

HC

Hybrid Capture[®] 2

GC-ID DNA Test

Návod k použití

Test DNA *digene*[®] HC2 GC-ID

Souprava pro chemiluminiscenční stanovení nukleové kyseliny *in vitro* hybridizačním testem s amplifikací signálu na mikrodestičce pro kvalitativní detekci *Neisseria gonorrhoeae* (GC) DNA v cervikálních vzorcích.

Pro použití se soupravami:

digene[®] HC2 DNA Collection Device

digene[®] Female Swab Specimen Collection Kit (souprava pro odběr vzorků)

Hologic PreservCyt[®] Solution

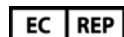
HLAVNÍ ZMĚNY OD PŘEDCHOZÍ REVIZE PŘÍBALOVÉHO LETÁKU

1. Aktualizovaná informace o obchodní značce výrobku
2. Odstraněny odkazy a údaje o reflexním testu.

Pouze pro profesionální použití vyškoleným a kvalifikovaným laboratorním personálem. Před použitím testovací soupravy si pozorně přečtěte následující pokyny.



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



QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

©2011 QIAGEN



CE Označení CE znamená, že DNA testovací souprava *digene* HC2 GC-ID splňuje požadavky směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/79/ES o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*.

IVD



REF 5140-1330

L2172CS Rev. 3

OBSAH

NÁZEV A POUŽITÍ	1
SOUHRN A VYSVĚTLENÍ	1
PRINCIP POSTUPU	1
ČINIDLA A MATERIÁLY DODANÉ V SOUPRAVĚ	3
POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY	4
VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ	5
BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ.....	5
BEZPEČNOST PRÁCE A OCHRANA ZDRAVÍ.....	6
BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PRO PRÁCI S TESTOVACÍ SADOU.....	7
PŘÍPRAVA A USKLADNĚNÍ ČINIDEL	8
ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY	10
CERVIKÁLNÍ VZORKY V STM (TRANSPORTNÍM MÉDIU)	10
CERVIKÁLNÍ VZORKY V HOLOGIC PRESERVCYT SOLUTION	11
POSTUP TESTU	11
TESTOVÁNÍ VELKÉHO POČTU VZORKŮ POMOCÍ ZAŘÍZENÍ RAPID CAPTURE SYSTEM	11
MANUÁLNÍ POSTUP	12
DENATURACE	13
Způsob přípravy kontrol kalibrátorů, kvality a vzorků STM	13
Postup přípravy vzorků pro PreservCyt Solution	15
Bod volitelného zastavení.....	18
HYBRIDIZACE	18
IMOBILIZACE HYBRIDU	19
DETEKCE HYBRIDU	20
PROMÝVÁNÍ	20
Promývání pomocí Automatické Promývačky Destiček	20
Manuální promývání	21
AMPLIFIKACE SIGNÁLU	22
OVĚŘOVACÍ KRITÉRIA PRO KALIBRACI ANALÝZY	22
VÝPOČET HRANICE POZITIVITY	24
KONTROLA KVALITY	25
INTERPRETACE VÝLEDKŮ VZORKŮ	25
OMEZENÍ METODY	26
PŘEDPOKLÁDANÉ VÝLEDKY	27
PREVALENCE.....	27
PREDIKTIVNÍ HODNOTA POZITIVNÍCH A NEGATIVNÍCH VÝLEDKŮ	27
DISTRIBUCE ČETNOSTI:VÝLEDKY RLU/CO U TESTU DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID	28
FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKA TESTU	29
VÝLEDKY KLINICKÉ STUDIE PODLE VZORKŮ	29
REPRODUKOVATELNOST METODY	32
PŘESNOST	34
Přesnost Se Vzorky PreservCyt	35
ANALYTICKÁ CITLIVOST	36
Další Faktory Týkající Se Vzorků PreservCyt Solution	37
ANALYTICKÁ SPECIFICITA	39
HOMOLOGIE SOND S PLAZMIDOVOU A GENOMOVOU DNA	41
VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY SUSPENDOVANÉ V TRANSPORTNÍM MÉDIU (STM)	41
VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY PRESERVCYT SOLUTION.....	42
PŘESNOST V HRANIČNÍ OBLASTI TESTU DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID PŘI ZPRACOVÁNÍ KLINICKÝCH VZORKŮ UCHOVANÝCH V SUSPENZI S TRANSPORTNÍM MÉDIEM	43

INFORMACE O HISTORII TESTŮ	44
EKVIVALENCE MEZI VZORKY STM A PRESERVCYT SOLUTION	44
POUŽITÁ LITERATURA	46
CHYBY A JEJICH ODSTRANĚNÍ.....	47
TESTOVÁNÍ NA KONTAMINACI.....	52
KONTAKTY NA SPOLEČNOST QIAGEN	53
SHRNUTÍ PRO TEST DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID.....	54

NÁZEV A POUŽITÍ

Testovací souprava *digene*[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) GC-ID DNA je souprava pro kvalitativní detekci DNA *Neisseria gonorrhoeae* DNA *in vitro* hybridizací nukleových kyselin chemiluminiscenční detekcí s amplifikací výstupního signálu na mikrodestičce v cervikálních vzorcích, odebraných pomocí souprav *digene* HC2 DNA Collection Device [skládají se z cervikálního kartáčku a transportního média *digene* Specimen Transport Medium (STM)] a *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (tampon a médium STM) nebo se vzorky odeberou pomocí kartáčku a vloží se do Hologic PreservCyt[®] Solution. Testovací souprava DNA *digene* HC2 GC-ID se používá pro ověření, zda jsou ženy s příznaky nebo bez příznaků nakaženy bakterií *Neisseria gonorrhoeae*.

