



Hybrid Capture[®] 2

GC-ID DNA Test

Bruksanvisning

digene[®] HC2 GC-ID DNA Test

En *in vitro*-nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning och kemiluminescens på mikrotiterplatta för kvalitativ detektion av *Neisseria gonorrhoeae* (GC) DNA i cervixprover

Att användas med:

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

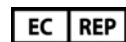
STÖRRE ÄNDRINGAR FRÅN TIDIGARE VERSION AV BIPACKSEDEL

1. Uppdaterade produktvarumärken
2. 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



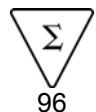
QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

©2011 QIAGEN



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

IVD



REF 5140-1330

L2172SV Rev. 3

INNEHÅLL

NAMN OCH ANVÄNDNINGSSOMRÅDE	1
SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING	1
TESTPRINCIP	1
MEDFÖLJANDE REAGENS OCH MATERIEL	2
NÖDVÄNDIGA TILLBEHÖR SOM EJ MEDFÖLJER.....	3
VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER	4
SÄKERHETSFÖRESKRIFTER	4
INFORMATION OM SÄKERHET OCH HÄLSORISKER	5
ANVÄNDNINGSFÖRESKRIFTER.....	6
REAGENSTILLVERKNING OCH FÖRVARING.....	7
PROVTAGNING OCH PROVHANTERING	9
CERVIXPROVER I STM.....	9
CERVIXPROVER I HOLOGIC PRESERVCYT-LÖSNING	9
TESTFÖRFARANDE.....	10
HÖGKAPACITETSTESTNING MED ANVÄNDNING AV RAPID CAPTURE-SYSTEMET	10
MANUELL METOD	10
DENATURERING	11
Prepareringsförfarande För Kalibratorer, Kvalitetskontroller Och STM-Prover	11
Prepareringsförfarande För Prover I PreservCyt-Lösning	12
Valfri Stoppunkt	15
HYBRIDISERING	16
HYBRIDINFÅNGNING.....	17
HYBRIDDETEKTION.....	17
TVÄTTNING	18
Metod Med Automatiserad Tvättapparat För Plattor	18
Metod Med Manuell Tvättning	18
SIGNALFÖRSTÄRKNING	19
KRITERIER FÖR VERIFIKATION AV ANALYSKALIBRERING.....	20
CUTOFF-BERÄKNING.....	21
KVALITETSKONTROLL	22
TOLKNING AV PROVRESULTAT	23
BEGRÄNSNINGAR I TESTFÖRFARANDET.....	24
FÖRVÄNTADE RESULTAT	25
PREVALENS	25
POSITIVA OCH NEGATIVA FÖRVÄNTADE VÄRDEN	25
FREKVENSFÖRDELNING: <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST RLU/CO-RESULTAT	25
PRESTANDAEGENSKAPER.....	26
RESULTAT FRÅN KLINISKA STUDIER PER PROV	26
REPRODUCERBARHET	30
PRECISION	31
Precision Med Prover I PreservCyt-Lösning	32
ANALYTISK KÄNSLIGHET	33
Andra Hänsyn Vid Prov I PreservCyt-Lösning	34
ANALYTISK SPECIFICITET	36
PROBERNAS HOMOLOGI TILL TOTALPLASMID OCH GENOM-DNA	38
EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I TRANSPORTMEDIUM FÖR PROVER.....	38
EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I PRESERVCYT-LÖSNING	39
PRECISIONEN VID CUTOFF FÖR <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST MED KLINISKA PROVER TAGNA I STM.....	40
HISTORISK INFORMATION	40
EKVIVALENS MELLAN PROVER I STM OCH PRESERVCYT-LÖSNING	41
REFERENSER.....	42

GUIDE FÖR PROBLEMLÖSNING	44
KONTAMINERINGSKONTROLL	49
KONTAKTINFORMATION	50
ÖVERSIKT ÖVER <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST	51

NAMN OCH ANVÄNDNINGSGOMRÅDE

digene HC2[®] GC-ID DNA Test som baseras på Hybrid Capture[®] 2 (HC2) teknik är en *in vitro*-nukleinsyrehybridiseringsanalys med signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikrotiterplatta för kvalitativ detektion av *Neisseria gonorrhoeae* DNA i cervixprover som tagits med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning [som består av en cervixborste och *digene* Specimen Transport Medium (STM)] och i cervixprover som tagits med *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (provtagningspinne och STM) eller prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp och lagts i Hologic PreservCyt[®]-lösning. *digene* HC2 GC-ID DNA Test är avsett för asymtomatiska eller symtomatiska kvinnor för att påvisa infektion med *Neisseria gonorrhoeae*.

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

För *in vitro*-diagnostisk användning IVD

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Neisseria gonorrhoeae är icke-rörliga, gramnegativa diplokker med ganska komplicerade krav för tillväxt. De är aerobiska och har optimal tillväxt inom temperaturintervallet 35-37 °C vid närvaro av 3-7 % CO₂ och en relativ fuktighet på ≥ 70 %. Presumtiv diagnos för *Neisseria gonorrhoeae* erhålls traditionellt genom att isolera organismer från odlingar av kliniska prover som gramfärgas för morfologisk undersökning. Slutgiltig diagnos kan erhållas med ett positivt oxidas- och/eller katalastest av odlingen. Resultaten kan vidare bekräftas med tester som inkluderar tester för nedbrytning av kolhydrat, agglutination och fermentering av socker. Mer avgörande inkluderar direkttester för *Neisseria gonorrhoeae* tester för detektion av antigen och nukleinsyraprobtester. En enzymänkad immunsorbent analys har visat sig lika känslig och specifik som gramfärgning för detektion av gonokocker i manlig urinledare och första portionen urin men har nedsatt känslighet när den används på endocervixprover.^{1,2} Pga. att detektionstestet med antigen kan korsreagera med kommensala *Neisseria* och relaterade arter³, kan detta test endast användas för en presumtiv diagnos.³

Tester med nukleinsyrehybridisering har nyligen använts för att bedöma kliniska prover för detektion av *Neisseria gonorrhoeae* i högriskpopulationer med prover tagna från endocervix och mannens urinledare.

TESTPRINCIP

Digene HC2 GC-ID DNA Test som använder *digene* hybridinfångning 2 teknik är en nukleinsyrehybridiseringsanalys med signalförstärkning och använder kemiluminescens på mikrotiterplatta för detektion. Prover som innehåller mål-DNA hybridiserar med en specifik GC 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 fosfatas-konjugerade antikroppar specifika 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 GC DNA i provet. Ett mätresultat av RLU som är mindre än den angivna kvoten för det positiva cutoff-värdet indikerar frånvaro av de GC- eller GC DNA-nivåer under analysens detektionsgräns.

GC-prob innehåller en probblandning som har valts speciellt så att korsreaktivitet med DNA-sekvenser från humanceller, andra bakteriearter eller *Neisseria*-arter förutom *Neisseria gonorrhoeae* elimineras eller minimeras. Den GC-prob som levereras med *digene* HC2 GC-ID DNA Test motsvarar ungefär 9 700

baspar eller 0,5 % av *Neisseria gonorrhoeae* genom-DNA ($1,9 \times 10^6$ baspar).⁴ En prob motsvarar till 100 % den kryptiska plasmiden på 4 200 baspar.

Hötkapacitetstestning med *digene* HC2 GC-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 GC-ID DNA Test köra upp till 352 prover på åtta timmar. För att möjliggöra hötkapacitetstestning 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 GC-ID DNA Test (REF 5140-1330). 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
GC-Prob PROBE GC GC-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
GC positiv kalibrator (PK) CAL GC + 1,0 pg/ml klonad GC-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 (kemiluminescenssubstrat).	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 GC-ID DNA-test och PreservCyt-prover)

digene provrörsställ och lock (tillval för manuell användning: (behövs när Rapid-Capture-systemet används med *digene* HC2 GC-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 provtagningsspinnar och *digene* Specimen Transport Medium™)^D

Dispenser för rörförseglingsfilm och avskärningsanordning (tillval, 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
Extra långa pipettspetsar för uttagning av prover
Provtagningsrör
Ställ för provtagningsrör
Skruvlock för provtagningsrör
Reagensbehållare för engångsbruk
DuraSeal® plastfilm för försegling

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/GC DNA Test kan erhållas från QIAGEN.

^B Behövs även för den halvautomatiska RCS-tillämpningen.

^C Kundens egen utrustning. Andra expanderbara multikanalspipetter kan användas förutsatt att ett spetsavstånd på 3,2 cm kan uppnås i expanderat läge. Alternativt kan en enkanalspipett med en pipetteringskapacitet på 75 µl användas.

^D Prestandaegenskaper för *digene* HC2 GC-ID DNA Test fastställdes med de nämnda provtagningssatserna.

^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.^{5,6,7,8} 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 som 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.^{9,10}
5. Dekontaminering och avfallshantering av prover, reagenser och annat potentiellt kontaminerat materiel ska ske enligt gällande nationella och lokala föreskrifter.^{11,12}

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-direktiven 2001/59/EG och 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. Enbart 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 GC-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 material 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 fosfat. Substanser som kan innehålla alkaliskt fosfat inkluderar detektionsreagens 1, bakterier, saliv, hår och oljor från huden. **Att den fångande mikrotiterplattan täcks efter tvättmomentet och under inkuberingen med detektionsreagens 2 är speciellt viktigt eftersom alkaliskt fosfat 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 pipettering 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. Multikanalspipettering för dispenseringen av detektionsreagens 1 och 2 (se *Hybriddetektion*) ska utföras med den omvända pipetteringstekniken. Kontrollera att varje pipettspets på multikanalspipetten är korrekt fäst 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, GC-probblandning och tvättbuffert.

