00	58,7-99,8 100,00	69,2-100 100,00	1,3-98,7 100,00	N/A
95 % CI	4	236	9	1	4 (2)	0	222 (224)	29,2-100 100,00	95,4-100 98,23 (99,12)	95,4-100 100,00	29,2-100 71,43 (83,33)	3/4 ⁴ (1/1 ⁴)
95 % CI	5	1	0	0	0	0	1	69,2-100 N/A	95,5-99,9 100,00	98,4-100 100,00	41,9-97,9 N/A	N/A
95 % CI	All	431	21	1	7 (3)	0	402 (406)	100,00 84,6-100	98,29 (99,27) 96,5-99,9	100 99,1-100	75,86 (88,00) 56,5-97,5	4/7⁴ (2/3⁴)
95 % CI												
Total patientpopulation												
95 % CI	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 ⁴ (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 ⁴ (1/1 ⁴)
95 % CI	5	1	0	0	0	0	1	N/A	100,00	100,00	N/A	N/A
	All	1370	114	14 (13)	23 (13)	3 (4)	1216 (1226)	97,71 (96,85)	98,15 (98,95)	99,75 (99,67)	84,77 (90,71)	16/21⁵ (11/12⁴)
95 % CI								92,4-99,5	97,2-99,4	99,2-100	78,0-95,0	

1 I två fall så utfördes inte DFA trots behov.

2 Endast för information; PCR hade ingen inverkan på provresultat.

3 Ett *digene* HC2 CT-ID DNA Test-negativ/odlingsnegativt prov testades i onödan med DFA och gav ett positivt resultat. Detta resultat inkluderades i beräkningarna för prestandan såsom falskt negativt för *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

4 På ett prov utfördes inte PCR.

5 I ett fall så utfördes inte DFA trots behov.

N/A = Ej tillämpligt

Tabell 8. digene HC2 CT-ID DNA Test kontra CT-odling/DFA-resultat för prover tagna med provtagningspinne.
 Prestandaegenskaper beräknade med RLU/CO cutoff-värden på 1,0 visas nedan. Värden angivna inom parentes visar utförande för RLU/CO-cutoff på 2,5.
 Konfidensintervallet 95 % inkluderar bägge intervallen när de beräknade datavärdena skiljde sig för varje RLU/CO cutoff-värde som utvärderades.

Center	CT-ID Odling: DFA: Antal	POS POS EJ TILLÄMPLIGT	POS NEG POS	POS NEG NEG ¹	NEG POS EJ TILLÄMPLIGT	NEG NEG Ej Tillämpl. ³	Känslighet	Specificitet	NPV	PPV	CT-ID+ odling- DFA- PCR ² +	
Symtomatisk												
95 % CI	1	358	31 (28)	0	5 (3)	7 (10)	315 (317)	81,58 (73,68) 65,67-92,26	98,44 (99,06) 96,39-99,49	97,83 (96,94) 95,57-99,12	86,11 (90,32) 70,50-95,33	N/A
95 % CI	2	94	10	1	3 (1)	1	79 (81)	91,67 61,5-99,8	96,34 (98,78) 89,6-100	98,75 (98,78) 93,2-100	78,57 (91,67) 49,2-100	2/3 (1/1)
95 % CI	3	5	1	0	0	0	4	100,00 0,84-90,6	100,00 47,8-100	100,00 29,0-96,3	100,00 2,5-100	N/A
95 % CI	5	152	7	0	2 (1)	0	143 (144)	100,00 59,0-100	98,62 (99,31) 95,1-100	100,00 97,5-100	77,78 (87,50) 40,0-99,7	0/0 ⁴ (0/0 ³)
95 % CI	All	609	49 (46)	1	10 (5)	8 (11)	541 (546)	86,21 (81,03) 74,62-93,85	98,19 (99,09) 96,69-99,13	98,54 (98,03) 97,15-99,37	83,33 (90,38) 71,48-91,71	2/3⁴ (1/1³)
Asymtomatisk												
95 % CI	1	61	4 (3)	0	2 (1)	0 (1)	55 (56)	100 (75,00) 39,76-100	96,49 (98,25) 87,89-99,57	100 (98,25) 93,51-100	66,67 (75,00) 22,28-95,67	N/A
95 % CI	2	10	0	0	0	0	10	N/A 69,2-100	100,00 50,00	100,00 69,2-100	N/A 0,00	N/A
95 % CI	3	2	0	0	1	0	1	N/A 50,00	100,00 1,3-98,7	100,00 2,5-100	0,00 0-97,5	N/A ³
95 % CI	4	1	0	0	0	0	1	N/A 2,5-100	100,00 100,00	100,00 2,5-100	N/A 100,00	N/A
95 % CI	5	176	2	0	0	0	174	100,00 15,8-100	100,00 97,9-100	100,00 97,9-100	100,00 15,8-100	N/A
95 % CI	All	250	6 (5)	0	3(2)	0 (1)	241 (242)	100 (83,33) 54,07-100	98,77 (99,18) 96,45-99,75	100 (99,59) 98,48-100	66,67 (71,43) 29,93-92,51	N/A³
Total patientpopulation												
95 % CI	1	419	35 (31)	0	7 (4)	7 (11)	370 (373)	83,33 (73,81) 68,64-93,03	98,14 (98,94) 96,21-99,25	98,14 (97,14) 96,21-99,25	83,33 (88,57) 68,64-93,03	N/A
95 % CI	2	104	10	1	3 (1)	1	89 (91)	91,67 61,5-99,8	96,74 (98,78) 90,8-100	98,89 (91,67) 94,0-100	78,57 (98,78) 49,2-99,8	2/3 (1/1)
95 % CI	3	7	1	0	1	0	5	100,00 2,5-100	83,33 35,9-99,6	100,00 47,8-100	50,00 1,3-98,7	N/A ³
95 % CI	4	1	0	0	0	0	1	N/A 2,5-100	100,00 99,37 (99,69)	100,00 100,00	N/A 81,82 (90,00)	N/A ⁴
95 % CI	5	328	9	0	2 (1)	0	317 (318)	100,00 66,4-100	97,8-100 97,8-100	98,8-100 98,8-100	48,2-99,8	N/A ⁴
95 % CI	All	859	55 (51)	1	13 (7)	8 (12)	782 (788)	87,50 (81,25) 76,85-94,45	98,36 (99,12) 97,22-99,13	98,99 (98,50) 98,01-99,56	81,16 (88,14) 69,94-89,57	2/3⁵ (1/1⁴)

1 Prover som skulle testas med DFA men som inte utfördes placerades i denna kategori.

2 Endast för information; PCR hade ingen inverkan på provresultat.

3 I ett fall gjordes ingen PCR.

4 3 I två fall gjordes ingen PCR.

5 I tre fall gjordes ingen PCR.

N/A = Ej tillämpligt

Prestandaegenskaper för *digene* HC2 CT-ID DNA Test beräknades både för ett cutoff på 1,0 och på 2,5 utan hänsyn till hur många presumtiva, positiva prover som hamnade i den tvetydiga zonen som beskrivs i avsnittet "Tolkning av resultat" i denna bruksanvisning. Således kan prestandan för *digene* HC2 CT-ID DNA Test variera i ert laboratorium beroende på fördelningen av de värden som hamnar inom den tvetydiga zonen och de erhållna upprepade resultaten om återtest av presumtivt positiva (tvetydig zon) prover utförs såsom rekommenderas i avsnittet "Tolkning av resultat" i denna bruksanvisning (kriterium 3). Som en gemensam utgångspunkt så var mindre än 0,8 % av de prover (14/1818) som testades under den kliniska multicenterstudien som användes för att fastställa prestandan för *digene* HC2 CT-ID DNA Test i denna grupp. För ytterligare information, se Frekvensfördelning för RLU/CO-resultaten i avsnittet Förväntade resultat i denna bruksanvisning.

Tillräckligt med data finns inte tillgängliga för att bestämma ekvivalent känslighet och positiva förväntade värden för *digene* HC2 CT-ID DNA Test vid användning av *digene* Female Swab Specimen Collection Kit jämfört med prover tagna med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning. Eftersom användningen av *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning är kontraindicerad för provtagning av cervixprover på gravida kvinnor så kan testets förmåga att detektera närvaron av CT DNA vara reducerad i denna population av patienter eller närhelst en *digene* Female Swab Specimen Collection Kit används för provtagning.