Pokud bude třeba zpracovat velký počet vzorků v omezené době, test *digene* HC2 GC-ID DNA je možné použít v kombinaci se zařízením Rapid Capture[®] System (RCS).

Pro diagnostické použití *In Vitro* IVD

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Neisseria gonorrhoeae je nepohyblivý, gramnegativní diplokok s komplexními růstovými požadavky. Jsou aerobní a optimálního růstu dosahují při teplotě v rozmezí 35 - 37 °C za přítomnosti 3 - 7 % CO₂ a při relativní vlhkosti ≥ 70 %. Předběžná diagnóza *Neisseria gonorrhoeae* se tradičně stanovuje tak, že se izolují organismy z kultur klinických vzorků s použitím Gramova barvení pro morfologická zkoumání. Definitivní diagnóza může být stanovena pozitivním oxidázovým nebo katalázovým testem kultury. Další potvrzení výsledků zahrnuje testy degradace uhlohydrátů, aglutinace a fermentace cukrů. K určitějším, přímým testům na *Neisserii gonorrhoeae* patří detekce antigenů a testy pro hybridizaci sond s nukleovými kyselinami. Ukázalo se, že enzymové imunologické metody jsou je stejně citlivé a specifické jako Gramovo barvení pro detekci gonokoků v mužské močové trubici a ve vzorcích ranní moče, ale že se jejich citlivost snižuje při aplikaci na endocervikální vzorky.^{1,2} Protože test průkazu antigenů může křížově reagovat s komenzálním druhem *Neisseria* a příbuznými druhy³, je možné tento test používat jen pro předběžnou diagnózu.³

V poslední době se testy hybridizací nukleových kyselin používají pro detekci *Neisseria gonorrhoeae* u klinických vzorků odebraných od velmi ohrožených skupin obyvatelstva, přičemž se používají jak (endocervikální) vzorky z děložního hrdla u žen, tak i (uretrální) vzorky z močové trubice u mužů.

PRINCIP POSTUPU

V případě testu DNA *digene* HC2 GC-ID, s využitím metody pro imobilizaci hybridu [*digene* Hybrid Capture 2], se jedná se o hybridizační analýzu nukleové kyseliny s amplifikací signálu a s využitím chemiluminiscenční detekce na mikrodestičce. Vzorky obsahující cílovou DNA hybridizují se specifickou směsnou sondou GC RNA. Výsledné hybridy RNA:DNA jsou zachyceny na povrchu jamek mikrodestičky, která je potažena protilátkami specifických pro hybridy RNA:DNA. Zachycené hybridy následně reagují s protilátkami specifickými pro hybridy RNA:DNA konjugovanými s alkalickou fosfatázou, a jsou detekovány chemiluminiscenčním substrátem. Na každou protilátku je konjugováno několik molekul alkalické fosfatázy. Mnohonásobně konjugované protilátky se váží ke každému zachycenému hybridu, což vede k výrazné amplifikaci signálu. Substrát je štěpen konjugovanou alkalickou fosfatázou a dochází k vyzáření světla. Světelné kvantum je měřeno luminometrem a vyjádřeno v relativních světelných jednotkách (RLU). Na základě intenzity vyzářeného světla bude stanovena přítomnost či nepřítomnost cílová DNA ve vzorku.

Je-li naměřená hodnota RLU shodná či větší než stanovený rozsah pro hranici positivity (CO), bude to znamenat, že vzorek obsahuje GC DNA. Pokud bude hodnota RLU nižší než uvedený rozsah hranice positivity, bude to znamenat, že GC DNA není ve vzorku přítomna, nebo že úroveň GC DNA jsou pod detekčním limitem analýzy.

Sonda GC obsahuje směs zvolenou specificky tak, aby byla vyloučena nebo minimalizována zkřížená reakce se sekvencemi DNA z lidských buněk, s ostatními kmeny bakterií nebo s kmeny *Neisseria* odlišnými od *Neisseria gonorrhoeae*. Směsná sonda GC, která je součástí testovací soupravy DNA *digene* HC2 GC-ID, je komplementární s 9 700 bp neboli 0,5 % genomické DNA *Neisseria gonorrhoeae* ($1,9 \times 10^6$ bp).⁴ Jedna sonda je komplementární s 4 200 bp nebo-li 100 % kryptického plazmidu.

Velké objemy vzorků testovaných soupravou DNA *digene* HC2 GC-ID lze vyhodnocovat s využitím automatického systému pro pipetování a ředění, nazývaného Rapid Capture System. Pomocí tohoto zařízení, s nastavením pro test DNA *digene* HC2 GC-ID, je možné zpracovat až 352 vzorků za 8 hodin. Při zpracovávání velkého počtu vzorků v časově omezené době jsou všechny fáze analýzy, kromě denaturace vzorků, detekce chemiluminiscentního signálu a ohlášení výsledků, prováděny pomocí zařízení RCS.

ČINIDLA A MATERIÁLY DODANÉ V SOUPRAVĚ

S jednou testovací soupravou DNA *digene* HC2 GC-ID (REF 5140-1330) je možné provést 96 testů. Pokud jde o pacientky, počet výsledků se bude lišit v závislosti na tom, kolikrát se daná souprava použije.