Se användarhandboken till Rapid Capture-systemet för beredning av GC-probblandning, tvättbuffert, detektionsreagens 1 och detektionsreagens 2 då dessa instruktioner är specifika för 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. 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. Varning: Reagens för denaturering är frätande. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd. Var försiktig vid hanteringen.</p>																		
<p>GC-probblandning (beredd från GC-prob och spädningsvätska för probreagenser)</p>	<p>TILLVERKA UNDER INKUBATIONSDENATURERINGEN AV PROV: VIKTIGT: IBLAND FASTNAR PROBEN I FLASKANS LOCK. 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 GC-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 GC-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 användningstillfälle 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 rekommenderas 5 ml eller 15 ml rundbottnat polypropylenrör. För att bereda probblandning gör en spädning 1:25 av GC-prob i spädningsvätska för prob. <table border="1" data-bbox="552 1491 1266 1711"> <thead> <tr> <th>Antal tester/strips</th> <th>Volym spädningsvätska för prob*</th> <th>Probvolum*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 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>*Dessa värden inkluderar den rekommenderade extravolymer.</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 GC-probblandning och förvara i slutna behållare tills den ska användas. Oanvänd probblandning ska kasseras. 	Antal tester/strips	Volym spädningsvätska för prob*	Probvolum*	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Per brunn	0,045 ml	1,8 µl
Antal tester/strips	Volym spädningsvätska för prob*	Probvolum*																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
Per brunn	0,045 ml	1,8 µl																	

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 automatiserade tvättapparat för plattor. Se tabellen nedan för blandningsvolymen.</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 style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Volym av <u>tvättbuffertkoncentrat</u></th> <th style="text-align: center;">Mängd av destillerat eller avjoniserat <u>vatten</u></th> <th style="text-align: center;">Slutlig volym av <u>tvättbuffert</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1 933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2 900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">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 I.</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 <u>tvättbuffertkoncentrat</u>	Mängd av destillerat eller avjoniserat <u>vatten</u>	Slutlig volym av <u>tvättbuffert</u>	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 <u>tvättbuffertkoncentrat</u>	Mängd av destillerat eller avjoniserat <u>vatten</u>	Slutlig volym av <u>tvättbuffert</u>											
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											

Volymen för användningsfärdiga reagenser

Detektionsreagens 1 och detektionsreagens 2	<p>OMEDELBART FÖRE ANVÄNDNING:</p> <p>Blanda reagenserna ordentligt och <u>mät</u> 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 style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Antal <u>tester/strips</u></th> <th style="text-align: center;">Volym detectionsreagens <u>1 eller 2</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">flaskinnehåll</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 test</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Antal <u>tester/strips</u>	Volym detectionsreagens <u>1 eller 2</u>	96/12	flaskinnehåll	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 test	0,125 ml
Antal <u>tester/strips</u>	Volym detectionsreagens <u>1 eller 2</u>												
96/12	flaskinnehåll												
72/9	7,0 ml												
48/6	5,0 ml												
24/3	3,0 ml												
1 test	0,125 ml												

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* (Dacron 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 GC-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 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 antigen 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 i 2-8 °C baseras på egna tester av 90 simulerade kliniska prover. I dessa 90 prover ingick 40 som innehöll låga koncentrationer av GC-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 GC, men fem innehöll en hög nivå av CT-organismer. Analysens beräknade prestanda baseras på prover lagrade 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 15-30 °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 Hologic PreservCyt-lösning för att göra objektglas för Hologic ThinPrep® Pap-test kan användas för *digene HC2 GC-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 GC-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 GC-ID DNA Test kan utföras manuellt (enligt instruktionerna i denna bruksanvisning) eller med högkapacitetstestning med användning av Rapid Capture-systemet.

HÖGKAPACITETSTESTNING MED ANVÄNDNING AV RAPID CAPTURE-SYSTEMET

Rapid Capture System (RCS) är ett vanligt system för automatisk pipettering och spädning som kan användas med *digene* HC2 GC-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 GC-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 GC-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* 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 GC. 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 *digene* 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.¹³ Emellertid ska laboratoriepersonal 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 reagens för denaturering. Blandning efter tillsats av reagenset för denaturering är ett kritiskt steg: **Se till att MST Vortexer 2 är inställd på 100 (maximal hastighet) och att en synlig vätskevirvel som sköljer vätska över rörets hela inneryta kan ses under blandningen. Om blandning utförs manuellt försäkra dig om att varje kalibrатор, kvalitetskontroll och prov blandas individuellt genom att blanda var och en under minst fem sekunder med maximal hastighet så att vätskan sköljer rörets hela inneryta och sedan ska röret vändas upp och ned en gång.**

1. Tag av och kassera locken från kalibrатор-, 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 kalibrатор, kvalitetskontroll eller STM-prov med en repeterande eller justerbar pipett. Iakttag 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 laboratorieföreskrifter.**

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 nya, rena skruvlock för provtagningsrör på kalibrator-, kvalitetskontroll- och STM-provrör.
- 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.** Kalibratorena, kvalitetskontrollerna och proverna ska bli violetta.
5. Inkubera rören i provrörsstället i ett vattenbad med 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter (denaturerade kalibratörer, kvalitetskontroller och prover kan testas omedelbart. Kalibratörer och kvalitetskontroller kan förvaras vid 2-8 °C över natt, se under **Observera** ovan). För förvaring av prover, se *Valfri stoppunkt*. Bered GC-probblandning under denna inkubation. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*.

PREPARERINGSFÖRFARANDE FÖR PROVER I PRESERVICYT-LÖSNING

Observera:

- Se bruksanvisningen för *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 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.

Använd antingen reagenset för denaturering (DNR) som följer med *digene* HC2 GC-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

- 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.
- Hantera ett prov åt gången:
 - Skaka PreservCyt-flaskan kraftigt tills cellerna verkar vara jämnt spridda.
 - 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.
- Tillsätt lämplig volym Sample Conversion-buffert till varje rör (se tabell 1).
- Sätt på locket igen och blanda innehållet i varje rör noga med en vortexblandare med koppfäste.
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.
- Centrifugera rören i en svängrotor vid $2\,900 \pm 150 \times g$ i 15 ± 2 minuter.
- Bered under tiden *digene* STM/DNR-blandningen (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.

- 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.

- Blanda lösningen noga genom att använda vortexblandare.
- 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.
 - Hantera varje rör för sig:
 - Ta av locket och ställ åt sidan på en lågluddande pappershandduk.
 - Dekantera 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. Fortsätt 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 förseglingssfilm 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: 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-filmen 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:

- GC-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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, låt dessa tina vid $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ och blanda proverna ordentligt innan hybridisering påbörjas.
- Förvärm värmeblocket för mikrotiterplatta I till $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 kalibratörer, kvalitetskontroller och prover från vattenbadet efter inkubationen. Om MST Vortexer 2 används så ska hela stället med STM-prover 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 $75\text{ }\mu\text{l}$ 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 kalibratörer, 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. Denaturerade PreservCyt-prover kan förslutas med de ursprungliga locken.

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 $75\text{ }\mu\text{l}$ tas bort.**

4. När det sista provet har överförts **ska hybridiseringsmikrotiterplattan täckas med ett plattlock och inkuberas i tio minuter vid $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$.**
5. Alikvotera den beredda och ordentligt blandade probblandningen till reagensbehållare för engångsbruk. Pipettera försiktigt $25\text{ }\mu\text{l}$ av probblandningen till varje brunn som innehåller kalibratörer, kvalitetskontroller och prover med hjälp av en 8-kanalspipett och med nya spetsar för varje rad. Dispensera volymen av probblandning till varje hybridiseringsbrunn och undvik returstänk. Undvik att vidröra brunnarnas sidor.

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

6. Täck hybridiseringsmikrotiterplattan med ett plattlock. Skaka med roterande skak I som ställts in på $1100 \pm 100\text{ varv/min}$ under $3 \pm 2\text{ minuter}$. *Kalibratörer, kvalitetskontroller och prover ska bli gula efter skakning*. Brunnar som förblir violetta har kanske inte fått korrekt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare $25\text{ }\mu\text{l}$ probblandning till de prover som fortfarande är violetta och skaka igen. Testa om proverna om brunnarna förblir violetta efter denna procedur.
7. Inkubera i ett förvämt värmeblock för mikrotiterplatta I som är stabiliserat till $65 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ under $60 \pm 5\text{ minuter}$.

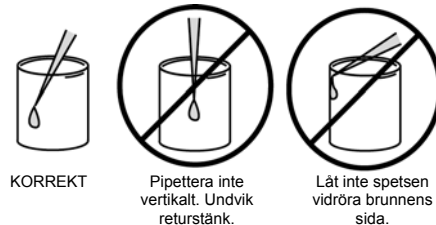
Observera:

- 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

1. Tag bort alla utom de behövliga antalet brunnar från den fångande mikrotiterplattans ram. Lägg tillbaka de oanvända mikrotiterplattbrunnarna i originalpåsen och försegla. Med en märkpenna 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*.
2. 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.
3. 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 diagram1).

DIAGRAM 1: KORREKT PIPETTERING



4. Täck mikrotiterplattan med plattlocket och skaka med roterande skak I med 1100 ± 100 v/min vid $20-25$ °C under 60 ± 5 minuter.
5. Under denna inkubation: Bered tvättbufferten och kontrollera, om tillämpligt, skölj- och avfallsbehållarna på automatiserad tvättapparat för plattor. Se avsnittet: *Reagenstillverkning och förvaring*.
6. När infångningssteget är fullständigt, tag bort den fångande mikrotiterplattan från den roterande skaken I och tag försiktigt bort plattlocket eller locket. Tag bort vätskan från brunnarna genom att hälla bort den i slasken. Vänd plattan helt upp och ned och skaka hårt med en nedåtgående rörelse och var försiktig så att det 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 reagenstillsättningens 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 mikrotiterbrunnarnas toppkant. Iakttag försiktighet så att mikrotiterbrunnarnas 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 spetsen 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 rutinemässigt att skölja systemet för rengöring. Se *bruksanvisningen till automatiserad tvättapparat för plattor* för ytterligare instruktioner när så behövs.