Den kliniska känsligheten och specificiteten hos *digene* HC2 CT-ID DNA Test för att detektera de patienter med kliniskt aktiv infektion som kan överföras eller orsaka klamydia-relaterade följsjukdomar har inte fastställts i jämförelse med alla kommersiellt tillgängliga Nucleic Acid Amplification (NAA) metoder (nukleinsyraförstärkningsmetoder) för detektion av CT DNA. I kliniska studier uppvisade, när en modifierad kommersiell NAA-analys användes för testning, ett positivt gensvar för 12 *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positiva prover och sex presumtivt positiva prover som erhöles från 24 CT-odling/DFA-negativa patienter. Emellertid så testades inte de 1637 CT-ID DNA Test-negativa proverna i den studien och fem av de *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positiva/CT-odling/DFA-negativa prover med denna modifierade metod. Uppskattad känslighet baseras på antalet positiva resultat med *digene* HC2 CT-ID DNA Test hos patienter som var odlings- eller DFA-positiva för *Chlamydia trachomatis*. Således kan känsligheten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test endast härledas i förhållande till odlings-/DFA-positiva som kan ha en känslighet på 60-85 %. Dessutom så har åtskilliga studier utförts av olika oberoende forskargrupper som visar prestandan för *digene* HC2 CT-ID DNA Test jämfört med kommersiellt tillgängliga och NAA-tester för forskningsändamål.²²

REPRODUCERBARHET

Som en del av multicenterstudien gjordes en reproducerbarhetsstudie för att fastställa reproducerbarheten för analys-analys, dag-dag, center-center och totalt för *digene* HC2 CT-ID DNA Test med en panel bestående av *Chlamydia trachomatis* mål-DNA och *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positiva och *digene* HC2 CT-ID DNA Test-negativa kliniska prover.

En tiodelars panel av maskerade, denaturerade kliniska och icke-kliniska prover bestående av åtta positiva prover och två negativa prover testades i replikat på sex, två gånger per dag under en tredagarsperiod vid vart och ett av de fyra centra (tre externa och QIAGEN). Varje center genererade 36 datapunkter för varje testat mål. Alla prover var denaturerade och förvarades frysta före test. En överensstämmelse på 99,9 % observerades för de 1152 förväntade positiva resultaten (1151/1152) och 99,6 % överensstämmelse observerades för de 288 förväntade negativa resultaten (287/288). Överensstämmelsen totalt var 99,9 % (1438/1440) med ett 95 % konfidensintervall på 99,5-99,9 och kappas = 0,996. Ingen signifikant förändring för analys-analys, dag-dag eller center-center iaktogs så alla data för varje center kombinerades och visas nedan (tabell 9).

Tabell 9. Reproducerbarheten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test i en multicenterstudie.

Mål-nummer	Center 1		Center 2		Center 3		Center 4		Totalt		
	\bar{X} RLU /CO	% överens.	\bar{X} RLU /CO	% överens.	\bar{X} RLU/CO		\bar{X} RLU /CO	% överens.	\bar{X} RLU /CO	% överens.	
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
TOTALT										1438/1440	99,9

En andra studie för färdighet/reproducerbarhet använde hela *Chlamydia trachomatis* (CT)-organismer tillsatta till en klinisk skenprovsmatrix av epitelceller utfördes vid tre externa centra. De testade proverna innehöll representanter av negativa, låg- (vid eller nära detektionsgränsen) och medelpositiva med två CT-serovarer, blandinfektioner med *Neisseria gonorrhoeae* (GC) och prover som innehöll blod. Tolv prover förväntades vara positiva och tretton prover förväntades vara negativa. Den procentuella överensstämmelsen mellan observerade och förväntade resultat av *digene* HC2 CT-ID DNA Test för de tre individuella centra och alla centra kombinerade visas i tabell 10. Känslighet, specificitet, överensstämmelse och kappavärden för varje center är inkluderade i tabell 11.

Tabell 10. Resultat för reproducerbarhetsstudie av *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Center	n	Observerat kontra förväntat			% överensstämmelse		
		positiva			Alla prover		Uteslutning av tvetydiga
		Negativa	Tvetydiga	Positiva ($\geq 2,5$)	vid 1,0 cutoff*	vid 2,5 cutoff	vid 2,5 cutoff
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 %)
Totalt	75	39	12	24	75/75 (100 %)	63/75 (84 %)	63/63 (100 %)

*Samma värden erhöles när resultaten tolkades som "presumtivt positiva" vid 2,5 cutoff.

Tabell 11. Resultat för *digene* HC2 CT-ID DNA Test, sammanfattning av statistik (cutoff på 1,0)

Statistiskt mått	Center 1	Center 2	Center 3	Center 4
Känslighet	100 % (73,54 %-100 %)*	100 % (73,54 %-100 %)	100 % (73,54 %-100 %)	100 % (90,26 %-100 %)
Specificitet	100 % (75,29 %-100 %)	100 % (75,29 %-100 %)	100 % (75,29 %-100 %)	100 % (90,97 %-100 %)
Överensstämmelse	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

*Siffror inom parentes indikerar 95 % konfidensintervall.

I rutinmässiga färdighetstester ska de 12 proverna som visas i tabell 11, vilka alla innehöll låga koncentrationer av CT-organism ($\sim 5 \times 10^4$ organismer/ml), tolkas enligt avsnittet Tolkning av resultat i denna bruksanvisning såsom presumtivt positiva. Således har analysen visat en förmåga att detektera CT DNA i prover med koncentrationer av organismer detekterbara vid eller nära analysens detektionsgräns. Ytterligare bevis för detta observerades vid test av en tillgänglig panel som innehöll prover med ett lågt antal organismer inom ett intervall som är avsett att detekteras med nukleinsyreförstärkningsanalyser. Tester vid tre externa centra och vid QIAGEN gav 100 % positiva (eller presumtivt positiva) resultat för proverna i den panel som innehöll CT-organism. I två fall föll RLU/CO-värdena inom analysens tvetydiga zon (se tabell 12 nedan).

Tabell 12. Resultat med CT och GC provpanel

Center	Prov-ID	<i>digene</i> HC2 CT/GC DNA Test- resultat		
		RLU/CO	Tolkning	Förväntat resultat
1	1	3,63	POS	POS
	2	0,14	NEG	NEG
	3	0,17	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,21	NEG	NEG
2	1	1,79	TVETYD.*	POS
	2	0,11	NEG	NEG
	3	0,10	NEG	NEG
	4	0,09	NEG	NEG
	5	0,14	NEG	NEG
3	1	3,24	POS	POS
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,14	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,13	NEG	NEG
4	1	1,87	TVETYD.*	POS
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,53	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,15	NEG	NEG

*Tolkades som presumtvt positiva.

PRECISION

En precisionsstudie utfördes vid tre centra för att fastställa precisionen inom analyser och totalt för *digene* HC2 CT-ID DNA Test med en panel av positiva och negativa maskerade, simulerade kliniska STM-prover. Dessutom utvärderades, med samma panel, precisionen inom och mellan instrument för två olika luminometrar. De två modellerna av luminometer inkluderade DML 2000, som är en av de luminometrar som rekommenderas för användning med *digene* HC2 CT-ID DNA Test, och MLX-luminometern, som inte längre finns. Den senare var en av de modeller som användes under den kliniska utvärderingen. Vid initial testning gav två centra acceptabla resultat. Ett center erfor emellertid svårigheter som tillskrevs analysteknik och orsakades troligen av ett tekniskt misstag pga. otillräcklig eller felaktig träning. Laborieteteknikern som utförde testet vid detta center hade genomgått utbildning i korrekt analysteknik, men hade emellertid inte utfört någon *digene* HC2 CT-ID DNA Test under de senaste sex månaderna.

Tabell 13 visar prestandan för *digene* HC2 CT-ID DNA Test, inklusive det center som erfor tekniska problem. Laborieteteknikern genomgick ånyo utbildning i korrekt analysteknik och testningen repeterades. Precisionsdata som visar signifikant förbättring av analysprestanda visas i tabell 14.

Tabell 13. Uppskattad precision av instrument, mellan instrument, inom analys och totalt för RLU/CO per mål före omutbildning av laborietetekniker.

Panel-del	Antal	Medelvärde RLU/ CO	Instrument		Mellan instrument		Inom analys		Totalt	
			Standard avvikelse (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

Precisionsresultaten för kombinerade centra visas i tabell 14. Även om inte uppenbart från denna tabell så var de kvalitativa resultaten 100 % (54/54) (93,4 %-100 % 95 %KI) i överensstämmelse med förväntade resultat vid de tre centra efter korrekt träning av alla laborietetekniker som kör *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Tabell 14. Uppskattad precision av instrument, mellan instrument, inom analys och totalt för RLU/CO per mål efter om utbildning av laboratorietekniker.