- 1 použití = 88 výsledků pro vzorky pacientek
- 2 použití = 80 výsledků pro vzorky pacientek
- 3 použití = 72 výsledků pro vzorky pacientek
- 4 použití = 64 výsledků pro vzorky pacientek

Indikační barvivo INDIC obsahuje 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 0,35 ml
Denaturační činidlo* REAG DENAT zředěný roztok hydroxidu sodného (NaOH).	1 x 50 ml
Roztok k naředění sondy* DIL PROBE pufrovací roztok s 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 5 ml
GC sonda PROBE GC GC RNA sonda v pufrovacím roztoku.	1 x 200 µl
Negativní kalibrátor CAL - nosič DNA v médiu pro přenos vzorků (STM) s 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 2 ml
GC pozitivní kalibrátor (Positive Calibrator – PC) CAL GC + 1,0 pg/ml klonované GC DNA a nosič DNA v STM s 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 1 ml
CT kontrola kvality (QC CT) QC GC 5,0 pg/ml klonované CT DNA a nosič DNA v STM s 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 1 ml
GC kontrola kvality (QC GC) QC GC 5,0 pg/ml klonované GC DNA a nosič DNA v STM s 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 1 ml
Imobilizační mikrodestička PLATE CAPTURE potažená protilátkami hybridu RNA:DNA test.	1 pro každý test
Detekční činidlo 1 REAG DET 1 protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou na hybridy RNA:DNA v pufrovacím roztoku s 0,05 % (w/v) azidu sodného.	1 x 12 ml
Detekční činidlo 2 REAG DET 2 CDP-Star® s Emerald II (chemiluminescenční substrát).	1 x 12 ml
Koncentrovaný promývací pufr* BUF WASH X 30 obsahuje 1,5 % (w/v) azidu sodného.	1 x 100 ml

*Informace o zdravotních a bezpečnostních rizicích naleznete v části *Varování a preventivní opatření* této příbalové informace.

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

Systém pro imobilizaci hybridu *in vitro*, diagnostické zařízení a příslušenství^A

Systém *digene* Hybrid Capture 2 („systém *digene* HC2“), skládající se z luminometru, který je schválen společností QIAGEN („luminometr“), společností QIAGEN schváleného osobního počítače a periférií počítače (monitor, klávesnice, myš, tiskárna a kabel k tiskárně), softwaru systému *digene* HC2 („software analýzy *digene*“), softwaru testovacích protokolů *digene* HC2 System Assay Protocols pro CT/GC, softwaru LumiCheck Plate a uživatelské příručky k softwaru systému *digene* HC2.

Rotační třepačka Hybrid Capture System Rotary Shaker I
Mikrodestičkový inkubátor Hybrid Capture System
Microplate Heater I

Automatické promývací zařízení HCS Automated Plate Washer

Multivortex MST Vortexer 2 pro více vzorků [Multi-Specimen Tube (MST)]^B

stojan a víko na stojan (volitelné pro manuální použití; požadováno v případě použití systému Rapid Capture s testem DNA *digene* HC2 GC-ID a vzorky PreservCyt)

stojan *digene* pro vzorky a víko stojanu (volitelné pro manuální použití; požadováno v případě použití systému Rapid Capture s testem *digene* HC2 GC-ID a vzorků odebraných pomocí soupravy pro odběr vzorků *digene* HC2 DNA Collection Device)

4-kanálová pipeta s nastavitelnou roztečí EXPAND-4TM a stojan (volitelná položka)
digene HC2 DNA Collection Device^D

Odběrová souprava *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (skládající se ze 2 tamponů a transportního média *digene* Specimen Transport Medium)^D

Zásobník těsnící fólie pro zkumavky a řezačka (volitelná položka, používáno u MST Vortexer 2)

Rapid Capture[®] System (volitelná položka pro testování velkých objemů vzorků)^E

Mycí zařízení

Hybridizační mikrodestičky

Víčka na mikrodestičky

Prázdné stripy mikrodestiček (dodává Costar, Model #2581); volitelné pro použití s automatickou promývačkou mikrodestiček

Speciální dlouhé pipetové špičky pro pipetování vzorků

Zkumavky pro vzorky

Stojan pro odběrové zkumavky (pro umístění odběrových zkumavek)

Šroubovací uzávěry zkumavek pro odběr vzorků

Zásobník činidel na jedno použití

Těsnící fólie DuraSeal[®] na zkumavky

Běžná laboratorní zařízení a příslušenství

Vodní lázeň na 65 ±2 °C dostatečně velká, aby mohla pojmout buď jeden stojan (36 x 21 x 9 cm) nebo 2 stojany pro odběrové zkumavky *digene* Specimen Racks (každý 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)

Mikrocentrifuga (volitelná položka pro centrifugaci mikrozkumavek se sondami, aby se získal maximální objem sondy)

Vortexová míchačka s kalíškovým nástavcem

Jednokanálová mikropipeta; nastavitelná pro objemy 20-200 µl a 200-1000 µl

Opakovací pipeta (multistepper), jako je Eppendorf Repeater[®] Pipette či ekvivalentní zařízení

8-kanálová pipeta: nastavitelná na 200-1000 µl

Časový spínač

Roztok chlomanu sodného, 0,5 % finální koncentrace (nebo domácí bělicí prostředek)

Parafilm[®] nebo ekvivalentní výrobek

Špičky na jedno použití pro jednokanálovou pipetu s aerosolovým filtrem (20 až 200 µl a 200-1000 µl)

Špičky na jedno použití pro opakovací pipetu Eppendorf Repeater[®] (25 a 500 µl)

Špičky na jedno použití pro 8-kanálovou pipetu (25 až 200 µl)

Kimtowels[®] Wipers - tampóny na blotování nebo ekvivalentní papírové ubrusky neuvolňující vlákna

Ochranný přehoz laboratorního stolu na jedno použití

Rukavice bez mastku

5 ml nebo 15 ml polypropylenové zkumavky s kulatým dnem a víčkem (pro ředění sondy)

Polypropylenové zkumavky pro mikrocentrifugu 2,0 ml s uzávěry

Další zařízení a příslušenství nutné pro zpracování vzorků pomocí PreservCyt Solution g

Centrifuga s výkyvným rotorem schopná dosáhnout 2900 ± 150 x g a pojmout 10 ml nebo 15 ml kónické polypropylenové zkumavky pro centrifugu.