FÖRE VARJE ANVÄNDNING:

- Verifiera att tvättbehållaren är fylld till åtminstone 1 litersmärket med tvättbuffertlösning. 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 flöda 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 medför ökat bakgrundsbrus och kan ge falskt positiva resultat (pga. rester av alkaliskt fosfat). För att tillförsäkra effektiv tvättning med tvättapparaten så ska tvättapparaten 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 fosfat 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 konjugat 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 hällas 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 en QIAGEN-godkänd luminometer 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 analysens cutoff-värde. Kriterierna för verifikation beräknas automatiskt och verifieras som giltig eller ogiltig av *digene* analysprogram. *digene* HC2 GC-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 RLU 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 övriga 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 kalibratorm 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 övriga fall är verifikationen av analyskalibreringen 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 med beräkningen för cutoff. Om kvoten är $< 2,0$ eller > 20 **är analysens kalibreringsverifiering ogiltig och måste repeteras för alla patientprover för den analysen. Följaktligen ska resultaten från patientproverna inte rapporteras.**

Observera: För att bestämma kalibratorernas reproducerbarhet i *digene* HC2 GC-ID DNA Test så sammanställdes resultaten från digene luminometer 2000 för mikrotiterplattor (DML 2000) under interna studier som omfattade 62 analyser utförda med Rapid Capture-system och 43 analyser utförda med den manuella metoden (tabell 3). Resultaten visade att den positiva kalibratorns medelvärde för %CV för dessa 105 analyser var lika med eller lägre än 6,5 % och den negativa kalibratorns medelvärde för %CV var lika med eller lägre än 14,6 %. Såsom antyds av den negativa kalibratorns medelvärde på 43 RLU vid manuella analyser jämfört med RCS-tillämpningens medelvärde på 54 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 (standardavvikelse) av RLU-medelvärde för den negativa kalibratorm 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 kalibratorns 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 8,29 efter kalibrering. I detta fall är resultaten godtagbara

under förutsättning att NK RLU förblir ≤ 250 och att PK/NK-kvoten är $\geq 2,0$. Om NK RLU överskrider 250 eller PK/NK ligger under 2,0 eller över 20 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	Beräknade PK/NK-medelvärden				Testsatskvalitetskontroller	
		Medelvärde	Median	Min	Max	Medelvärde RLU/CO	
						KK CT	KK GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Manuell	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Metod	Kalibrator	Beräknade RLU-medelvärden				Medelvärde för beräknat
		Medelvärde	Median	Min	Max	%CV
RCS	Negativ	54	46	24	127	14,4
	Positiv	399	405	179	606	6,5
Manuell	Negativ	43	36	16	120	14,6
	Positiv	295	309	167	415	4,7

CUTOFF-BERÄKNING

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

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* analysprogram. 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* analysprogram.

KVALITETSKONTROLL

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

	KK CT	KK GC
Minimum RLU/CO	0	1,0
Maximum RLU/CO	0,9999	20,00
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 GC-ID DNA Test.
2. Detta kvalitetskontrollmateriel är inte detsamma som GC-organism i provmatrisen och fungerar inte som en lämplig kvalitetskontroll för *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 lysering och denaturering ska laboratorerna regelbundet bereda kontroller av provberedning genom att tillsätta ≥ 5000 CFU/ml (kolonibildande enheter/ml) av *Neisseria gonorrhoeae* (auxotyp 1, 5 eller typstam från ATCC) till ett nytt STM-rör. Inkubera provet åtminstone en timme vid rumstemperatur innan det testas på samma sätt som för kliniska prover. Ett RLU/CO $\geq 2,50$ ska uppnås om provet har behandlats korrekt. Alternativt så kan kommersiellt tillgängliga provtestpaneler som innehåller GC-organismer också användas för detta ändamål.
5. Acceptabla intervall för kalibratorer och kvalitetskontroller har endast fastställts för QIAGEN-godkända luminometrar. Den negativa kalibratoren och kvalitetskontroller reagerar endast för avsevärd reagensavvikelse och garanterar inte analysens noggrannhet.

TOLKNING AV PROVRESULTAT

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

1. Prover med RLU/CO-kvoter på $\geq 2,50$ anses "Positiva för *Neisseria gonorrhoeae* DNA." Någon slutsats angående organismers viabilitet och/eller infektivitet kan inte dras då mål-DNA kan närvara i frånvaro av viabla organismer.
 2. Prover med RLU/CO-kvoter $< 1,00$ innehåller inte *Neisseria gonorrhoeae* DNA eller innehåller DNA under analysens detektionsgräns. Dessa ska tolkas såsom "Ingen *Neisseria gonorrhoeae* DNA detekterad." Ett negativt resultat utesluter inte infektion med *Neisseria gonorrhoeae* då resultatet beror på tillfredsställande provtagning och tillräckligt med DNA för detektion.
 3. Prover med RLU/CO-kvoter på $\geq 1,00$ och $< 2,50$ anses tvetydiga. Resultaten kan anses som presumtvt positiva för *Neisseria gonorrhoeae* 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 för dessa RLU/Cutoff-värden.*
 4. Det rekommenderas att positiva resultat bekräftas med annan metod om det är sannolikt att infektion med *Neisseria gonorrhoeae* är osäker eller ifrågasatt när kliniska eller andra laboratoriedata bedöms. Analytiska studier med detta test har visat begränsad korsreaktivitet med vissa andra DNA-sekvenser som kan orsaka falskt positiva resultat. För ytterligare information se *Analytisk specificitet*.
- * Under den kliniska utvärderingen av *digene* HC2 GC-ID DNA Test bekräftades 3/17 resultat i denna tvetydiga grupp som positiva genom GC-odling, de kvarvarande 14 var uppenbarligen falskt positiva. I en följande utvärdering så hade fem prover ett initialt RLU/CO mellan 1,00 och 2,50 varav tre var positiva vid GC-odling. Upprepade duplikattester av dessa tre prover med *digene* HC2 GC-ID DNA Test gav resultatet $\geq 1,00$ RLU/CO. De två kvarvarande proverna var vid odling negativa och bägge var också negativa när *digene* HC2 GC-ID DNA Test upprepades två gånger.

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 GC-ID DNA Test, kvalitetskontroll och tolkningen av provresultat måste noggrant följas för att erhålla pålitliga testresultat.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test kan endast användas för cervixprover tagna med *digene* HC2 DNA-provtagningsanordning och placerade i STM, med cervixprover tagna *digene* Female Swab Specimen Collection Kit och placerade i STM eller prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp och lagts i Hologic PreservCyt-lösning.
- Resultatet av detta test ska endast tolkas tillsammans med tillgänglig information från klinisk utvärdering av patienten och från andra procedurer.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test ger kvalitativa resultat. Det numeriska värdet (kvoten) över det cutoff-värde som fastställts för patientprovet har inte visats korrelera till mängden GC DNA närvarande i patientprovet.
- Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten av infektion med *Neisseria gonorrhoeae* då detektion är beroende av antalet närvarande organismer i provet och påverkas av provtagningsmetod, patientfaktorer, infektionsstadium och/eller infekterande *Neisseria gonorrhoeae*-stam.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test är inte avsett för att bedöma behandlingsframgång.
- *digene* HC2 GC-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 plattvättapparater eller andra inställningar för plattvättapparater är inte godtagbara för användning med *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
- För att minimera variabiliteten av resultaten som erhålls med *digene* HC2 GC-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 GC-organismer eller GC DNA testas regelbundet i enlighet med laboratoriets procedurer för kvalitetssäkring.

FÖRVÄNTADE RESULTAT

PREVALENS

Prevalensen av prover positiva för *Neisseria gonorrhoeae* varierar beroende på populationens egenskaper såsom ålder, kön och riskfaktorer. Prevalensen av *Neisseria gonorrhoeae* som observerades i kliniska studier där *digene* HC2 GC-ID DNA Test användes var 1,1 % till 13,0 %. Prevalensen beräknades med antagandet att de 17 proverna med tvetydiga resultat i studien var positiva för GC DNA (tabell 4). Åtta av dessa 17 prover bekräftades som positiva genom GC-odling eller Polymerase Chain Reaction (PCR).

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

Testcenter	Antal positiva/antal testade	% prevalens
1	60/460	13,0
2	34/302	11,3
3	23/324	7,1
4	10/390	2,6
5	4/349	1,1
Totalt	131/1825	7,2

POSITIVA OCH NEGATIVA FÖRVÄNTADE VÄRDEN

De hypotetiska positiva och negativa förväntade värdena (PPV och NPV) för olika prevalensvärden för *digene* HC2 GC-ID DNA Test beräknades med hjälp av den totala känsligheten och specificiteten 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 92,6 % och specificitet 98,5 %) och tabell 6 visar det hypotetiska PPV och NPV för prover tagna med provtagningspinne (total känslighet 93,0 % och specificitet 98,8 %).