Panel-del	Antal	Medel-värde RLU/CO	Instrument		Mellan instrument		Inom analys		Totalt	
			Standard avvikelse (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

För paneldelarna 3 och 4, vilka bägge innehöll låga koncentrationer av CT-organism, så låg de observerade RLU/CO-värdena inom eller nära analysens tvetydiga zon på 1,0-2,5.

För ändamålet med dessa dataanalyser tolkades alla de RLU/CO-värden som hamnade inom den tvetydiga zonen eller överskred 2,5 som positiva.

Ytterligare en precisionsstudie utfördes på QIAGEN för att fastställa total precision för *digene* HC2 CT-ID DNA Test vid användning av DML 2000. En sexdelars precisionspanel bereddes med en simulerad klinisk provmatrix som bestod av odlade epitelceller suspenderade i *digene* transportmedium för prover (STM) och bestod av två negativa prover, två lågpositiva prover och två medelpositiva prover som alla hade en provtagningsanordning av borsttyp. Varje panel testades i triplikat med två paneler per platta av två tekniker under loppet av fem dagar. En nyligen denaturerad panel användes för varje platta. Precisionsresultaten totalt för *digene* HC2 CT-ID DNA Test sammanställdes för alla fem dagars testning och visas i tabell 15. Fastän det inte framgår från dessa tabeller så överensstämde den kvalitativa tolkningen av resultaten till 100 % med förväntade resultat (120/120; 97,0 %-100 % 95 % KI), när RLU/CO på 1,00 användes.

Tabell 15. Total precision för *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Panel-del	Antal	Medel-värde RLU/CO	SD	CV%	Medel-värde -2xSD	Medel-värde +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

PRECISION MED PROVER I PRESERV CYT-LÖSNING

En multicenterstudie utfördes för att fastställa analysprecisionen mellan laboratorier och mellan dagar vid testning av prover i PreservCyt-lösning. Två centra som är oberoende av QIAGEN testade en tolvdelarspanel med simulerade patientprover tagna i PreservCyt-lösning. Varje laboratorium testade sedan panelen i triplikat två gånger om dagen över tre dagar med reagens från samma tillverknings-sats. Tolvdelarspanelen av simulerade prover i PreservCyt-lösning bereddes med olika mängder CT (serovar D; ATCC VR885) för att skapa en panel, se tabell 16.

Tabell 16. Sammansättning av precisionspanelen.

Bulk-prov	Paneldelar*	Förväntade <i>digene</i> HC2 CT/GC DNA Test-resultat	Ungefärligt RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Lågt CT-positivt	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Medelhögt CT-positivt	~10
C	5N, 11N	Negativt	~0,20
D	6N, 12N	Högt negativt	~0,70

*Proventifikationeringen anger känd status för *C. trachomatis* [positivt (P) eller negativt (N)]

I enlighet med NCCLS-riktlinje EP-12A för utvärdering av kvalitativa *in vitro*-diagnostiska tester inkluderades paneldelarna 6N och 12N som båda tagits från provbulk "D". Detta för att kunna bedöma precisionen alldeles under det negativa cutoff-värdet på 1,0 RLU/CO.

För dataanalysen slogs de paneldelar ihop som kom från samma bulkprov.

Tabell 17. Kvalitativa resultat av *digene* HC2 CT-ID DNA Test-förfarande uppdelat på bulkprover.

Bulkprovspool	CT-positivt n (%)	Tvetydigt n (%)	Negativt n (%)	Totalt
Negativt (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Högt negativt (6N, 12N)	0 (0,0)	12 (11,2)	90 (88,8)	108
Totalt negativt	0 (0,0)	12 (5,6)	204 (94,4)	216
Lågt positivt för CT (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Medelhögt positivt för CT (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Totalt positivt	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

Tabell 18. Standardavvikelser (SD) och variationskoefficienter (CV) för precision uppdelad på laboratorium och dag: *digene* HC2 CT-ID DNA Test i PreservCyt

Prov	N	Medel-RLU/CO	SD inom analys	SD mellan analyser	SD mellan dagar	SD mellan centra	SD totalt	%CV
Negativt (5N, 11N)	108	0,215	0,038	0,020	0,010	0,037	0,058	27,0
Högt negativt (6N, 12N)	108	0,648	0,304	0,210	0*	0	0,370	57,1
Medelhögt positivt för CT (2P,3P,8P,9P)	216	12,64	1,444	0,733	1,013	1,070	2,189	17,3
Lågt positivt för CT (1P, 2P, 7P, 8P)	216	4,637	0,490	0,485	0,285	0,288	0,800	17,3

*Negativa variationskomponenter sattes till noll.

ANALYTISK KÄNSLIGHET

Den analytiska känsligheten (detektionsgräns) för *digene* HC2 CT-ID DNA Test bestämdes genom att direkt testa en spädningsserie av en icke-klinisk panel som bestod av 15 serovar av *Chlamydia trachomatis* såväl som *Chlamydia psittaci* och *Chlamydia pneumoniae*. En fyrpunktsspädningsserie av serovarena testades med *digene* HC2 CT-ID DNA Test för bestämma uppskattningen av organismbelastningen för den högsta spädningen som ger ett positivt resultat med *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Varje koncentration för varje måltyp testades i triplikat enligt bruksanvisningen till *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Detektionsgränsen för varje klamydia-serovar visas i sammandrag i tabell 19. Den angivna detektionsgränsens var spädningen för varje serovar som detekterades inom eller nära analysens tvetydiga zon 1,0-2,5 RLU/CO. Den detektionsgränsen hade ett område på 1 000 till 500 000 elementärkroppar/ml beroende på typen av testad serovar. Detektion av 50 till 25 000 elementärkroppar i varje test motsvarar 1 000 till 500 000 elementärkroppar i originalprovet (per ml STM).

De vanligaste CT-serovaren hos asymtomatiska kvinnor, yngre än 30 år, i USA är E, I och D (i avtagande ordning).²³ Hos kvinnor i åldern 17-68, som sökte till en gynekologiklinik i innerstadsmiljö så var de mest prevalenta serovaren som påträffades F, E, och G (i avtagande ordning). Det är viktigt att notera att för alla de vanligaste påträffade CT-serovaren, förutom serovar E, så var den undre detektionsgränsen för *digene* HC2 CT-ID DNA Test 50 elementärkroppar/analys. Serovar E har en högre detektionsgräns (2500 elementärkroppar/analys) såsom tidigare beskrivits. Artikelns författare föreslår vidare att vissa serovarer kan vara associerade med symtomatiska (t.ex. serovar G) eller asymtomatiska (t.ex. serovaren D och I) infektioner. Åter igen för dessa serovarer uppvisade *digene* HC2 CT-ID DNA Test lägre detektionsgräns på 50 elementärkroppar/analys.

Tabell 19. Sammandrag av detektionsgränserna för känsligheten för CT-serovarer.

Serovar	Detekterbar koncentration	
	Elementärkroppar/ml	Elementärkroppar/test
A	1000 - >10 000	50 - >500
B	10 000 – 100 000	500 - 5000
Ba	5000 – 50 000	250 - 2500
C	10 000	500
D	1000 – 10 000	50 - 500
E	50 000	2500
F	1000	50
G	1000 – 10 000	50 - 500
H	10 000 – 100 000	500 - 5000
I	1000 – 10 000	50 - 500
J	5000 – 500 000	2500 – 25 000
K	20 000	1000
L1	2000	100
L2	2000 – 20 000	100 - 1000
L3	10 000	500

ANDRA HÄNSYN VID PROV I PRESERVICYT-LÖSNING

Studierna för detektionsgräns som beskrivits i det tidigare avsnittet beträffande STM upprepades inte med prover i PreservCyt-lösning, eftersom analysens analytiska känslighet förväntas vara oberoende av användning av STM eller PreservCyt-lösning, särskilt som prover i PreservCyt-lösning genomgår konvertering (se närmare bruksanvisningen för *digene* HC2 Sample Conversion Kit), vilket gör att prover i PreservCyt-lösning får en liknande sammansättning som STM-prov innan de används i *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Men eftersom prover i PreservCyt-lösning utsätts för centrifugering under konverteringen var det nödvändigt att utvärdera eventuell verkan av centrifugering på den analytiska känsligheten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. För att bedöma potentiell verkan av centrifugering på den analytiska känsligheten bereddes åttioåtta (88) par *C. trachomatis* DNA-negativa prover i STM och PreservCyt-lösning med lika mängder CT-organism (serovar G). De parade proverna testades och den analytiska känsligheten bedömdes genom jämförelse av de erhållna medelvärdena för RLU/CO [(PreservCyt:STM) x 100].