5 ml sérologické pipety nebo pipety na odebrání vzorků

Souprava pro zpracování vzorků *digene* HC2^A

Špičky na jedno použití pro opakovací pipetu Eppendorf Repeater[®] Pipette (50 a 100 µl)

Pro manuální vortexovací postup

Zkumavky na zpracování vzorků *digene* HC2 (15 ml, kónické), 10 ml kónické zkumavky Sarstedt s uzávěry nebo VWR nebo 15 ml polypropylenové zkumavky pro centrifugu s kónickým dnem značky Corning[®] s uzávěry
Stojan na 10 ml nebo 15 ml kónické zkumavky

Pro postup pro vortexování pomocí třepačky Vortexer 2 pro více vzorků

Zkumavky pro odběr vzorků *digene* HC2 (15 ml, kónické)^F
Třepačka MST Vortexer 2 pro více vzorků
Stojan a víko na stojan (určený pro 15 ml kónické zkumavky)
Zásobník těsnící fólie pro zkumavky a řezačka
Těsnící fólie DuraSeal[®] pro zkumavky (používáno u MST Vortexer 2)

^A Firma QIAGEN dodává pouze zařízení a příslušenství potvrzené jako vhodné pro DNA testy *digene* HC2 CT/GC. Obráťte se na místního zástupce firmy QIAGEN .

^B Rovněž nutné pro použití při provádění poloautomatické aplikace RCS.

^C Podle přání zákazníka. V případě potřeby je možné použít jiné vícekanálové pipetovací zařízení s nastavitelnou vzdáleností mezi špičkami, pokud lze dosáhnout vzdálenosti špiček 3,2 cm v rozloženém stavu. Jako alternativa může být použita jednokanálová pipeta, kterou lze pipetovat 75 µl.

^D Charakteristika účinnosti soupravy *digene* HC2 GC-ID DNA Test byla založena pouze na odběrech, provedených výše uvedenými odběrovými soupravami.

^E Viz *Příručka pro uživatele Rapid Capture System* pro specifické informace, týkající se využití tohoto systému pro zpracování velkých objemů vzorků.

^F Je nutné používat zkumavky pro odběr vzorků *digene* HC2 (značky VWR nebo Corning®) dodané firmou QIAGEN. Tak je zaručený řádný výsledek při vortexování pomocí třepačky Vortexer 2 pro více vzorků.

VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

PŘED POUŽITÍM TESTOVACÍ SADY SI POZORNĚ PŘEČTĚTE VŠECHNY POKYNY

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

VŠECHNY VZORKY je třeba považovat za potenciálně infekční. Pro provádění testu neexistuje žádná metoda, která by s jistotou zaručovala, že vzorky nepřenese infekci. Doporučujeme, aby se s lidskými vzorky zacházelo v souladu s příslušnými bezpečnostními směrnicemi platnými v daném státě či místě.^{5,6,7,8}

Tyto bezpečnostní směrnice se vztahují na materiály, které obsahují nebo mohou obsahovat infekční materiál. Tato preventivní opatření zahrnují (mimo jiné) následující body:

1. Nepipetujte ústy.
2. V prostorách, kde se zachází s činidly nebo se vzorky, se nesmí kouřit, jíst ani pít.
3. Při práci s činidly nebo se vzorky používejte gumové rukavice bez mastku na jedno použití. Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
4. Očistěte a desinfikujte všechna místa, kde došlo k rozlítí vzorků; k tomuto účelu použijte tuberkulocidní desinfekční činidlo jako je 0,5 % chlornan sodný či jiný vhodný desinfekční prostředek.^{9,10}
5. Asanujte a zlikvidujte všechny vzorky, činidla a jiné potenciálně kontaminované materiály, a to v souladu se směrnicemi platnými v daném státě/místě.^{11,12}

Některá činidla obsahují azid sodný. Bylo pozorováno, že azid sodný tvoří v laboratorním potrubí azid olovnatý nebo měďnatý. Tyto azidy mohou při nárazu, např. při úderu kladivem, explodovat. Aby se předešlo tvorbě olovnatého nebo měďnatého azidu, odpadní potrubí, do kterého vyléváte roztoky s azidem sodným, důkladně propláchněte vodou. Pokud jde o dekontaminaci starého odpadního potrubí, kde by se mohly vyskytovat akumulované azidy, Národní ústav pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci doporučuje: (1) pomocí gumové nebo plastické hadice odsajte ze sifonu výlevky kapalinu, (2) sifon naplňte roztokem 10 % hydroxidu sodného, (3) nechejte odstát po dobu 16 hodin a (4) důkladně propláchněte vodou.

BEZPEČNOST PRÁCE A OCHRANA ZDRAVÍ

Materiály uvedené níže byly posouzeny podle požadavků směrnic Evropského společenství (2001/59/ES a 99/45/ES).



T

Koncentrovaný promývací pufr. Obsahuje azid sodný: toxický (T)

R25: Při požití je toxický.

R52/53: Škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.

S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní prostředky pro oči a obličej.

S45: V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno ukažte toto označení).



C

Denaturační činidlo. Obsahuje hydroxid sodný: korozivní (C)

R35: Působí vážné poleptání.

S26: Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní prostředky pro oči a obličej.

S45: V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno ukažte toto označení).