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

Prevalensvärde (%)	Känslighet (%)	Specificitet (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,6

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

Prevalensvärde (%)	Känslighet (%)	Specificitet (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

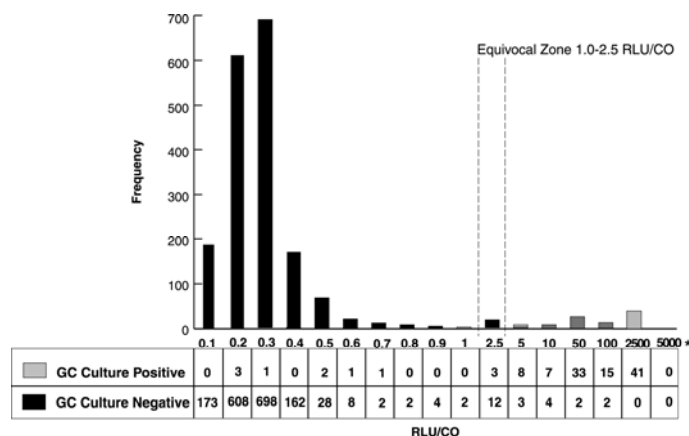
FREKVENSFÖRDELNING: *digene* HC2 GC-ID DNA TEST RLU/CO-RESULTAT

Distributionen av RLU/CO-kvoter för *digene* HC2 GC-ID DNA Test som erhöles under den kliniska multicenterstudien visas nedan (figur 1). Dessa data inkluderar alla prover som utfördes med *digene* HC2 GC-ID DNA Test och resultat från GC-odling fanns tillgängliga (antal = 1826). 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 RLU/CO-värden på \geq 1,00 och < 2,50 ansågs tvetydiga.

En klar separation av RLU/CO-kvoterna uppvisas mellan *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positiva resultat och *digene* HC2 GC-ID DNA Test-negativa resultat. 99 % (1676/1690) av *digene* HC2 GC-ID DNA Test-negativa resultat har RLU/CO-värden mellan ett RLU/CO-värde på 0,0 och 0,5. Fem (5/1690) av *digene* HC2 GC-ID DNA Test-negativa resultat gav ett RLU/CO mellan 0,6 och 0,8. Totalt så hamnade mindre än

en procent (< 0,9 %, 17/1825) av provresultaten i analysens tvetydiga zon av vilka 47 % (8/17) var positiva vid GC-odling eller PCR. 89 % (93/104) av *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positiva resultat har RLU/CO-värden mellan RLU/CO på 10-2500.

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



* Indikerar den övre delen av intervallet, inklusive det angivna värdet.

PRESTANDAEGENSKAPER

RESULTAT FRÅN KLINISKA STUDIER PER PROV

Prestandaegenskaper för *digene* HC2 GC-ID DNA Test fastställdes genom att jämföra analysresultaten med resultaten från gonorréodlingen Ettusenåttahundratjugofem (1825) patientprover från fem olika centra, inklusive STD-, familjeplanerings- och gynekologikliniker testades. PCR-test utfördes på prover som var positiva för *digene* HC2 GC-ID DNA Test men negativa för odling. Resultaten för *digene* HC2 GC-ID DNA Test påverkades INTE av PCR-testresultat och därför hade inte PCR någon inverkan på beräkningarna av prestandaegenskaper för *digene* HC2 GC-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.

Prestandaegenskaper för *digene* HC2 GC-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 GC-ID DNA Test variera i ert laboratorium beroende på fördelningen av värden som hamnar inom den tvetydiga zonen och de uppreade resultaten erhållna när återtest av presumtivt positiva (tvetydig zon) prover utförs. Som en gemensam utgångspunkt så var mindre än 0,9 % av de prover (17/1825), som testades under den kliniska multicenterstudien som användes för att fastställa prestandan för *digene* HC2 GC-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 noggrant bestämma om känsligheten och de positiva förväntade värdena för *digene* HC2 GC-ID DNA Test vid användning av *digene* Female Swab Specimen Collection Kit motsvarar känsligheten och de positiva förväntade värdena som observerades när proverna togs 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 GC DNA vara reducerad i denna delpopulation av patienter eller närhelst en provtagningspinne används för provtagning. Analysens beräknade prestanda baseras på prover förvarade i 2-8 °C eller frysta och testade inom 1-2 veckor efter provtagning.

Den kliniska känsligheten och specificiteten hos *digene* HC2 GC-ID DNA Test för att detektera de patienter med kliniskt aktiv infektion som kan överföras eller orsaka GC-relaterade följsjukdomar har inte fastställts i jämförelse med alla kommersiellt tillgängliga Nucleic Acid Amplification (NAA) metoder för

detektion av GC DNA. I kliniska studier visade test med en modifierad, kommersiell NAA-analys ett positivt resultat för vissa av *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positiva prover som erhöles från odlingsnegativa patienter. Uppskattad känslighet baseras på antalet positiva resultat med *digene* HC2 GC-ID DNA Test hos patienter som var odlingspositiva för *Neisseria gonorrhoeae*. Således kan känsligheten för *digene* HC2 GC-ID DNA Test endast härledas i förhållande till odlingspositiva som kan ha en känslighet på 60-85 %.

Tabell 7. digene HC2 GC-ID DNA Test kontra GC-odlingsresultat 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	<i>digene</i> HC2 GC- ID: Odling: Antal=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Känslighet	PPV	Specificitet	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Odling PCR ¹ +
Symtomatisk											
	1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00) 83,1-99,9	84,78 (92,68) 80,1-98,5	97,75 (99,04) 97,2-99,8	99,67 (99,35) 98,2-100	5/7 (2/3)
95 % KI											
	2	188	13	2	4	169	76,47 50,1-93,2	86,67 59,5-98,3	98,83 95,8-99,9	97,69 94,2-99,4	1/2
95 % KI											
	3	233	14	6 (3)	1	212 (215)	93,33 68,1-99,8	70,00 (82,35) 56,6-96,2	97,25 (98,62) 96,0-99,7	99,54 97,4-100	0 ³ /6
95 % KI											
	4	163	4	0	0	159	100,00 39,8-100	100,00 39,8-100	100,00 97,7-100	100,00 97,7-100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI											
	Alla	935	70 (69)	15 (8)	6 (7)	844 (851)	92,11 (90,79) 83,6-97,1	82,35 (89,61) 80,1-95,4	98,25 (99,07) 98,2-99,6	99,29 (99,18) 98,5-99,7	6³/15
95 % KI											
Asymtomatisk											
	1	101	10 (9)	2	0 (1)	89	100,00 (90,00) 69,2-100	83,33 (81,82) 51,6-97,9	97,80 92,3-99,7	100,00 (98,89) 95,9-100	2/2
95 % KI											
	2	12	2	0	0	10	100,00 15,8-100	100,00 15,8-100	100,00 69,2-100	100,00 69,2-100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI											
	3	84	1 (0)	0	0 (1)	83	100,00 (0,00) 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 95,7-100	100,00 (98,81) 95,7-100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI											
	4	226	4	2 (0)	1	219 (221)	80,00 28,4-99,5	66,67 (100,00) 39,8-100	99,10 (100,00) 98,3-100	99,55 97,5-100	1/2 (EJ TILLÄMPLIGT)
95 % KI											
	5	1	0	0	0	1	EJ TILLÄMPLIGT	EJ TILLÄMPLIGT	100,00 2,5-100	100,0 2,5-100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI											
	Alla	424	17 (15)	4 (2)	1 (3)	402 (404)	94,44 (83,33) 72,7-99,9	80,95 (88,24) 63,6-98,5	99,01 (99,51) 98,2-99,9	99,75 (99,26) 98,6-100	3/4 (2/2)
95 % KI											
ALLA											
	1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	98,00 (94,00) 89,4-100	84,48 (90,38) 79,0-96,8	97,76 (98,76) 97,1-99,6	99,75 (99,25) 98,6-100	7/9 (4/5)
95 % KI											
	2	200	15	2	4	179	78,95 54,4-94,0	88,24 63,6-98,5	98,90 96,1-99,9	97,81 94,5-99,4	1/2
95 % KI											
	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50) 69,8-99,8	71,43 (82,35) 56,6-96,2	98,01 (99,00) 97,1-99,8	99,66 (99,33) 98,1-100	0 ³ /6
95 % KI											
	4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89 51,8-99,7	80,00 (100,00) 63,1-100	99,47 (100,00) 99,0-100	99,74 98,5-100	1/2 (EJ TILLÄMPLIGT)
95 % KI											
	5	1	0	0	0	1	EJ TILLÄMPLIGT	EJ TILLÄMPLIGT	100,00 2,5-100	100,0 2,5-100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI											
	Alla	1359	87 (84)	19 (10)	7 (10)	1246 (1255)	92,55 (89,36) 85,3-97,0	82,08 (89,36) 81,3-94,8	98,50 (99,21) 98,6-99,6	99,44 (99,21) 98,9-99,8	9³/19
95 % KI											