Ett parat-T test av data i tabell 20 visar att den analytiska känsligheten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test inte skiljer sig statistiskt ($p = 0,33$) från vare sig PreservCyt-lösningens eller STM-lösningens vid testning av cervixprover.

Tabell 20. Jämförelse av analytisk känslighet - *digene* HC2 CT-ID DNA Test - Parade prover i PreservCyt-lösning och STM.

	RLU/CO för <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA Test	
	STM	PreservCyt
Antal prover	88	88
Medel-RLU/CO	3,38	3,48
Median-RLU/CO	3,41	3,44
Standardavvikelse	0,41	0,54
Max RLU/CO	4,42	5,01
Min RLU/CO	2,44	2,27

Vid en annan studie erhöles liknande jämförelse med parade simulerade patientprover. Patientproverna i PreservCyt-lösning kom från ett center oberoende av QIAGEN och screenades i *digene* HC2 CT-ID DNA Test för identifikation av positiva prover. Dessa positiva patientprover kombinerades för att ge sammanlagt tio koncentrerade pooler för prover i PreservCyt-lösning. Från dessa pooler bereddes två alikvoter som behandlades så att cellpelletar bildades. Cellpelletarna återsuspenderades i fosfatbuffrad saltlösning (PBS). Alikvot A bereddes genom att den återsuspenderade pelleten tillsattes till STM och alikvot B genom att den återsuspenderade pelleten tillsattes till PreservCyt-lösning. Båda alikvoterna testades med *digene* HC2 CT-ID DNA Test med följande resultat:

Ett parat-T test av data i tabell 21 visar att den analytiska känsligheten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test inte skiljer sig statistiskt ($p = 0,98$) från vare sig PreservCyt-lösningens eller STM-lösningens vid testning av cervixprover.

Tabell 21. Jämförelse av analytisk känslighet - *digene* HC2 CT-ID DNA Test - Simulerade patientprover i PreservCyt-lösning (PC) parade med STM.

	<i>digene</i> HC2 CT-ID DNA Test	
	STM (aliquot A)	PreservCyt (aliquot B)
Antal prover	10	10
Medel-RLU/CO	30,92	24,90
Median-RLU/CO	3,56	3,00
Standardavvikelse	47,27	38,91
Max RLU/CO	125,62	115,08
Min RLU/CO	1,15	1,26

ANALYTISK SPECIFICITET

Ett batteri med bakterier, virus och plasmider som eventuellt kan finnas i den kvinnliga anogenitaltrakten testades för att utvärdera om korsreaktivitet med proberna som används i *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan förekomma. Alla mikroorganismer testades med koncentrationer på 10^5 och 10^7 organismer per ml och när så möjligt med 10^9 organismer per ml. Renad virus-DNA och plasmider testades med en koncentration på 4 ng per ml.

De bakterier som testades med *digene* HC2 CT-ID DNA Test visas i tabell 22. Alla bakterier utom *Chlamydia psittaci* var negativa med *digene* HC2 CT-ID DNA Test. *Chlamydia psittaci* kan påvisas på huden hos människor som arbetar med eller handhar fågelarter, men har inte påträffats i anogenitaltrakten.²⁴ Således förväntas inte den korsreaktivitet som observerats mellan *Chlamydia psittaci* och CT-proben ge upphov till kliniskt förbryllande resultat för anogenitala prover.

CT-proben korsreagerade inte med *Neisseria gonorrhoeae* vilket uppvisar att *digene* HC2 CT-ID DNA Test-prober inte korsreagerar med GC-ID-probens mål i *digene* HC2 GC-ID DNA-test.

Tabell 22. Mikroorganismer testade för korsreaktivitet.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i>
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ^c
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria species</i> ^d *
<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> ^a	<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> (kliniskt isolat) ^b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i> (HB101) ^b	<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> ^e
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	

^a Testade koncentrationer var 1 x10⁵, 1 x10⁷ och 1 x10⁸ organismer/ml.

^b Både *E. coli*-stammen som användes för att odla plasmider (HB101) och ett kliniskt *E. coli*-isolat testades.

^c Testade koncentrationer var 2 x10⁵, 2 x10⁷ och 2 x10⁸ organismer/ml.

^d Testade koncentrationer var 2 x10⁷, 2 x10⁸ och 2 x10⁹ organismer/ml.

^e Testade koncentrationer var 1 x10⁵ och 1 x10⁶ organismer/ml.

* ATCC *Neisseria*-stam som har egenskaper från både *Neisseria gonorrhoeae* och *Neisseria meningitidis* (ATCC #43831).

Virus- eller plasmid-DNA eller humansera som testades med *digene* HC2 CT-ID DNA Test visas i tabell 23. Presumtiv korsreaktivitet observerades med plasmidvektorer pBR322, pGEM[®] 3Zf och pGEM[®] 3Zf(-). Närvaro av dessa homologa sekvenser har rapporterats i humangenitala prover och falskt positiva resultat kan inträffa vid närvaro av dessa bakteriella plasmider i höga koncentrationer. Av 106 kliniska prover som var positiva med *digene* HC2 CT-ID DNA Test i en total population av 1818 patienter var två identifierade med att ha pBR322, emellertid så var ett prov positivt med CT-odling och DFA och det andra vid CT DNA PCR. Således hade inga av dessa 106 kliniska prover falskt positiva resultat orsakade av homologa pBR322, pGEM3Z och pGEM3Z(-) sekvenser. Förekomsten av dessa plasmider i prover från den kvinnliga genitaltrakten har inte fullt fastställts. Detta är en representativ population som kanske inte reflekterar förekomstfrekvensen av pBR322 i alla testade populationer.

Tabell 23. Virus- eller plasmid-DNA eller humansera som testades för korsreaktivitet.

Cytomegalovirus	Humant helblod
Epstein Barrvirus	Humant papillomvirus typ 6
Hepatit B-ynt antigen-positivt serum	Humant papillomvirus typ 11
Herpes simplex I	Humant papillomvirus typ 16
Herpes simplex II	Humant papillomvirus typ 18
Humana epitelceller	pGEM [®] 3Z
Humant immunbristvirus (HIV) ^a	PGEM [®] 3Zf(-)
Human genom-DNA	pBR322
Human placenta-DNA	SV40

^a Testade koncentrationer var 2×10^6 , 2×10^7 och 2×10^8 organismer/ml.

EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I TRANSPORTMEDIUM FÖR PROVER

Effekten av blod och andra potentiellt störande och definierade substanser utvärderades i *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Helblod, sköljvätska, svampdödande kräm och preventivmedelsgel (substanser som vanligtvis kan finnas i cervixprover) tillsattes i koncentrationer på 1 % och 5 % till negativa och positiva prover i transportmedium för prover (kliniska provpooler och icke-kliniska prover). Inga falskt positiva resultat observerades med någon av de fyra substanserna oavsett koncentration. En studie av odefinierade substanser närvarande i en population av 117 negativa kliniska prover visade att odefinierade substanser till liten del, men inte i väsentlig grad, kan öka signalen från *Chlamydia trachomatis* DNA i *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Denna effekt har ingen betydelse då den är motsatsen till en inhiberande effekt.

EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I PRESERVICYT-LÖSNING

Utvärderingar av specifika påverkande substanser som beskrivs i avsnittet ovan för STM-prover utfördes inte med prover i PreservCyt-lösning. Det är emellertid föga troligt att prover i PreservCyt-lösning skulle uppvisa andra påverkanprofiler än STM-prover, eftersom endocervixprover tas från samma anatomiska ställe för prover i PreservCyt-lösning och STM och eftersom prover i PreservCyt-lösning genomgår en konverteringsprocess (som beskrivs i bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion Kit). Detta gör deras sammansättning jämförbar med prover i STM. Rester av Sample Conversion-buffert (SCB)¹ kan vara närvarande i spår mängder i fullständigt konverterade prover i PreservCyt-lösning. En analytisk studie utfördes därför för att kontrollera den analytiska prestandan hos *digene* HC2 CT-ID DNA Test i närvaro av varierande mängder SCB. Varierande koncentrationer av plasmid-DNA bereddes i STM. Större volymer SCB tillsattes sedan till proverna och tre alikvoter från varje prov testades för att få fram ett medelvärde för RLU/CO för varje prov i närvaro av antingen PreservCyt-lösning eller SCB. Jämförelse av dessa medvärden för RLU/CO för varje prov jämfört med medelvärdet för RLU/CO för varje kontrollprov i STM gav inga falskt positiva eller falskt negativa resultat.