Xi

Roztok k naředění sondy. Obsahuje BES a kyselinu octovou: dráždivý (Xi)

R36/38: Dráždí oči a kůži.

S26: Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní prostředky pro oči a obličej.

INFORMACE PRO PŘÍPAD NOUZE 24 HODIN DENNĚ


INFORMACE K PRVNÍ POMOCI V PŘÍPADĚ NOUZE V ANGLIČTINĚ, FRANCOUZŠTINĚ A NĚMČINĚ LZE ZÍSKAT 24 HODIN DENNĚ Z:

CENTRA JEDOVATÝCH LÁTEK, MAINZ, NĚMECKO


TEL: +49-6131-19240

Další varování a bezpečnostní opatření v souvislosti s použitím tohoto zařízení pro testování velkého počtu vzorků jsou uvedeny v *Uživatelské příručce pro zařízení Rapid Capture System*.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PRO PRÁCI S TESTOVACÍ SADOU

1. Používat výhradně pro diagnostiku *In Vitro*
2. Cervikální kartáček se nesmí používat u těhotných žen.
3. Nepoužívejte reakční činidla po uplynutí doby použití uvedené na štítku na krabičce vedle symbolu .
4. V případě nedodržení stanovených časových a teplotních rozmezí pro analýzu mohou být dosaženy neplatné výsledky. Analýzy, u kterých nebudou dodržena požadovaná časová a teplotní rozmezí, je třeba opakovat.
5. Spolehlivé výsledky budou dosaženy jedině tehdy, pokud bude striktně dodržen postup testu DNA *digene* HC2 GC-ID, ověřovací kritéria pro kalibraci stanovení, kontrola kvality a interpretace výsledků ze vzorků.
6. Je třeba odpipetovat přesné množství požadovaného činidla a po každém přidání činidla vše důkladně promísit. Nedodržení tohoto postupu by mohlo vést k chybným výsledkům testu. Pokud zjistíte, že došlo k požadované změně barvy, bude to znamenat, že tyto podmínky byly dodrženy.
7. Tyto komponenty byly přezkoušeny jako celek. **Nezaměňujte** jednotlivé komponenty s komponenty z jiných zdrojů nebo z jiných šarží.
8. Nukleové kyseliny jsou velmi citlivé na degradaci nukleázou z okolního prostředí. Nukleázy se vyskytují na lidské kůži a na povrchu věcí nebo na materiálech, kterých se dotýkali lidé. Povrch pracovního stolu očistěte a pokryjte ochranným krytem na jedno použití a **po celou dobu testu používejte gumové rukavice bez mastku**.
9. Dávejte pozor, aby během testu nedošlo ke kontaminaci imobilizační destičky a detekčního činidla 2 exogenní alkalickou fosfatázou. Alkalická fosfatáza může být obsažena v detekčním činidle 1, baktériích, slinách, vlasech a olejích kožního původu. **Přitom je velmi důležité zakrýt imobilizační destičku, a to po fázi promývání a během inkubace s detekčním činidlem 2, protože exogenní alkalická fosfatáza může reagovat s detekčním činidlem 2, v důsledku čehož by mohly být vykázány falešně pozitivní výsledky.**
10. Detekční činidlo 2 nesmí být delší dobu vystaveno přímému světlu. Činidlo použijte během uvedeného časového rámce, bezprostředně po odebrání alikvotního podílu a zabraňte přitom vystavení přímému slunečnímu světlu.
11. Než začnete dávkovat, opakovací pipetu několikrát naplňte činidlem. Pipetu pravidelně kontrolujte, zda se v ní netvoří větší vzduchové bubliny. Nadměrný počet velkých vzduchových bublin v opakovací pipetě může způsobit nepřesné dávkování. Předejít tomu lze tak, že se pipeta zcela naplní, a pak se úplně vypustí a znovu naplní. Podrobnější pokyny najdete v Návodu k použití pipety.
12. Detekční činidla 1 a 2 je třeba dávkovat pomocí vícekanálové pipety, a to reverzním způsobem (viz *Detekce hybridu*). Na vícekanálové pipetě zkontrolujte, zda je špička každé jednotlivé pipety dobře nasazena a zda je v pořádku plnění.
13. Během promývání dbejte na to, aby byly důkladně promyty všechny jamky mikrodestičky, jak je to popsáno v Pokynech pro manuální promývání. Pokud budou destičky nedostatečně vymyty, může být naměřena vyšší hodnota pozadí, což povede k falešně pozitivním výsledkům. Zbytky promývacího pufru v jamkách mohou mít za následek redukci signálu a špatnou reprodukovatelnost.
14. Pokud test začínáte za studena, Mikrodestičkový inkubátor I ponechte po dobu alespoň 60ti minut temperovat, aby bylo dosaženo teplotní rovnováhy $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud nebude ponechána dostatečná doba pro tento ohřev, mohlo by dojít k roztavení hybridizační mikrodestičky. Další informace viz Návod k použití mikrodestičkového inkubátoru I.

PŘÍPRAVA A USKLADNĚNÍ ČINIDEL

1. Soupravu ihned po dodání uskladněte při teplotě 2 - 8 °C. Koncentrovaný promývací pufr, denaturační činidlo a indikační barvivo je možné skladovat při teplotě 2 - 30 °C, podle potřeby.
2. Soupravu nepoužívejte po uplynutí doby použití uvedené na štítku krabice vedle symbolu , nebo po vypršení doby použití připravených činidel (viz níže).
3. Všechna dodaná činidla, kromě denaturačního činidla, směsi sondy GC a promývacího pufru, jsou připravena k bezprostřednímu použití.