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

2 Center nr. 5 hade inga borstprover från symtomatiska patienter.

3 I två fall gjordes ingen PCR.

N/A = Ej tillämpligt

Tabell 8. *digene* HC2 GC-ID DNA Test kontra GC-odlingsresultat 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 ²	<i>digene</i> HC2 GC- ID: Odling: Antal=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Känslighet	PPV	Specificitet	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Odling PCR ¹⁺
Symtomatisk										
1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18)	94,44 (91,18)	99,37 (99,06)	99,37 (98,44)	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						81,34-99,32	81,34-99,32	97,75-99,92	97,75-99,92	
2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86	86,67 (100)	97,44 (100)	98,70 (98,73)	0/2
95 % KI						66,1-99,8	75,3-100	95,4-100	93,2-100	
3	5	2	0	0	3	100	100	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						15,8-100	15,8-100	29,2-100	29,2-100	
5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	EJ TILLÄMPLIGT	0,00	98,15 (99,38)	100	1 ³ /3
95 % KI							2,5-100	96,6-100	97,7-100	
Alla	613	49 (46)	7 (4)	3 (6)	554 (557)	94,23 (88,46)	87,50 (92,00)	98,75 (99,29)	99,46 (98,93)	1³/5
95 % KI						84,05-98,79	75,93-94,82	97,45-99,50	98,43-99,89	
Asymtomatisk										
1	61	1	0	1	59	50,00	100	100	98,33	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						1,26-98,74	2,50-100	93,94-100	91,06-99,96	
2	10	2	0	0	8	100	100	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						15,8-100	15,8-100	63,1-100	63,1-100	
3	2	0	0	0	2	EJ TILLÄMPLIGT	EJ TILLÄMPLIGT	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI								15,8-100	15,8-100	
4	1	0	0	0	1	EJ TILLÄMPLIGT	EJ TILLÄMPLIGT	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI								2,5-100	2,5-100	
5	186	1	0	0	185	100	100	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						2,5-100	2,5-100	98,0-100	98,0-100	
Alla	260	4	0	1	255	80,00	100	100	99,61	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						28,36-99,49	39,76-100	98,56-100	97,84-99,99	
ALLA										
1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21)	87,50 (91,43)	98,67 (99,20)	99,20 (98,42)	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						78,62-98,34	73,20-95,81	96,93-99,57	97,68-99,83	
2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75	88,24 (100)	97,67 (100)	98,82 (98,85)	0/2
95 % KI						69,8-99,8	63,6-100	91,9-100	93,6-100	
3	7	2	0	0	5	100	100	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI						15,8-100	15,8-100	47,8-100	47,8-100	
4	1	0	0	0	1	EJ TILLÄMPLIGT	EJ TILLÄMPLIGT	100	100	EJ TILLÄMPLIGT
95 % KI								2,5-100	2,5-100	
5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100	25,00 (50,00)	99,14 (99,71)	100	1 ³ /3
95 % KI						2,5-100	1,3-98,7	98,4-100	98,9-100	
Alla	873	53 (50)	10 (4)	4 (7)	806 (812)	92,98 (87,72)	84,13 (92,59)	98,77 (99,51)	99,51 (92,59)	1³/5
95 % KI						83,00-98,05	72,74-92,12	97,76-99,41	98,74-99,87	

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

2 Center nr. 4 hade inga prover tagna med provtagningspinne från symtomatiska patienter.

3 I två fall gjordes ingen PCR.

N/A = Ej tillämpligt

EPRODUCERBARHET

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

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 100 % observerades för de 1152 förväntade positiva resultaten (1152/1152) och 100 % överensstämmelse observerades för de 288 förväntade negativa resultaten (288/288). Överensstämmelsen totalt var 100 % (1440/1440) med ett 95 % konfidensintervall på 99,7-100 och kappa = 1,00. 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 GC-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	% överens.	\bar{X} RLU/ CO	% överens.	\bar{X} RLU/ CO	Observerat/ förväntat	% överens.
1	2,5	100	2,1	100	2,7	100	2,6	100	2,5	144/144	100
2	4,8	100	4,2	100	5,0	100	5,2	100	4,8	144/144	100
3	29,4	100	23,3	100	30,1	100	30,4	100	28,3	144/144	100
4	51,5	100	43,0	100	52,1	100	54,1	100	50,2	144/144	100
5	2,5	100	2,0	100	2,5	100	2,5	100	2,4	144/144	100
6	4,7	100	3,5	100	4,9	100	4,8	100	4,5	144/144	100
7	14,0	100	10,6	100	13,9	100	14,1	100	13,2	144/144	100
8	16,7	100	12,7	100	17,4	100	18,2	100	16,3	144/144	100
9	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	143/144	100
TOTALT										1440/1440	100

En andra studie för färdighet/reproducerbarhet använde hela *Neisseria gonorrhoeae* (GC)-organismer tillsatta till en klinisk skenprovsmatrix av epitelceller utfördes vid tre externa centra. De 25 testade proverna innehöll representanter av negativa, låg- (vid eller nära detektionsgränsen) och medelpositiva med två GC-stammar, blandinfektioner med *Chlamydia trachomatis* (CT) 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 GC-ID DNA Test för 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. % överensstämmelse per center för *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Center	Observerat kontra förväntat	% överensstämmelse*
1	25/25	100 % (86,28 %-100 %)
2	25/25	100 % (86,28 %-100 %)
3	25/25	100 % (86,28 %-100 %)
Alla centra	75/75	100 % (95,20 %-100 %)

*Siffror inom parentes indikerar 95 % konfidensintervall.

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

Statistiskt mått	Center 1	Center 2	Center 3	Totalt
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 %)
Överens- stämmelse	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 tvetydiga proverna som visas i tabell 10, vilka alla innehöll låga koncentrationer av GC-organism ($\sim 5 \times 10^4$ organismer/ml), tolkas enligt avsnittet *Tolkning av resultat* i denna bruksanvisning såsom presumtivist positiva. Således har analysen visat en förmåga att detektera GC 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 presumtivist positiva) resultat för proverna i den panel som innehöll GC-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	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test-resultat		Förväntat resultat
	RLU/CO	Tolkning	
1	0,12	NEG	NEG
	10,45	POS	POS
	10,26	POS	POS
	9,74	POS	POS
	0,14	NEG	NEG
2	0,09	NEG	NEG
	9,31	POS	POS
	9,93	POS	POS
	9,69	POS	POS
	0,09	NEG	NEG
3	0,11	NEG	NEG
	11,00	POS	POS
	12,08	POS	POS
	9,45	POS	POS
	0,10	NEG	NEG
4	0,07	NEG	NEG
	8,54	POS	POS
	7,27	POS	POS
	8,09	POS	POS
	0,08	NEG	NEG

PRECISION

En precisionsstudie utfördes vid tre centra för att fastställa precisionen inom analyser och totalt för *digene* HC2 GC-ID DNA Test med en panel av positiva och negativa maskerade, simulerade kliniska prover. Dessutom utvärderades den observerade precisionen inom och mellan instrument för två olika luminometrar med samma panel. De två modellerna av luminometer inkluderade DML 2000-instrumentet, som är en av de luminometrar som rekommenderas för användning med *digene* HC2 CT/GC DNA Test, och MLX-luminometern, som inte längre finns. Den senare var en av de modeller som användes under den kliniska utvärderingen. En av de tre centra erfor svårigheter, med andra *digene* HC2 DNA-tester som utfördes som en del av denna studie, vilket tillskrevs analysteknik och troligen orsakades av felaktig eller otillräcklig utbildning. Fastän precisionstestet av *digene* HC2 GC-ID DNA Test inte påverkades så fick personen som utförde testet ånyo genomgå utbildning för korrekt analysteknik.

Tabell 13 visar prestandan för *digene* HC2 GC-ID DNA Test totalt för alla centra (inklusive det center som erfor tekniska problem innan den berörda personen fick omskolning i korrekt analysteknik). Analysen uppvisade likvärdig precision efter den berörda personens omskolning. Dock var de observerade RLU/CO-värdena för paneldel 3 (som innehöll låga koncentrationer av GC-organism) inom eller nära analysens tvetydiga zon 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. Även om det inte framgår av denna tabell så överensstämde de kvalitativa resultaten till 100 % (54/54) (93,4 %-100 % 95 %KI) med förväntade resultat vid de tre centra.

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

Panel-del	An-tal	Medel-värde	Instrument		Mellan instrument		Inom analys		Totalt	
			Standard avvikelse (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	0,0974	0,0104	10,6818	0,0017	1,7328	0,0275	28,2556	0,0275	28,1978
2	54	0,0967	0,0111	11,5031	0,0015	1,5618	0,0338	34,9362	0,0342	35,4230
3	54	3,2335	0,1502	4,6462	0,0356	1,0997	0,3520	10,8869	0,3866	11,9551
4	54	3,8407	0,2078	5,4092	0,0525	1,3671	0,3401	8,8541	0,3487	9,0802
5	54	16,1676	1,0507	6,4986	0,1122	0,6940	2,1788	13,4766	2,1437	13,2589
6	54	18,0704	1,0539	5,8321	0,3456	1,9124	2,3701	13,1158	2,3316	12,9027

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 GC-ID DNA Test vid användning av DML 2000-instrumentet. En sexdelars precisionspanel bereddes med en simulerad klinisk provmatris 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 och av två tekniker under loppet av fem dagar. En nyligen denaturerad panel användes för varje platta. Precisionsresultaten totalt för *digene* HC2 GC-ID DNA Test sammanställdes för alla fem dagars testning och visas i tabell 14. Fastän det inte framgår från dessa tabeller så överensstämde den kvalitativa tolkningen av resultaten till 100 % med förväntade resultat (120/120; 96,97 %-100 % 95 % KI), när RLU/CO på 1,0 användes.

Tabell 14. Total precision för *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

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

PRECISION MED PROVER I PRESERVICYT-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 GC (auxotyp 22; ATCC 27631) för att skapa en panel, se tabell 15.

Tabell 15. Precisionspanel med simulerade prover i PreservCyt-lösning för *digene* HC2 GC-ID DNA-testning.

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

*Proventifikationerna anger känd status för *Neisseria gonorrhoeae* [positivt (P) eller negativt (N)]

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

Tabell 16. Kvalitativa resultat av bulkprov – *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Bulkprovspool	GC-positivt n (%)	Tvetydigt n (%)	Negativt n (%)	Totalt
Negativt (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negativt (6N, 12N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Totalt negativt	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Lågt positivt (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Medelhögt positivt (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 17. Standardavvikelser (SD) och variationskoefficienter (CV) för precision uppdelat på laboratorium och dag: *digene* HC2 GC-ID DNA Test i PreservCyt-lösning

Prov	N	Medel-RLU/CO	SD inom serie	SD mellan serier	SD mellan dagar	SD mellan centra	SD totalt	%CV
Negativt (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negativt (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
Medelhögt GC-positivt (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
Lågt GC-positivt (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

*Negativa variationskomponenter sattes till noll.