PRECISIONEN VID CUTOFF FÖR *digene* HC2 CT-ID DNA TEST MED KLINISKA PROVER TAGNA I STM

Reproducerbarhet för *digene* HC2 CT-ID DNA Test med kliniska prover tagna i STM fastställdes i en studie med 30 kliniska pooler (15 positiva och 15 negativa) som bereddes genom att kombinera tidigare denaturerade och testade prover tagna med cervixborste i STM. Proverna testades med fyra replikat var dag under fem dagar med totalt 20 replikat per prov. *digene* HC2 CT-ID DNA Test användes för testningen. Medelvärdet för RLU/CO, 95 % konfidensintervall runt medelvärdet (95 % KI) och procentandel positiva resultat beräknades för varje prov under fem dagar och visas i tabell 24.

¹ Sample Conversion-buffert. En buffertlösning med eosin Y och 0,05 % (vikt/volym) natriumazid som används vid konvertering av prover i PreservCyt-lösning. Se bruksanvisningen till QIAGEN:s *digene* HC2 Sample Conversion Kit för specifika detaljer.

Tabell 24. Medelvärde RLU/CO med konfidensintervall och procentandel positiva med *digene* HC2 CT-ID DNA Test (medelvärde RLU/CO i fallande ordning).

Nr	RLU/CO	95 % CI	% positiva
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)

Prover med ett medelvärde av RLU/CO på 20 % eller mer över cutoff var positiva 98 % av tiden medan prover med ett medelvärde av RLU/OC på 20 % eller mer under cutoff var negativa 100 % av tiden. Dessa resultat indikerar att prover som avviker mer än 20 % från cutoff kan förväntas ge enhetliga resultat med *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Prover med värden nära analysens cutoff förblev i stort positiva eller negativa och de som låg över analysens cutoff men inte med mer än 20 % förblev positiva 70 % av tiden. De prover som låg under cutoff men inte med mer än 20 % förblev negativa 79 % av tiden.

Dessa resultat visar att *digene* HC2 CT-ID DNA Test ger reproducerbara resultat med kliniska prover som tagits i STM vars RLU/CO-värden inte avviker mer än 20 % från analysens cutoff.

HISTORISK INFORMATION

Historiskt sett så användes Dynex Model MLX luminometern i tillägg till DML 2000 för att generera data och bestämma prestandaegenskaper för *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Endast DML 2000 används fortfarande för att generera data då MLX luminometer inte längre är tillgänglig för användning. Följande data genererades från den kliniska multicenterstudien för att bestämma reproducerbarheten för den positiva och negativa kalibratoren och visas nedan såsom historisk information.

För att bestämma reproducerbarheten för den positiva och negativa kalibratoren så sammanställdes resultaten från de kliniska utvärderingarna som berörde 81 analyser med *digene* HC2 CT-ID DNA Test (tabell 25). Resultaten visar att medelvärdet för %CV för dessa 81 analyser var 6,4 % och att ingen analys hade ett medelvärde för negativ kalibrator som översteg 150 RLU. Reproducerbarhet överstigande 25 % CV för positiv kalibrator observerades bara för 2 av 81 analyser (2,5 %). Ingen av testets %CV förblev större än 25 % vilket indikerar att alla analyser var giltiga.

Tabell 25. Den positiva och negativa kalibrators prestanda. Kombinerade data från den kliniska multicenterstudien och precisionsstudien (antal = 81 analyser).

Instrument	Antal analyser	Medelvärde S/N-kvot	Kalibrortyp	Medelvärde av beräknat (RLU)		Medelvärde av beräknat %CV	
				Tre replikat	Justerat för avvikande värde	Tre replikat	Justerat för avvikande värde
DML2000	9	5,49	Negativ	44,89	39,15	26,10	13,75
			Positiv	231,41	231,41	7,35	7,35
MLX*	72	5,33	Negativ	0,075	0,074	16,59	12,90
			Positiv	0,265	0,263	6,34	4,86

*Inte längre tillgänglig för användning.

EKVIVALENS MELLAN PROVER I STM OCH PRESERVCYT-LÖSNING

Ekvivalens mellan prover i STM och PreservCyt-lösning granskades i en klinisk utvärdering av 1231 parade cervixprover. Ett prov i PreservCyt-lösning behandlades i enlighet med bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion Kit och testades tillsammans med ett parat prov i STM med *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Resultatet av utvärderingen anges i tabell 26. Det kliniska resultatet etablerades genom användning av PreservCyt-lösningssprover med en restvolym på över 6,5 ml. Undersökning av prover med en restvolym på mellan 4,0 - 6,5 ml ska godkännas av laboratoriet.

Tabell 26. Sammanställning av statistiska data för överensstämmelse med *digene* HC2 CT-ID DNA Test mellan parade cervixprover tagna i STM och PreservCyt-lösning.

Kohort för dataanalysen	Kappa (95 % CI)	Positiv överensstämmelse (n/N) (95 % CI)	Negativ överensstämmelse (n/N) (95 % CI)	Total överensstämmelse (n/N) (95 % CI)
Uteslutande av osäkra data	0,92 (0,88, 0,96)	92,16 (94/102) 85,13, 96,55	99,36 (1092/1099) 98,69, 99,74	98,75 (1186/1201) 97,95, 99,30
Algoritm för omtestning* av osäkra data	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

*Prover i intervallet 1,0 till 2,5 RLU/CO omtestades i duplikat. Provklassificeringen fastställdes sedan med en två av tre-regel.

Reproducerbarheten för *digene* HC2 CT-ID DNA Test bedömdes som en del av en klinisk utvärdering för att demonstrera att ekvivalenta *digene* HC2 CT-ID DNA Test-resultat erhöles när en panel på 20 prov i PreservCyt-lösning testades över tre dagar på tre olika laboratorier. Resultatet av studien av reproducerbarheten anges i tabell 27.

Tabell 27. Procentandel överensstämmelse i *digene* HC2 CT-ID DNA Test – per center

Center	Observerad kontra förväntad ^a	% överensstämmelse (95 % CI)
1	60/60	100 (94,04-100)
2	60/60	100 (94,04-100)
3	60/60	100 (94,04-100)
Samtliga centra	180/180	100 (97,97-100)

^a20 delar x 3 dagar x 3 centra

REFERENSER

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. Evaluation 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.

GUIDE FÖR PROBLEMLÖSNING

<i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST		
OBSERVATION	TROLIGA ORSAKER	LÖSNINGAR
Felaktig eller ingen färgförändring vid denaturering.	Reagens för denaturering inte tillsatt eller inte korrekt tillverkat.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verifiera att reagens för denaturering innehåller indikatorfärgen och har en mörkviolett färg. 2. Verifiera att reagens för Denaturering tillsattes provet genom att mäta provvolymen (bör vara 1,5 ml). Om volymen indikerar att reagens för denaturering inte tillsatts, tillsätt passande mängd, blanda och fortsätt med analysen om korrekt färgförändring iakttas.
	Blodiga prover kan maskera färgförändringen.	Den exakta färgförändringen som beskrivits kan inte förväntas med dessa typer av prover men analysens testresultat ska inte påverkas negativt av detta.
	Provets pH kan vara ovanligt surt.	Provet kan vara ovanligt surt och den förväntade färgförändring kommer inte att ske. Tag ett nytt prov innan ättiksyra appliceras till cervix eftersom inkorrekt pH av provet kommer att påverka testresultaten negativt.
Kvalitetskontroll ger felaktigt resultat	Felaktigt programvaruprotokoll valt för testet	Om programvaruprotokollet är fel för det test som körs ska plattan läsas igen inom 30 minuter efter det att detektionsreagens 2 har tillsatts och med rätt protokoll.
	Omkastad placering av KK för CT och GC på plattan.	Kör prover igen.
Felaktig färgförändring under hybridisering.	<ul style="list-style-type: none"> • Otillräcklig blandning av probblandning med denaturerad kalibrator, kvalitetskontroll och/eller prover. • Probblandning inte tillsatt. • Felaktig volym av reagens tillsatt. 	Skaka hybridiseringsmikrotiterplattan i ytterligare två minuter. Om det finns brunnar som fortfarande är violetta eller gråa, tillsätt ytterligare 25 µl av probblandningen och blanda väl. Om korrekt färgförändring inte sker när prob tillsatts och omblandats och provet inte innehöll blod eller annat materiel ska provet omtestas.
	Blodiga prover kan maskera färgförändringen.	Den exakta färgförändringen som beskrivits kan inte förväntas med dessa typer av prover men analysens testresultat ska inte påverkas negativt av detta.
	Prov hade mindre än < 1000 µl av <i>digene</i> transportmedium för prover (STM).	Kontrollera provets ursprungliga volym. Volymen ska vara 1425 µl ± 20 µl (efter det att 75 µl tagits bort). Om volymen är < 1405 µl så innehöll det ursprungliga provet < 1000 µl av transportmedium för prover (STM). Skaffa ett nytt prov.
Analysen uppfyller inte kriterier för kalibreringsverifikation . Ingen signal observeras i positiv kalibrator, kvalitetskontroller eller prover.	Ingen prob tillsatt till spädningsvätska för prob.	Tillverka CT-probblandning såsom beskrivs i avsnittet Reagenstillverkning och förvaring i denna bruksanvisning. Blanda ordentligt. Märk röret ordentligt. Repetera analysen med nyberedd probblandning.
	Proben kontaminerad med RNAs under beredning.	Använd pipettspetsar med aerosolfilter för att pipettera prob och använd puderfria handskar. Späd ut prob i en steril behållare. Använd endast rena, nya reagensbehållare för engångsbruk.
	Otillräcklig blandning av probblandning och spädningsvätska för prob.	Efter prob har tillsatts spädningsvätska för prob, blanda med hög hastighet under minst fem sekunder. En synlig virvel måste bildas.
	Otillräcklig blandning av spädd prob och denaturerade prover.	Efter tillsats av probblandning till denaturerat prov, täck hybridiseringsmikrotiterplattan och skaka med roterande skak i med 1100 ± 100 v/min under 3 ± 2 minuter såsom beskrivs i bruksanvisningen under avsnittet Testförfarande, Hybridisering, steg 6. Kontrollera färgförändringen från violett till gult i varje brunn.