Návod k přípravě směsi sondy GC, promývacího pufru, detekčního činidla 1 a detekčního činidla 2, pro testování velkého počtu vzorků v časově omezené době, najdete v *Uživatelské příručce pro Rapid Capture System (Systém rychlého zachycení)*.

Způsob přípravy činidel

Denaturační činidlo	<p>NEJPRVE PŘIPRAVTE:</p> <p>Do láhve s denaturačním činidlem přidejte 5 kapek indikačního barviva a důkladně promíchejte. Denaturační činidlo by mělo mít homogenní tmavě fialovou barvu.</p> <p>Takto připravené denaturační činidlo bude stabilní po dobu 3 měsíců, pokud bude uskladněno při teplotě 2 – 8 °C. Označte je štítkem s novou dobou použití. Jestliže činidlo ztrácí barvu, před použitím přidejte 3 kapky indikačního barviva a vše důkladně promíchejte.</p> <p>Pozor: Denaturační činidlo je korozivní. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní pomůcky pro oči a obličej. Při práci dbejte zvýšené opatrnosti.</p>																		
Směs sondy GC (připravená z sondy GC a činidel k naředění sondy)	<p>BĚHEM DENATURAČNÍ INKUBACE VZORKU PŘIPRAVTE:</p> <p>DŮLEŽITÉ: NĚKDY DOJDE K ZACHYCENÍ SONDY VE VÍČKU ZKUMAVKY.</p> <p>Poznámka: V této fázi věnujte zvýšenou opatrnost věnovat tomu, aby nedošlo ke kontaminaci sondy a směsi sondy RNázou. Pro pipetování sondy použijte pipetové špičky s aerosolovým filtrem. Roztok k naředění sondy je viskózní. Dbejte na to, abyste při přípravě směsi sondy GC zajistili důkladné promísení. Při promíchávání se na kapalině musí vytvořit viditelný vír (vortex). Nedostatečné promísení může mít za následek snížení signálu.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zkumavku se sondou GC krátce centrifugujte, aby se kapalina dostala na dno zkumavky. Zkumavku jemným poklepem promíchejte. • Odměřte požadované množství směsi sondy (25 µl/test). Doporučujeme připravit více směsí sond, aby se vykompenzovaly případné ztráty ve špičkách nebo na stěnách zkumavky. Viz navržené objemy v níže uvedeném seznamu. Pro každý test se doporučuje použít nejméně 24 jamek. Pokud bude na každý test použito méně než 24 jamek, celkový počet testů na jednu soupravu by se vzhledem k omezenému objemu sondy a roztoku k naředění sondy mohl zredukovat. • Požadované množství roztoku k naředění sondy přeneste do nové nádoby na jedno použití. Doporučujeme použít polypropylénové zkumavky s kulatým dnem a se snímatelným víčkem s objemem buď 5 ml nebo 15 ml, v závislosti na počtu testů. Směs sondy připravíte tak, že sondu GC zředíte roztokem ke zředění sondy v poměru 1:25. <table border="1" data-bbox="467 1606 1291 1806"> <thead> <tr> <th>Počet testů/pruhů (stripů)</th> <th>Objem roztoku k naředění sondy*</th> <th>Objem sondy*</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>na jamku</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*V těchto hodnotách je již zahrnutý objem pro dodatečné sondy.</p>	Počet testů/pruhů (stripů)	Objem roztoku k naředění sondy*	Objem sondy*	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	na jamku	0,045 ml	1,8 µl
Počet testů/pruhů (stripů)	Objem roztoku k naředění sondy*	Objem sondy*																	
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																	
na jamku	0,045 ml	1,8 µl																	

	<ul style="list-style-type: none"> • Sondu napipetujte do roztoku pro ředění sondy, a to tím způsobem, že špičku pipety opřete o vnitřní stěnu zkumavky a přímo nad meniskem vytlačíte obsah pipety. Dbejte na to, aby se špička pipety neponořila do roztoku pro zředění sondy. • Pomocí třepacího zařízení směs důkladně promíchejte (do víru) po dobu minimálně 5 vteřin při maximální rychlosti. Musí se vytvořit viditelný vír. Na zkumavky nalepte štítek s označením Směs sondy GC a do doby, než ji bude možné použít, ji uskladněte v uzavřené nádobce. Nepoužitou směs sondy je třeba zlikvidovat. 												
Promývací pufr	<p>BĚHEM IMOBILIZAČNÍ FÁZE PŘIPRAVTE:</p> <p>Promývací pufr pro použití v Automatické promývačce destiček je možné připravit podle návodu uvedeného níže, přičemž jej bude třeba uskladnit v uzavřené nádobě. Stejně tak je možné pokaždé připravit 1 l, kterým se naplní zásobníky automatické promývačky destiček I. Viz tabulka s objemy pro mísení uvedená níže:</p> <p>Další pokyny ohledně péče o zařízení a jeho údržby viz Návod k použití automatické promývačky destiček.</p> <p>Pozor: Koncentrát promývacího pufru je při požití toxický. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní pomůcky pro oči a obličej. Za účelem snížení nebezpečí zředte koncentrát promývacího pufru během jeho přípravy vodou.</p> <table border="1" data-bbox="430 724 1364 861"> <thead> <tr> <th><u>Množství koncentrovaného promývacího pufru</u></th> <th><u>Množství destilované nebo deionizované vody</u></th> <th><u>Výsledné množství promývacího pufru</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 L</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1.933,4 ml</td> <td>2 L</td> </tr> <tr> <td>100,0 ml</td> <td>2.900,0 ml</td> <td>3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p>Poznámka: Je velice důležité, abyste automatickou promývačku destiček nechávali neustále zapnutou, protože tak bude moci, vždy po osmi hodinách nečinnosti, dojít v rámci údržby k automatickému propláchnutí.</p> <p>Před každým testem se ujistěte, že odpadní zásobník promývačky je prázdný a že proplachovací zásobník je naplněn destilovanou nebo deionizovanou vodou.</p> <p>Další pokyny ohledně péče o zařízení a jeho údržby viz Návod k použití automatické promývačky destiček.</p> <p>Manuální promývání destiček:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Koncentrovaný promývací pufr dobře promíchejte. • Ke 100 ml koncentrovaného promývacího pufru přidejte 2,9 l destilované či deionizované vody a důkladně promíchejte (výsledné objem by měl být 3 l). • Uzavřete nádobu, aby nedošlo ke kontaminaci nebo vypařování. <p>Takto připravený promývací pufr bude při teplotě 2 - 30 °C stabilní po dobu tří měsíců. Označte jej štítkem s novou dobou použití. Pokud byl promývací pufr uskladněn v lednici, před použitím jej zahřejte na vyrovnávací teplotu 20 - 25 °C.</p> <p>Promývací přístroj a hadice doporučujeme jednou za tři měsíce vymýt 0,5 % roztokem chlornanu a důkladně vypláchnout destilovanou nebo deionizovanou vodou, aby se zabránilo možné kontaminaci alkalickou fosfatázou, kterou obsahují bakterie a plísně.</p>	<u>Množství koncentrovaného promývacího pufru</u>	<u>Množství destilované nebo deionizované vody</u>	<u>Výsledné množství promývacího pufru</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
<u>Množství koncentrovaného promývacího pufru</u>	<u>Množství destilované nebo deionizované vody</u>	<u>Výsledné množství promývacího pufru</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											