ANALYTISK KÄNSLIGHET

Den analytiska känsligheten (detektionsgräns) för *digene* HC2 GC-ID DNA Test bestämdes genom att direkt testa en spädningsserie av en provpanel som bestod av 114 separata isolat av *Neisseria gonorrhoeae*. De 114 isolaten representerade 13 auxotyper, 5 serovarer, 10 antibiotikaresistenta stammar, 6 plasmidfria stamisolat och 2 icke-karaktäristiska diskordanta isolat från multicenterstudien. En fyrpunkts spädningsserie för var och en av isolaten testades en gång med *digene* HC2 GC-ID DNA Test för att etablera testets detektionsgränser. Detektionsgränsen för varje *Neisseria*-auxotyp visas i sammandrag i tabell 18. Den angivna detektionsgränsens intervall var spädningen för varje auxotyp som detekterades inom eller nära analysens tvetydiga zon 1,0-2,5 RLU/CO.

Den analytiska känsligheten för *digene* HC2 GC-ID DNA Test varierade från 25 till 50 000 CFU/analys (kolonibildande enheter/analys) för de 114 testade *Neisseria*-isolaten, inklusive auxotyper, serovarer, plasmidfria och antibiotikaresistenta stammar. Endast en av de sex plasmidfria stammarna och en av fem *Neisseria gonorrhoeae* IA-5-serovarer som testades detekterades vid 50 000 CFU/analys (kolonibildande enheter/analys) och ingen av de andra 112 isolaten detekterades vid koncentrationer överstigande 5 000 CFU/analys. Detektionsgränsens medelvärde för alla 114 isolat låg inom området 974 till 2 887 CFU/analys med hänsyn tagen till isolatspädningar som hamnade både inom analysens tvetydiga zon och över 2,5 RLU/CO. Det totala medelvärdet för detektionsgränsen var 1 931 CFU/analys ($3,8 \times 10^4$ CFU/ml). Kliniska prover som innehåller organismer vid eller nära detektionsgränsen kan behöva omtestas med ett alternativt testförfarande eller med ett nytt patientprov såsom anges i avsnittet *Tolkning av resultat* i denna bruksanvisning.

Tabell 18. Sammandrag av detektionsgränserna för känsligheten för GC-auxotyper, serovarer, plasmidfria och antibiotikaresistenta stammar

Auxotyp	Detekterbar koncentration	
	CFU/ml	CFU/analys
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 12	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 16	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 22	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 5	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 9	5 x 10 ⁴	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp 1AHU (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp Arg (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp AU (5 isolat)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp PAU (5 isolat)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp Pro (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> auxotyp Proto (5 isolat)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacin intermediär (Cipl) (5 isolat)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacin resistent (Cip R) (4 isolat)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> andra-5423	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> andra-5423	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolat)	10 ³ -10 ⁶	50 - 50 000
<i>N. gonorrhoeae</i> plasmidfria stammar(5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> serovar I A-1 eller IA-2 (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁶	500 - 50 000
<i>N. gonorrhoeae</i> serovar I A-5 (4 isolat)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> serovar I B-1 (5 isolat)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> serovar I B-4 eller IB-15 (5 isolat)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> spectinomycinresistent (SpecR)	10 ⁵	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 isolat)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG amerikansk (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG nederländsk (5 isolat)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> typstam	500-5000	25 - 250

ANDRA HÄNSYN VID PROV I PRESERV CYT-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 GC-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 GC-ID DNA Test. För att bedöma potentiell verkan av centrifugering på den analytiska känsligheten bereddes åttioåtta (88) par *Neisseria gonorrhoeae* DNA-negativa prover i STM och PreservCyt-lösning med lika mängder *Neisseria gonorrhoeae* (plasmidfri stam NRL 33151). De parade proverna testades och den analytiska känsligheten bedömdes genom jämförelse av de erhållna medelvärdena för RLU/CO [(PreservCyt:STM) x 100].

Tabell 19. Jämförelse av analytisk känslighet - *digene* HC2 GC-ID DNA Test - Parade prover i PreservCyt-lösning (PC) och STM.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Antal prover	88	88	-
Medel-RLU/CO	3,97	4,91	1,24
Median-RLU/CO	4,01	4,93	1,23
Standardavvikelse	0,34	1,00	-
Min RLU/CO	3,06	2,30	-
Max RLU/CO	4,77	7,10	-

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 GC-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 bereddades två alikvoter som behandlades så att cellpelletar bildades. Cellpelletarna återsuspenderades i fosfatbuffrad saltlösning (PBS). Alikvot A bereddades genom att den återsuspenderade pelleten tillsattes till STM och alikvot B genom att den återsuspenderade pelleten tillsattes till PreservCyt. Båda alikvoterna testades med *digene* HC2 GC-ID DNA Test med följande resultat:

Tabell 20. Jämförelse av analytisk känslighet - *digene* HC2 GC-ID DNA Test - Simulerade (kombinerade) patientprover i PreservCyt-lösning parade med STM.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Antal prover	10	10	-
Medel-RLU/CO	4,80	4,32	0,90
Median-RLU/CO	2,66	2,47	0,93
Standardavvikelse	5,44	5,08	-
Min RLU/CO	1,16	1,02	-
Max RLU/CO	18,97	17,26	-

ANALYTISK SPECIFICITET

Ett batteri med bakterier, virus, plasmider och humant cellmateriel eller blodprodukter som eventuellt kan finnas i den kvinnliga urogenitaltrakten testades för att utvärdera om korsreaktivitet med *digene* HC2 GC-ID DNA Test kan förekomma. Alla mikroorganismer testades med koncentrationer på 10^5 och 10^7 organismer eller CFU per ml och när så möjligt med 10^9 organismer eller CFU per ml om inte annat anges nedan. Renad DNA från virus och plasmider testades med ett antal olika koncentrationer som anges nedan.

Nedan är en lista på de bakterier som testades.

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

Koncentrationer som testades (organismer/ml eller CFU/ml för *Neisseria*-arter):

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

^b 2×10^5 , 2×10^7 och 2×10^8

^c 1×10^5 , 1×10^7 och 1×10^8

^d 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8

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

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

^g 2×10^7 , 2×10^8 och 2×10^9

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

ⁱ 1×10^5 och 1×10^6

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

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

Alla bakterier, förutom *Neisseria gonorrhoeae* som kan finnas i urogenitaltrakten, var negativa med *digene* HC2 GC-ID DNA Test med undantag för kommensala *Neisseria*-stammar och *Chlamydia psittaci*. Endast måttlig korsreaktivitet vilket kan tolkas som presumtivt positiv observerades med *Chlamydia psittaci* och *Neisseria lactamica*. Sådan korsreaktivitet ska inte ha någon inverkan på tolkningen av resultat för *digene* HC2 GC-ID DNA Test för urogenitala prover. Organismer som uppvisade korsreaktivitet till en viss grad är:

	Tolkning	Koncentration vid vilken korsreaktivitet observerades
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 av 2 isolat)	Presumtivt positivt*	1 x 10 ⁷ organismer/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 av 6 isolat)	Presumtivt positivt*	1 x 10 ⁹ CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (grupp Y, 1 av 2 isolat)	Positivt	1 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 av 6 isolat)	Positivt	5 x 10 ⁵ CFU/ml

* RLU/CO hamnade inom analysens tvetydiga zon på 1,00 till 2,50.

De tre kommensala *Neisseria*-stammarna *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis* och *Neisseria mucosa* förekommer i huvudsak i nasofarynx och de övre luftvägarna. De är sällan, om någonsin, isolerade från urogenitaltrakten.^{13,14} Vidare fastställdes att det korsreaktiva grupp Y *Neisseria meningitidis*-isolatet inte är lipopolysackarid-typbart och påträffas sällan hos allmänheten. *Chlamydia psittaci* kan påvisas på huden hos människor som arbetar med eller handhar fågelarter, men har inte påträffats i anogenitaltrakten.¹⁵

Vidare så var inte alla isolat av stammen i fråga korsreaktiv med *digene* HC2 GC-ID DNA Test vilket minskar sannolikheten för uppkomsten av falskt positiva resultat om den stammen är närvarande. T.ex. fem av sex *Neisseria lactamica*- eller *Neisseria mucosa*-isolat var testnegativa med *digene* HC2 GC-ID DNA Test och så var också fallet för en av de två *Chlamydia psittaci*-stammarna. Således kan man inte förvänta sig att korsreaktiviteten för *digene* HC2 GC-ID DNA Test som observerades med de tre kommensala *Neisseria*-stammarna och *Chlamydia psittaci* skulle ge en falsk klinisk tolkning av ett positivt resultat vid test av anogenitala prover.