digene HC2 CT-ID DNA TEST

OBSERVATION	TROLIGA ORSAKER	LÖSNINGAR
	Felaktig tid eller temperatur under hybridiseringsmomentet.	Hybridisera under 60 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C, såsom beskrivs i denna bruksanvisning under avsnittet Testförfarande, Hybridisering, steg 7. Kontrollera temperaturen på värmeblock för mikrotiterplatta I. Försäkra dig om att värmeblocket har inställts för uppvärmning av proverna till korrekt temperatur och har förvärmats en timme före användning.
	Otillräcklig blandning under infångningsmomentet.	Skaka med roterande skak I med 1100 ± 100 v/min under 60 ± 5 minuter vid 20-25 °C, såsom beskrivs i denna bruksanvisning under avsnittet Testförfarande, Hybridinfångning, steg 4. Verifiera hastigheten på roterande skak I genom att kalibrera såsom anges i avsnittet Kalibrering av skakhastighet i användarhandboken för roterande skak I.
	<ul style="list-style-type: none"> Korrekt mängd av detektionsreagens 1 har inte tillsatts. Inte inkuberad under angiven tid. 	<p>Pipettera 75 µl av detektionsreagens 1 till varje brunn med en 8-kanalspipett.</p> <p>Inkubera vid 20-25 °C under 30-45 minuter.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Korrekt mängd av detektionsreagens 2 har inte tillsatts. Inte inkuberad under angiven tid. 	<p>Pipettera 75 µl av detektionsreagens 2 till varje brunn med en 8-kanalspipett.</p> <p>Inkubera vid 20-25 °C under 15 till 30 minuter.</p>
	Fel på luminometern eller fel programmering.	Se avsnitten underhåll/service och felsökning i användarguiden till tillämpligt <i>digene</i> analysprogram för ytterligare information, eller kontakta QIAGEN:s tekniska service.
Förhöjda RLU-värden i kalibratorer, kvalitetskontroller och/eller prover (≥ 150 RLU i flera eller alla brunnar). Analysen klarar inte kriterier för validering.	<ul style="list-style-type: none"> Reagens för denaturering har inte tillsatts, felaktig reagensvolym tillsatt eller otillräcklig blandning av reagens för denaturering med kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. Otillräcklig temperatur på vattenbadet och vattennivå. 	<ul style="list-style-type: none"> Verifiera att den repeterande pipetten dispenserar noggrant innan reagens för denaturering tillsätts. Det är väsentligt att pipetter är kalibrerade. Tillsätt ytterligare en halv volym av reagens för denaturering till varje rör och blanda väl. För att undvika falskt positiva resultat se till att vätskan sköljer rörets hela inneryta (om blandning sker manuellt, vänd röret upp och ned en gång). Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska bli violetta efter tillsättning av reagens för denaturering. Kontrollera hastighetskalibreringen på MST Vortexer 2. Kontrollera vattenbadets vattennivå och temperatur.
	<ul style="list-style-type: none"> Ljussläckage i luminometern. Tätningen sönder. Dörren inte tätt tillsluten. 	Gör en bakgrundsavläsning (rådatamätning) på luminometern genom att läsa av en tom mikrotiterplatta. En avläsning på över 50 RLU tyder på att ljussläckage kan förekomma. Se avsnitten underhåll/service och felsökning i användarguiden till tillämpligt <i>digene</i> analysprogram för ytterligare information, eller kontakta QIAGEN:s tekniska service.
	Kontaminering av detektionsreagens 2 eller brunnar på fångande mikrotiterplatta med detektionsreagens 1 eller exogent alkaliskt fosfat.	Se kontamineringskontroll i detta problemlösningsavsnitt.
	Kontaminerad tvättbuffert.	Se kontamineringskontroll i detta problemlösningsavsnitt.
	Kontaminerad automatiserad tvättapparat för plattor I.	Se kontamineringskontroll i detta problemlösningsavsnitt.
	Otillräcklig tvättning av brunnar på fångande mikrotiterplatta efter inkubering med detektionsreagens 1.	Tvätta mikroplattans brunnar ordentligt med tvättbuffert sex gånger och fyll brunnarna varje gång så att de rinner över eller använd automatiserad tvättapparat för plattor. Det ska inte finnas någon synlig rosa vätska kvar i brunnarna efter tvätten. Se avsnittet Guide för problemlösning i <i>användarhandboken till den automatiserade tvättapparaten för plattor</i> för instruktioner om test för kontamination eller funktionsfel.