Objemy předem připravených činidel

Detekční činidla 1 a 2	BEZPROSTŘEDNĚ PŘED POUŽITÍM: Detekční činidlo 1 nebo 2 důkladně promíchejte a podle pokynů uvedených níže opatrně <u>odměřte</u> příslušné množství do čistého zásobníku určeného k tomuto účelu. Tato činidla NESMÍ BYT NIKDY nalita zpět do původních láhví, v opačném případě by hrozila kontaminace: Nepoužitý materiál zlikvidujte . Místo 8kanálové pipety je možné používat jinou vhodnou pipetu s opakovanou akcí. V takovém případě by měly být alikvotní podíly činidla nadávkovány do dostatečně veliké polypropylenové zkumavky, do které by se vešel požadovaný objem uvedený níže:											
	<table><thead><tr><th><u>Počet testů/pruhů (stripů)</u></th><th><u>Objem detekčního činidla 1 nebo 2</u></th></tr></thead><tbody><tr><td>96/12</td><td>Obsah láhve</td></tr><tr><td>72/9</td><td>7,0 ml</td></tr><tr><td>48/6</td><td>5,0 ml</td></tr><tr><td>24/3</td><td>3,0 ml</td></tr><tr><td>1 test</td><td>0,125 ml</td></tr></tbody></table>	<u>Počet testů/pruhů (stripů)</u>	<u>Objem detekčního činidla 1 nebo 2</u>	96/12	Obsah láhve	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 test
<u>Počet testů/pruhů (stripů)</u>	<u>Objem detekčního činidla 1 nebo 2</u>											
96/12	Obsah láhve											
72/9	7,0 ml											
48/6	5,0 ml											
24/3	3,0 ml											
1 test	0,125 ml											

ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY

Pro použití se soupravou *digene* HC2 GC-ID DNA Test jsou doporučeny výlučně cervikální vzorky, odebrané a transportované s použitím odběrové soupravy *digene* HC2 DNA Collection Device (skládající se z cervikálního kartáčku a transportního média *digene* Specimen Transport Medium) a odběrové soupravy *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (tampon a transportní médium) nebo vzorky odebrané pomocí kartáčku a umístěné v Hologic PreservCyt Solution. Vzorky, které byly odebrány s použitím jiného systému pro odběr vzorků nebo které byly přenášeny v jiných transportních médiích, nejsou způsobilé pro vyšetření tímto testem. Charakteristiky účinnosti této soupravy byly založeny pouze na těchto výše uvedených odběrových soupravách. Cervikální vzorky musí být odebrány před aplikací kyseliny octové nebo jódu, pokud bude prováděna kolposkopie. V Návodu k použití pro *digene* HC2 DNA Collection Device najdete další informace týkající se odběru vzorků a manipulace s nimi.

CERVIKÁLNÍ VZORKY V STM (TRANSPORTNÍM MÉDIU)

Vzorky STM mohou být skladovány do dvou týdnů při pokojové teplotě a odeslány bez zmrazení do testovací laboratoře. Vzorky by měly být odeslány v izolované nádobě, s použitím poštovní kurýrní služby pro zajištění dodávky do 2 dnů nebo přes noc. V testovací laboratoři by vzorky měly být uskladněny při 2-8 °C, pokud se stanovení provede do jednoho týdne. Pokud bude stanovení provedeno později než do týdne, skladujte vzorky při teplotě -20 °C po dobu 3 měsíců. Do transportního média pro vzorky *digene* STM byl přidán konzervační prostředek, aby se zpomalilo množení bakterií a aby se zachovala neporušená DNA. **Není záměrem** zachování životaschopnosti organismů nebo buněk. Vzorky odebrané do transportního média pro vzorky *digene* STM nelze použít pro kultivaci nebo jiné testovací metody.