Nedan är en lista på de virus-DNA, plasmid-DNA och humant cellmateriel eller blodprodukter som testades och vilka koncentrationer som testades:

Cytomegalovirus ^a	Humant papillomvirus typ 6 ^f
Epstein Barrvirus ^b	Humant papillomvirus typ 11 ^f
Hepatit B-tyt antigen-positivt serum ^c	Humant papillomvirus typ 16 ^f
Herpes simplex I ^d	Humant papillomvirus typ 18 ^f
Herpes simplex II ^d	pBR322 ⁱ
Humant immunbristvirus (HIV) ^{b,g}	SV40 ^j
Human genom-DNA ^e	PGEM [®] 3Z ⁱ
Human placenta-DNA ^e	PGEM [®] 3Zf(-) ^j
Humant helblod ^h	Humana epitelceller ^k

Testade koncentrationer:

^a 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁹ virala partiklar/ml

^b 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁸ virala partiklar/ml

^c 2,9 x 10⁸, 1,1 x 10⁹ virala partiklar/ml

^d 6,1 x 10⁶, 2,4 x 10⁷ virala partiklar/ml

^e 2,7 x 10², 1,1 x 10³ kopior/ml

^f 1,1 x 10⁸, 4,6 x 10⁸ virala partiklar/ml

^g 2 x 10⁶, 2 x 10⁷, 2 x 10⁸ virala partiklar/ml

^h 5 %, 10 %, 50 %

ⁱ 2,1 x 10⁸, 8,3 x 10⁸ kopior/ml

^j 1 ng/ml, 4 ng/ml

^k 1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ celler/ml

Ingen av de testade virus visade korsreaktivitet med *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Dock observerades korsreaktivitet med plasmiderna pBR322, pGEM[®] 3Z och pGEM[®] 3Zf(-). Alla övriga testade DNA-preparat inklusive human-DNA var negativa. Humanblod och epitelceller korsreagerade inte med *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Korsreaktivitet mellan pBR322 och *digene* HC2 GC-ID DNA Test är inte oväntad pga. det sätt GC-proben framställs. Närvaro av pBR322 homologa sekvenser har rapporterats i humangenitala prover och falskt positiva resultat kan inträffa vid närvaro av bakteriella plasmider i höga koncentrationer. Emellertid kunde inga av de 103 testade proverna från en klinisk multicenterstudie i USA som var positiva för *Neisseria gonorrhoeae* med *digene* HC2 GC-ID DNA Test identifieras som falskt positiva pga. korsreaktiva pBR322-sekvenser. Således synes sannolikheten av falskt positiva resultat för kliniska prover med *digene* HC2 GC-ID DNA Test orsakade av korsreaktivitet med homologa pBR322-sekvenser vara låg. Även om *digene* HC2 GC-ID DNA Test potentiellt kan korsreagera med *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM och åtskilliga kommensala *Neisseria*-arter så är sannolikheten för att dessa organismer påverkar tolkningen av testet avlägsen såsom visas av den kliniska multicenterstudiens resultat.

PROBERNAS HOMOLOGI TILL TOTALPLASMID OCH GENOM-DNA

Genom-proberna är homologa till ungefärligen 0,5 % av *Neisseria gonorrhoeae*-genom. En analys av varje prob i *digene* HC2 GC-ID DNA Test följer nedan:

Prob	Typ	Ungefär. insats storlek (bp)	% av genom
pGC1	Genomisk	6 400	0,34 %
pGC2		3 300	0,17 %
		9 700 (totalt)	0,51 %
pGC3	Kryptisk plasmid	4 200	Ej tillämp.*

*Detta representerar probens hela sekvens.

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 GC-ID DNA Test. Helblod och ett kommersiellt varumärke av sköljvätska, svampdödande kräm och preventivmedelsgel (substanser som vanligtvis kan finnas i cervixprover) tillsattes positiva prover (kliniska poolprover) i koncentrationer som kan påträffas i cervixprover (se tabell 21). Inga falskt positiva resultat observerades med något av de fyra substanserna oavsett koncentration. En studie av odefinierade substanser närvarande i en population av 100 negativa kliniska prover visade att odefinierade substanser inte verkar inhibera genereringen av en positiv signal inom *digene* HC2 GC-ID DNA Test jämfört med signalgenereringen vid testning för GC-organism i STM.

Tabell 21. Effekten av störande substanser på testresultat.

		<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test-resultat				Transportmedium för prover	
Substans	Konc.	Poolade kliniska prover				Positiva*	
		Negativa	Positiva*	RLU/CO	Observerade	RLU/CO	Observerade
Ingen (kontroll)		0,15	Ej tillämp.	3,41	EJ TILLÄMP.	2,70	EJ TILLÄMP.
Blod	1 %	0,21	+37 %	3,17	-7 %	3,21	+19 %
	5 %	0,19	+22 %	3,11	-9 %	3,05	+13 %
Sköljvätska	1 %	0,21	+37 %	3,48	+2 %	2,80	+4 %
	5 %	0,18	+20 %	3,47	+2 %	3,20	+18 %
Svampdödande kräm	1 %	0,19	+20 %	3,60	+5 %	2,95	+9 %
	5 %	0,20	+30 %	3,52	+3 %	3,09	+14 %
Preventivmedelsgel	1 %	0,08	-54 %	3,18	-7 %	2,98	+10 %
	5 %	0,08	-54 %	3,24	+5 %	3,10	+15 %

* Tillsatt med 10³ CFU/ml auxotyp 1 *Neisseria gonorrhoeae*-organism.

EFFEKTEN AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PROVER I PRESERVCYT-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 ett konverteringsförfarande (som beskrivs i bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion Kit) som gör att deras sammansättning blir jämförbar med STM-prover.

Rester av Sample Conversion-buffert (SCB)¹ kan vara närvarande i spårmängder i fullständigt konverterade prover i PreservCyt-lösning. En analytisk studie utfördes därför för att kontrollera den analytiska prestandan hos *digene* HC2 GC-ID DNA Test i närvaro av varierande mängder SCB. Varierande koncentrationer av GC DNA bereddes i STM. Större volymer SCB tillsattes sedan till proverna och tre aliquoter 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.

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.

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

Reproducerbarhet för *digene* HC2 GC-ID DNA Test med kliniska prover tagna i STM fastställdes i en studie med 30 kliniska pooler (15 positiva och 15 negativa) som bereddades 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 GC-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 22.

Tabell 22. Medelvärde RLU/CO med konfidensintervall och procentandel positiva med *digene* HC2 GC-ID DNA Test (medelvärdet RLU/CO i fallande ordning).

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

Prover med ett medelvärde av RLU/CO på 20 % eller mer över cutoff var positiva eller presumtvt positiva 97 % 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 GC-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 eller presumtvt positiva 69,4 % av tiden. De prover som låg under cutoff men inte med mer än 20 % förblev negativa 91,4 % av tiden.

Dessa resultat visar att *digene* HC2 GC-ID DNA Test ger reproducerbara resultat med kliniska prover som tagits i STM vars 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 GC-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 och frekvens av behovet för manuella omräkningar så sammanställdes resultaten från de kliniska utvärderingarna som berörde 79 analyser med *digene* HC2 GC-ID DNA Test i tabell 23. Resultaten visar att medelvärdet för %CV för dessa 79 analyser var 5,79 % och att ingen analys hade ett medelvärde för negativ kalibrator som översteg 150 RLU. Med hänsyn tagen till den positiva kalibrators alla tre replikat per analys så hade bara 1 av 79 analyser (1,3 %) en kalibratorreproducerbarhet större än 20 % CV, vilket krävde omräkning av %CV. Efter omräkningen förblev analysens %CV under 15 % vilket indikerar att alla analyser var giltiga.

Tabell 23. Prestanda för den positiva och negativa kalibratoren. Kombinerade data från den kliniska multicenterstudien och precisionsstudien. (Antal = 79 analyser)

Instrument	Antal analyser	Medel-värde S/N-kvot	Kalibratortyp	Medelvärde av beräknade RLU		Medelvärde för beräknade %CV	
				Tre replikat	Justerat för avvikande värde	Tre replikat	Justerat för avvikande värde
DML2000	9	7,71	Negativa	40,300	34,470	18,960	12,240
			Positiva	292,370	292,370	6,670	6,670
MLX*	70	4,52	Negativa	0,076	0,070	13,830	12,360
			Positiva	0,292	0,292	5,674	5,674

*Inte längre tillgänglig för användning.

EKVIVALENS MELLAN PROVER I STM OCH PRESERV CYT-LÖSNING

Ekvivalens mellan prover i STM och PreservCyt-lösning granskades i en klinisk utvärdering av 1252 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 GC-ID DNA Test. Resultatet av utvärderingen anges i tabell 24. 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 24. Sammanställning av statistiska data för överensstämmelse med *digene* HC2 GC-ID DNA Test mellan parade cervixprover tagna i STM och PreservCyt-lösning.

Kohort	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	0,96 0,92, 0,99	98,00 (49/50) 89,35, 99,95	99,75 (1181/1184) 99,26, 99,95	99,68 (1230/1234) 99,17, 99,91
Algoritm för omtestning* av osäkra data	0,93 0,88, 0,98	91,80 (56/61) 81,90, 97,28	99,75 (1188/1191) 99,27, 99,95	99,36 (1244/1252) 98,74, 99,72

*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 GC-ID DNA Test bedömdes som en del av en klinisk utvärdering för att demonstrera att ekvivalenta *digene* HC2 GC-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 25 nedan.

Tabell 25. Procentandel överensstämmelse i *digene* HC2 GC-ID DNA Test – per center

Center	Observerad kontra förväntad [†]	% överensstämmelse (95 % CI)
1	60/60	100 (94,04, 100)
2	60/60	100 (94,04, 100)
3	59/60	98,33 (91,06, 99,96)
Samtliga centra kombinerade	179/180	99,44 (96, 94, 99,99)

[†]20 delar x 3 dagar x 3 centra.

REFERENSER

- Roongpisuthipong A, Lewis JS, Kraus SJ, Morse SA. Gonococcal urethritis diagnosed from enzyme immunoassay of urine sediment. *Sex Transm Dis* 1988;15(4):192-5.
- Schachter J, McCormack WM, Smith RF, Parks RM, Bailey R, Ohlin AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhoea. *J Clin Microbiol* 1984;19(1):57-9.
- Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington,DC: ASM Press; 1995. p 324-40.
- Kingsbury DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* 1969 Jun;98(3):1400-1.
- U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
- Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
- World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
- 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.
- Centers for Disease Control. *Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings*. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.

10. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical laboratory waste management: approved guideline. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
12. U.S.Environmental Protection Agency. EPA guide for infectious waste management. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.
13. [Anonymous]. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
14. [Anonymous]. *Textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995.
15. Schachter J. Chlamydiae. in: Balows A, Hausler WJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 1991. p 1045-53.