digene HC2 CT-ID DNA TEST

OBSERVATION	TROLIGA ORSAKER	LÖSNINGAR
	Kontamination av mikrotiterplattans brunnar med detektionsreagens 1.	Se till att alla arbetsytor är rena och torra. Var försiktig när detektionsreagens 1 används. Undvik aerosoler.
	Avtorkning av hybridiseringslösning på samma område på Kimtowels torkdukar eller likvärdiga lågluddande pappershänddukar Felaktiga torkdukar användes.	Torka inte av igen med samma område på Kimtowels torkdukar eller likvärdiga lågluddande pappershänddukar. För avtorkning ska Kimtowels torkdukar användas eller likvärdiga lågluddande pappershänddukar.
	Kvalitetskontrollmateriel för CT använt som positiv kalibrator. Analysen underkänns.	Se till att kalibratorer och kvalitetskontroller används rätt.
Låga PK/NK-kvoter eller högt antal låg-positiva prover (> 20 % av totala antalet prover) med en RLU/CO-kvot < 2,0. Analysen kanske inte uppfyller kriterier för validering.	Otillräcklig beredning av prover.	Tillsätt lämplig volym av reagens för denaturering och blanda ordentligt. För att undvika falskt positiva resultat, se till att vätskan sköljer rörets hela inneryta genom att blanda med MST Vortexer 2-metoden under minst fem sekunder (för manuell blandningsmetod, blanda under minst fem sekunder och vänd upp och ned på röret en gång). En distinkt färgförändring från klar till mörkviolett ska ses. Inkubera under 45 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. När prover i PreservCyt-lösning används kommer dessa hybrider troligtvis att finnas på sample conversion-rörets innerväggar. För att undvika möjlig överföring av detta odenaturerade cellmateriel får inte pipettspetsen vidröra insidorna av sample conversion-rör under överföring av denaturerade prover till mikrotiterplattbrunnar som används för CT-probhybridisering. Se bruksanvisningen till <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit för mer detaljer.
	Prob inte blandad ordentligt eller otillräckligt med probblandning tillsatt till analyser.	Bered probblandning såsom beskrivits. Blanda ordentligt och se till att en synlig virvel bildas. Probblandningar måste tillsättas brunnarna med en multikanalpipett eller repeterande pipett för att tillförsäkra en noggrann dispensering.
	Otillräcklig volym av spädd probblandning tillsatt till varje hybridiseringsbrunn på mikrotiterplattan.	Verifiera att 8-kanalpipetten dispenserar noggrant innan probblandning tillsätts hybridiseringsmikroplatta. 25 µl probblandning ska också tillsättas till det denaturerade provet i botten av varje mikrobrunn. Verifiera att 8-kanalpipetten dispenserar noggrant innan probblandningen tillsätts hybridiseringsmikrobrunnarna. Färgen ska ändras från mörkviolett till gult när probblandningen tillsätts och blandas ordentligt.
	Detektionsreagens 1 har förlorat sin aktivitet.	Detektionsreagens 1 ska förvaras vid 2-8 °C. Använd före det utgångsdatum som anges på satsens ytterkartong.
	Otillräcklig infångning av RNA: DNA-hybrider.	Infångningsmomentet ska utföras med roterande skak I inställd på 1100 ± 100 v/min. Verifiera hastigheten på roterande skak I genom att kalibrera såsom anges i avsnittet Kalibrering av skakhastighet i användarhandboken för roterande skak I.
	Otillräcklig tvätt.	Tvätta mikroplattans brunnar ordentligt med tvättbuffert sex gånger och fyll brunnarna varje gång så att de rinner över eller använd automatiserad tvättapparat för plattor.
	Kontaminerad tvättbuffert.	Se kontamineringskontroll i detta problemlösningsavsnitt.
En rad positiva prover med ungefärligen samma RLU-värden.	Kontaminering av brunnar på fångande mikrotiterplatta under analysens utförande.	Täck alltid fångande mikrotiterplatta vid all inkubation. Undvik att utsätta mikrotiterplattans brunnar för aerosolkontaminering när analysen utförs. Använd puderfria handskar vid hantering.
	Kontaminering av detektionsreagens 2	Var försiktig så att reagenset inte kontamineras vid pipettering av detektionsreagens 2 till brunnarna på fångande mikrotiterplatta. Undvik kontaminering av detektionsreagens 2 med aerosoler från detektionsreagens 1 eller med laboratoriedamm, osv.

digene HC2 CT-ID DNA TEST

OBSERVATION	TROLIGA ORSAKER	LÖSNINGAR
	Funktionsfel på automatiserad tvättapparat för plattor.	Se kontamineringskontroll i detta problemlösningsavsnitt eller se avsnittet Guide för problemlösning i <i>användarhandboken för den automatiserade tvättapparaten för plattor</i> .
Replikatens % CV-värden utspridda.	Pipettering inte noggrann (t.ex. luftblåsor, pipetten inte kalibrerad).	Kontrollera pipetten för att tillförsäkra att reproducerbara volymer dispensereras. Kalibrera pipetter rutinmässigt.
	Otillräcklig blandning.	Blanda ordentligt i alla moment. Blanda före och efter denatureringsinkubation. Se till att en synlig virvel bildas.
	Ofullständig överföring av vätska från hybridiseringsmikroplatta till brunnarna på fångande mikrotiterplatta.	Var noggrann under överföringsmomentet från hybridiseringsmikroplattan till fångande mikrotiterplattan för att säkerställa att reproducerbara volymer överförs.
	Felaktiga tvättförhållanden.	Tvätta mikroplattans brunnar ordentligt med tvättbuffert sex gånger och fyll brunnarna varje gång så att de rinner över eller använd automatiserad tvättapparat för plattor och passande protokoll för automatiserad tvättapparat för plattor.
	Kontamination av mikroplattans brunnar med detektionsreagens 1.	Se till att alla arbetsytor är rena och torra. Var försiktig när detektionsreagens 1 används. Undvik aerosoler.
	Kontamination av pipettspetsen med odenaturerat materiel vid överföring av denaturerat prov till mikrotiterbrunnen som används för hybridisering av CT-prob.	Denatureringsmomentet i provbehandlingsproceduren måste utföras i enlighet med denna bruksanvisning. Om provet inte blandas ordentligt eller röret inte vänds eller skakas på rätt sätt kan det hända att denatureringen av ospecifika RNA:DNA-hybrider i cervixproverna inte denatureras tillräckligt. När prover i PreservCyt-lösning används kommer dessa hybrider troligtvis att finnas på sample conversion-rörets innerväggar. För att undvika möjlig överföring av detta odenaturerade cellmateriel får inte pipettspetsen vidröra insidorna av sample conversion-rör under överföring av denaturerade prover till mikrotiterplattbrunnar som används för CT-probhybridisering.
	Avtorkning på samma område, över flera rader, på Kimtowels torkdukar.	Torka inte av igen med samma område på Kimtowels torkdukar.
Falskt positiva resultat från kända negativa prover.	Detektionsreagens 2 kontaminerat.	Var försiktig så att du inte korskontaminerar prover när du tillsätter detektionsreagens 2 mellan prover. Om endast en del av satsen används så ska den erforderliga volymen för analysen alikvoterats till en ren reagensbehållare innan pipetten fylls.
	Kontamination av mikroplattans brunnar med detektionsreagens 1.	Tvätta mikroplattans brunnar ordentligt med tvättbuffert sex gånger och fyll brunnarna varje gång så att de rinner över eller använd automatiserad tvättapparat för plattor. Det ska inte finnas någon synlig rosa vätska kvar i mikroplattans brunnar efter tvätten.
	Kontamination av pipettspetsen med odenaturerat materiel vid överföring av denaturerat prov till mikrotiterbrunnen som används för hybridisering av CT-prob.	Denatureringsmomentet i provbehandlingsproceduren måste utföras i enlighet med dessa anvisningar. Om provet inte blandas ordentligt eller röret inte vänds eller skakas på rätt sätt kan det hända att denatureringen av ospecifika RNA:DNA-hybrider i cervixproverna inte denatureras tillräckligt. När prover i PreservCyt-lösning används kommer dessa hybrider troligtvis att finnas på sample conversion-rörets innerväggar. För att undvika möjlig överföring av detta odenaturerade cellmateriel får inte pipettspetsen vidröra insidorna av sample conversion-rör under överföring av denaturerade prover till mikrotiterplattbrunnar som används för CT-probhybridisering.

digene HC2 CT-ID DNA TEST

OBSERVATION	TROLIGA ORSAKER	LÖSNINGAR
	Otillräcklig beredning av prover.	Tillsätt lämplig volym av reagens för denaturering och blanda ordentligt. För att undvika falskt positiva resultat, se till att vätskan sköljer rörets hela inneryta genom att blanda med MST Vortexer 2-metoden under minst fem sekunder (för manuell blandningsmetod, blanda under minst fem sekunder och vänd upp och ned på röret en gång). En distinkt färgförändring från klar till mörkviolett ska ses. Inkubera under 45 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. När prover i PreservCyt-lösning används kommer dessa hybrider troligtvis att finnas på sample conversion-rörets innerväggar. För att undvika möjlig överföring av detta odenaturerade cellmateriel får inte pipettspetsen vidröra insidorna av sample conversion-rör under överföring av denaturerade prover till mikrotiterplattbrunnar som används för CT-probhybridisering. Se bruksanvisningen till <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit för mer detaljer.
	Felaktiga tvättförhållanden.	Tvätta mikroplattans brunnar ordentligt med tvättbuffert sex gånger och fyll brunnarna varje gång så att de rinner över eller använd automatiserad tvättapparat för plattor och passande protokoll för automatiserad tvättapparat för plattor.
Förhöjda RLU-värden för negativ kalibrator (> 150 RLU). Resten av analysen fungerar som den ska	Detektionsreagens 2 inkuberades vid en högre temperatur än 20-25 °C.	Testet är ogiltigt pga. höga negativa kalibratorvärden. Testa om och se till att infångnings- och detektionsmomenten inkuberas vid 20-25 °C.
	Detektionsreagens 2 inkuberades längre än 30 minuter.	Läs av plattan 15 minuter efter inkubation vid 20-25 °C (och inte senare än 30 minuter efter inkubationen).
	Detektionsreagens 2 eller tvättbuffert var kontaminerad med alkaliskt fosfat eller detektionsreagens 1.	Se kontamineringskontroll i detta problemlösningsavsnitt.

KONTAMINERINGSKONTROLL

Utvärderat reagens	Kontamineringskontrollförfarande	Tolkning av resultat
<p>Obs: Var försiktig när detektionsreagens 2 pipetteras för att undvika kontamination. Använd handskar och undvik att vidröra arbetsytor med pipettspetsar.</p>		
<p>Detektionsreagens 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettera 75 µl alikvoterat, resterande och/eller ursprungligt detektionsreagens 2 från flaskan till en tom brunn på fångande mikrotiterplatta. • Inkubera 20-25 °C i 15 minuter. Undvik direkt solljus. • Avläs mikroplattbrunnarna i luminometer. <p>Obs: Test av detektionsreagens 2 i replikat på tre ger optimal utvärdering av prestanda.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Detektionsreagenskontroll 2 bör vara < 50 RLU. • Om värden för detektionsreagens 2 är < 50 RLU, kan detektionsreagens 2 användas för att upprepa analysen. • Vid kontamination, (> 50 RLU), erhåll en ny sats och upprepa analysen.
<p>Tvättapparat och/eller vattenkälla</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettera 75 µl detektionsreagens 2 till fyra separata brunnar på fångande mikrotiterplatta. • Märk brunnar 1-4. • Brunn 1 är detektionsreagenskontroll 2. • Pipettera 10 µl tvättbuffert från tvättflaskan till brunn 2. • Låt tvättbuffert flöda genom tvättslangen. • Pipettera 10 µl tvättbuffert från slangens till brunn 3. • Erhåll en alikvot vatten som användes för att bereda tvättbufferten. Pipettera 10 µl vatten till brunn 4. • Inkubera 20-25 °C i 15 minuter. Undvik direkt solljus. • Avläs mikroplattbrunnarna i luminometer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detektionsreagenskontroll 2 (brunn 1) bör vara < 50 RLU. • Jämför RLU-värdet från brunn 2, 3 och 4 med detektionsreagenskontroll 2 RLU-värde (brunn 1). De olika RLU-värdena för brunn 2, 3 och 4 bör inte överstiga 50 RLU för detektionsreagenskontroll 2 RLU-värde (brunn 1). • Värden som överstiger 50 RLU för detektionsreagenskontroll 2 anger kontamination. Se <i>Reagenstillverkning och förvaring</i> för instruktioner om rengöring och underhåll av tvättapparat.
<p>Automatiserad tvättapparat för plattor</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettera 75 µl detektionsreagens 2 till fem separata brunnar på fångande mikrotiterplatta. • Märk brunnar 1-5. • Brunn 1 är detektionsreagenskontroll 2. • Pipettera 10 µl tvättbuffert från tvättapparatens flaska märkt <i>Wash</i> till brunn 2. • Pipettera 10 µl sköljvätska från tvättapparatens flaska märkt <i>Rinse</i> till brunn 3. • Tryck på påfyllningsknappen på tvättapparaten, vilket gör att tvättbuffert flödar genom slangarna. • Pipettera 10 µl tvättbuffert från tanken till brunn 4. • Tryck på sköljningsknappen på tvättapparaten, vilket gör att sköljvätska flödar genom slangarna. • Pipettera 10 µl sköljvätska från tanken till brunn 5. • Täck och inkubera i 15 minuter vid 20-25 °C. Undvik direkt solljus. • Avläs mikroplattbrunnarna i luminometer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detektionsreagenskontroll 2 (brunn 1) bör vara < 50 RLU. • Jämför RLU-värdet från brunn 2, 3, 4 och 5 med detektionsreagenskontroll 2 RLU-värde (brunn 1). De olika RLU-värdena för brunn 2, 3, 4 och 5 bör inte överstiga 50 RLU för detektionsreagenskontroll 2 RLU-värde (brunn 1). • Värden som överstiger 50 RLU för detektionsreagenskontroll 2 anger kontamination av tvättapparaten för plattor. • Se användarhandboken för <i>den automatiserade tvättapparaten för plattor, Dekontamineringsförfarande</i>.

KONTAKTINFORMATION

Använd kontaktinformationsbladet som medföljer denna produkt för att kontakta din lokala QIAGEN representant.

QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] och Rapid Capture[®] är registrerade varumärken som tillhör QIAGEN.

Hybridinfångningstekniken skyddas av europeiskt patentnr. 0 667 918 registrerat i Österrike, Belgien, Schweiz, Lichtenstein, Tyskland, Danmark, Spanien, Frankrike, Storbritannien, Grekland, Irland, Italien, Luxemburg, Nederländerna och Sverige.

Amerikanskt patent för Hybrid Capture nr. 6,228,578B1

Varumärken som tillhör andra företag:

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

Kimtowels[®]: Kimberly-Clark Corporation

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

CDP-Star[®]: Tropix, Inc.

Parafilm[®]: American Can Co.

DuraSeal[®]: Diversified Biotech, Inc

Sarstedt[®]: SARSTEDT AG & Co.

pGEM[®]: Promega Corporation

VWR[®]: VWR International, Inc.

Corning[®]: Corning, Inc.

ÖVERSIKT ÖVER *digene* HC2 CT-ID DNA TEST

Viktigt: Det är viktigt att du känner till de detaljerade procedurerna innan detta sammandrag används.

	PROCEDUR	
Denaturering (För prover i PreservCyt -lösning, se förfarandet för beredning av prover i PreservCyt-lösning)	<p style="text-align: center;">Manuell blandningsmetod</p> <p style="text-align: center;">Gör en layout för plattan Märk hybridiseringsplattan. Bered reagens för denaturering.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipettera reagens för denaturering (volymen är ekvivalent med halva provvolymen) till kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. Blanda varje prov, kalibrator och kvalitetskontroll individuellt under fem sekunder med hög hastighet och vänd upp och ned (se denna bruksanvisning för detaljer).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inkubera vid 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bered CT-probblandning.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Metod med (MST) Vortexer 2</p> <p style="text-align: center;">Gör en layout för plattan Märk hybridiseringsplattan. Bered reagens för denaturering.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipettera reagens för denaturering (volymen är ekvivalent med halva provvolymen) till kalibratorer, kvalitetskontroller och prover.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Täck stället med film och lock.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Blanda under tio sekunder med maximal hastighet.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inkubera vid 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bered CT-probblandning.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
Hybridisering	<p style="text-align: center;">Metod med värmeblock för mikrotiterplatta</p> <p style="text-align: center;">Blanda denaturerade prover väl och pipettera 75 µl denaturerad kalibrator, kvalitetskontroll eller prov till mikrotiterplattans brunnar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inkubera i tio minuter vid 20-25 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Pipettera 25 µl CT-probblandning till mikrotiterplattans brunnar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Täck mikroplattan med ett lock och skaka med roterande skak I med 1100 + 100 v/min under 3 ± 2 minuter. <i>Kontrollera att alla brunnar uppvisar en gul färg (PreservCyt-lösningen blir rosa)</i></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inkubera vid 65 ± 2 °C under 60 ± 5 minuter.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bered fångande mikrotiterplatta.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Hybridinfångning	<p style="text-align: center;">Överför innehållet från varje brunn på hybridiseringsplattan eller mikrorör till motsvarande brunn på fångande mikrotiterplattan med en 8-kanalspipett.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Täck med ett lock.</p> <p style="text-align: center;">Skaka med 1100 ± 100 v/min vid 20-25 °C i 60 ± 5 minuter. Bered tvättbuffert.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Dekantera och torka av fångande mikrotiterplatta (se denna bruksanvisning för detaljer).</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Hybriddetektion	<p style="text-align: center;">Pipettera 75 µl av detektionsreagens 1 till varje brunn på fångande mikrotiterplatta. Täck fångande mikrotiterplattan med plattlock, Parafilm eller liknande. Inkubera vid 20-25 °C i 30 - 45 minuter. Tvätta plattan med valfri metod.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Tvättning	<p style="text-align: center;">Metod för manuell tvättning</p> <p style="text-align: center;">Dekantera och torka av fångande mikrotiterplatta (se bipacksedeln för detaljer).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Tvätta sex gånger.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Torka av på lågluddande pappershanddukar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Metod med automatisk tvättapparat för plattor</p> <p style="text-align: center;">Lägg plattan på den automatiska tvättapparaten för plattor I och tryck på START/STOP för att starta. Gå till nästa steg</p>
Signalförstärkning	<p style="text-align: center;">Pipettera 75 µl av detektionsreagens 2 till varje brunn på fångande mikrotiterplatta. Täck med plattlock. Inkubera vid 20-25 °C i 15-30 minuter.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Avläsning	<p style="text-align: center;">Läs av fångande mikrotiterplattan med en QIAGEN-godkänd luminometer.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Validera analysen och tolka provernas resultat.</p>	