GUIDE FÖR PROBLEMLÖSNING

<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST		
OBSERVATION	TROLIGA ORSAKER	LÖSNINGAR
Felaktig eller ingen färgförändring vid denaturering	Reagens för denaturering inte tillsatt eller reagens för denaturering inte korrekt tillverkat.	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.
	Provet 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.
Kvalitetskontroller ger felaktigt resultat	Felaktigt programvaruprotokoll valt för testet.	Om programvaruprotokollet är fel för det test som utförs ska plattan läsas igen inom 30 minuter från det att detektionsreagens 2 har tillsatts, men med rätt protokoll.
	Otillräcklig blandning av probblandning med denaturerad kalibrator, kvalitetskontroll och/eller prover.	Kör provet 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.	Bered GC-probblandning såsom beskrivs i avsnittet <i>Reagenstillverkning och förvaring</i> 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 ordentligt 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 denaturerade prover, täck hybridiseringsplattan 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 GC-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 bruksanvisningen under avsnittet Testförfarande, Hybridinfångning, steg 7. 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. 	Pipettera 75 µl av detektionsreagens 2 till varje brunn med en 8-kanalspipett. Inkubera vid 20-25 °C under 15 till 30 minuter.
	Fel på luminometer eller felprogrammering.	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"> Ljuskärl i luminometern. Förseglingen bruten. Dörren inte förseglad. 	Gör en bakgrundsavläsning (rådatamätning) på luminometern genom att läsa av en tom mikrotiterplatta. En avläsning på över 50 RLU tyder på att ljuskärl 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.	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 för automatiserad tvättapparat för plattor</i> för instruktioner om test för kontamination eller funktionsfel.

digene HC2 GC-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 pappershanddukar Fel typ av torkduk har använts.	Torka inte av igen med samma område på Kimtowels torkdukar eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar. Använd Kimtowels torkdukar eller likvärdiga lågluddande pappershanddukar
	Kvalitetskontrollmateriel för GC använt som positiv kalibrator. Analysen underkäns.	Se till att kalibratorer och kvalitetskontroller används rätt.
<p>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.</p>	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 GC-probhybridisering. Se bruksanvisningen till <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit för mer detaljer.
	Prob inte blandad ordentligt eller otillräckligt med prob tillsatt till analyser.	Bered probblandning såsom beskrivits. Blanda ordentligt och se till att en synlig virvel bildas. Probblandningar måste tillsättas brunnarna med en multikanalspipett eller repeterande pipett för att tillförsäkra en noggrann dispensering.
	Otillräcklig volym av spädd probblandning tillsatt till varje hybridiseringsbrunn på mikrotiterplattan.	Verifiera att 8-kanalspipetten dispenserar noggrant innan probblandning tillsätts hybridiseringsmikroplatta. 25 µl av probblandning ska tillsättas till det denaturerade provet i botten på varje brunn. Kontrollera att 8-kanalspipetten ger korrekt mängd innan probblandningen tillsätts till hybridiseringsbrunnarna. 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.
	<p>En rad positiva prover med ungefärligen samma RLU-värden</p>	Kontaminering av brunnar på fångande mikrotiterplatta under analysens utförande.
Kontaminering av detektionsreagens 2		Var försiktig så att reagentet inte kontamineras vid pipettering av detektionsreagens 2 in i brunnarna på fångande mikrotiterplatta. Undvik kontaminering av detektionsreagens 2 med aerosoler från detektionsreagens 1 eller med laboratoriedamm, osv.

digene HC2 GC-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 automatiserad tvättapparat för plattor</i>
Replikatens % CV-värden utspridda.	Pipettering inte noggrann (t.ex. luftblåsor, pipetten inte kalibrerad).	Kontrollera pipetten för att tillförsäkra att reproducerbara volymer dispenserar. Kalibrera pipetter rutinmässigt.
	Otillräcklig blandning.	Blanda ordentligt i alla moment. Blanda före och efter denatureringsinkubation och efter tillsats av probblandning. 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 GC -proben.	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 GC-probhybridisering.
	Samma område på Kimtowels torkdukar användes över flera rader.	Använd inte ett område på Kimtowels torkdukar mer än en gång.
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 alikvoterar 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 GC -proben.	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 GC-probhybridisering.

digene HC2 GC-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 GC-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. Kör testet igen 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 slangen 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 automatiserad tvättapparat för plattor, Dekontamineringsförfarande.

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 GC-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 Prepareringsförfarande för prover i PreservCyt-lösning)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%; border-right: none; text-align: center;">Manuell blandningsmetod</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">Metod med (MST) Vortexer 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="border-right: none; vertical-align: top;"> Gör en layout för plattan Märk hybridiseringsplattan Bered reagens för denaturering ↓ 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). ↓ Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg. ↓ Inkubera vid 20-25 °C under 45 ± 5 minuter. ↓ Bered GC-provblandning. ↓ ↓ ↓ </td> <td style="vertical-align: top;"> Gör en layout för plattan. Märk hybridiseringsplattan. Bered reagens för denaturering. ↓ Pipettera reagens för denaturering (volymen är ekvivalent med halva provvolymen) till kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. ↓ Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg. ↓ Täck stället med film och lock. ↓ Blanda under tio sekunder med maximal hastighet. ↓ Inkubera vid 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter. ↓ Bered GC-provblandning. ↓ ↓ </td> </tr> </tbody> </table>	Manuell blandningsmetod	Metod med (MST) Vortexer 2	Gör en layout för plattan Märk hybridiseringsplattan Bered reagens för denaturering ↓ 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). ↓ Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg. ↓ Inkubera vid 20-25 °C under 45 ± 5 minuter. ↓ Bered GC-provblandning. ↓ ↓ ↓	Gör en layout för plattan. Märk hybridiseringsplattan. Bered reagens för denaturering. ↓ Pipettera reagens för denaturering (volymen är ekvivalent med halva provvolymen) till kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. ↓ Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg. ↓ Täck stället med film och lock. ↓ Blanda under tio sekunder med maximal hastighet. ↓ Inkubera vid 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter. ↓ Bered GC-provblandning. ↓ ↓
Manuell blandningsmetod	Metod med (MST) Vortexer 2				
Gör en layout för plattan Märk hybridiseringsplattan Bered reagens för denaturering ↓ 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). ↓ Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg. ↓ Inkubera vid 20-25 °C under 45 ± 5 minuter. ↓ Bered GC-provblandning. ↓ ↓ ↓	Gör en layout för plattan. Märk hybridiseringsplattan. Bered reagens för denaturering. ↓ Pipettera reagens för denaturering (volymen är ekvivalent med halva provvolymen) till kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. ↓ Kontrollera att alla rören uppvisar en violett färg. ↓ Täck stället med film och lock. ↓ Blanda under tio sekunder med maximal hastighet. ↓ Inkubera vid 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter. ↓ Bered GC-provblandning. ↓ ↓				
Hybridisering	Blanda denaturerade prover ordentligt och pipettera därefter 75 µl av denaturerad kalibrator, kvalitetskontroll eller prov till brunnar på mikrotiterplattan. ↓ Inkubera i tio minuter vid 20-25 °C. ↓ Pipettera 25 µl GC-provblandning till mikrotiterplattans brunnar. ↓ Täck mikrotiterplattan med plattlocket 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> ↓ Inkubera vid 65 ± 2 °C i 60 ± 5 minuter. ↓ Bered fångande mikrotiterplatta. ↓				
Hybridinfångning	Överför innehållet från varje brunn på hybridiseringsplattan eller mikrorör till motsvarande brunn på fångande mikrotiterplattan med en 8-kanalspipett. ↓ Täck med ett plattlock. ↓ Skaka med 1100 ± 100 v/min vid 20-25 °C i 60 ± 5 minuter. Bered tvättbuffert. ↓ Dekantera och torka av fångande mikrotiterplatta (se denna bruksanvisning för detaljer). ↓				
Hybrid-detektion	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. ↓				
Tvättning	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%; border-right: none; text-align: center;">Metod för manuell tvättning</th> <th style="width: 50%; text-align: center;">Metod med automatisk tvättapparat för plattor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="border-right: none; vertical-align: top;"> Dekantera och torka av fångande mikrotiterplatta (se bipacksedeln för detaljer). ↓ Tvätta sex gånger. ↓ Torka av på lågluddande pappershanddukar ↓ </td> <td style="vertical-align: top;"> Lägg plattan på den automatiska tvättapparaten för plattor I och tryck på "START/STOP" för att starta. ↓ ↓ ↓ ↓ </td> </tr> </tbody> </table>	Metod för manuell tvättning	Metod med automatisk tvättapparat för plattor	Dekantera och torka av fångande mikrotiterplatta (se bipacksedeln för detaljer). ↓ Tvätta sex gånger. ↓ Torka av på lågluddande pappershanddukar ↓	Lägg plattan på den automatiska tvättapparaten för plattor I och tryck på "START/STOP" för att starta. ↓ ↓ ↓ ↓
Metod för manuell tvättning	Metod med automatisk tvättapparat för plattor				
Dekantera och torka av fångande mikrotiterplatta (se bipacksedeln för detaljer). ↓ Tvätta sex gånger. ↓ Torka av på lågluddande pappershanddukar ↓	Lägg plattan på den automatiska tvättapparaten för plattor I och tryck på "START/STOP" för att starta. ↓ ↓ ↓ ↓				
Signalförstärkning	Pipettera 75 µl av detektionsreagens 2 till varje brunn på fångande mikrotiterplatta. Täck med plattlock. Inkubera vid 20-25 °C i 15-30 minuter. ↓				
Avläsning	Läs av fångande mikrotiterplattan med en QIAGEN-godkänd luminometer. ↓ Validera analysen och tolka provernas resultat.				