Stabilita vzorků STM po dobu 2 týdnů při pokojové teplotě plus jeden týden navíc při teplotě 2 - 8 °C byla stanovena na základě testů na 90ti simulovaných klinických vzorcích prováděných v laboratorních podmínkách. Těchto 90 vzorků zahrnovalo 40 vzorků s nízkou koncentrací organismů GC [na hranici nebo kolem hranice detekce (LOD)], 35 středně pozitivních vzorků (přibližně 2-5x hranice detekce) a 5 vysoce pozitivních vzorků (více než 10x hranice detekce). Zbývajících 10 vzorků bylo negativních na GC, avšak 5 z nich obsahovalo velké množství organismů CT. Předpokládaná účinnost analýzy je stanovena za základě testů prováděných 1-2 týdny po odběru vzorků, které byly uskladněny při teplotě 2 - 8 °C nebo zamrazeny.

Poznámky:

1. Nedenaturovaná část každého z těchto 90 vzorků byla vystavena extrémním teplotám, se záměrem simulovat podmínky transportu zásilky (skladování při -20 °C po dobu 3 dnů, pak při teplotě 50 °C po dobu 5 dnů a následně další dva týdny při pokojové teplotě). I když byla po 8 dnech za těchto podmínek pozorována ztráta signálu (RLU/CO), nebyla ovlivněna kvalitativní interpretace výsledků. Po dalších dvou týdnech inkubace při pokojové teplotě byly pozorovány kvalitativní rozdíly u vzorků obsahujících nízké koncentrace organismu.
2. Aby se zabránilo uvolnění a odskakování víček na zkumavkách se vzorky, které jsou posílány nebo uskladněny zmrazené:
 - Překryjte před odesláním zkumavek se vzorky, které byly skladovány zmrazené, víčka fólií Parafilm®. Vzorky mohou být odeslány buď zmrazené nebo při teplotě 20 - 25 °C.
 - Při vyjmutí vzorků z mrazicího zařízení pro testování ihned nahradte víčka za šroubovací uzávěry pro zkumavky pro odběr vzorků.
3. Zařízení *digene* HC2 DNA Collection Device nesmí být používáno pro těhotné ženy. Provádějte odběry vzorků u těhotných žen pouze s použitím odběrové soupravy *digene* Female Swab Specimen Collection Kit.

CERVIKÁLNÍ VZORKY V HOLOGIC PRESERV CYT SOLUTION

Vzorky odebrané pomocí kartáčku a umístěné v Hologic PreservCyt Solution sloužící k přípravě Hologic ThinPrep® Pap Test slidů lze použít s testem DNA *digene* HC2 GC-ID. Vzorky by měly být odebrány rutinním způsobem a ThinPrep Pap Test slidy by měly být připraveny podle pokynů Hologic.

Vzorky PreservCyt Solution mohou být uchovávány při pokojové teplotě (20 - 25 °C) jeden měsíc po odběru a před zpracováním pomocí testu DNA *digene* HC2 GC-ID. Vzorky PreservCyt Solution se nesmí zmrazit. Návod ke zpracování těchto vzorků najdete v *Postupu přípravy vzorků PreservCyt*.

POSTUP TESTU

Vzorky mohou obsahovat infekční materiál, a podle toho s nimi musí být také nakládáno. Test DNA *digene* HC2 GC-ID je možné provádět manuálně (podle tohoto návodu k použití) nebo pomocí zařízení Rapid Capture System (v případě testování velkého počtu vzorků za omezenou dobu).

TESTOVÁNÍ VELKÉHO POČTU VZORKŮ POMOCÍ ZAŘÍZENÍ RAPID CAPTURE SYSTEM

Zařízení Rapid Capture System (RCS) je univerzální zařízení pro automatické pipetování a ředění, které je možné použít při provádění testu DNA *digene* HC2 GC-ID na velkém počtu vzorků. Pomocí tohoto zařízení je možné zpracovat až 352 vzorků za osm hodin, přičemž 3,5 hodiny uživatel nemusí do procesu nijak zasahovat. Za 13 hodin je možné vyhodnotit až 704 vzorků. Vzorky jsou, stejně tak jako v případě manuálního provádění testu *digene* HC2 GC-ID DNA (viz níže), v rámci přípravy před samotným testem denaturovány (nezávisle na RCS) v odběrové zkumavce, a to ještě před tím, než jsou umístěny do přístroje RCS. Jak u manuální metody, tak i metody RCS se navíc pomocí mikrodestičkového luminometru schváleného společností QIAGEN provede detekce chemiluminiscenčního signálu a vyhodnotí se výsledky. Jednotlivé fáze testu DNA *digene* HC2 GC-ID jsou prováděny v přesné sekvenci jako v případě manuálního postupu. Pomocí zařízení RCS je možné stupňovitě zpracovávat až 4 mikrodestičky, kde každá z těchto mikrodestiček obsahuje vzorky a kontroly kalibrátoru a kvality potřebné k dané analýze.

Pokud se rozhodnete pro metodu pomocí zařízení Rapid Capture System, přečtěte si kromě tohoto návodu k použití i Uživatelskou příručku pro zařízení Rapid Capture System, která se dodává společně se zařízením a ve které naleznete nezbytné procedurální a názorné informace.

MANUÁLNÍ POSTUP

Uspořádání pokusu

1. Pokud začínáte proces za studena, ponechte mikrodestičkový inkubátor I po dobu alespoň 60ti minut temperovat na rovnovážnou teplotu $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Další informace viz Návod k použití pro mikrodestičkový inkubátor I.
2. Ujistěte se, že teplota vodní lázně je 65 °C a že ve vodní lázni je dostatek vody na to, aby mohl být ponořen celý objem vzorku ve zkumavkách.
3. **Předtím, než začnete provádět analýzu**, vyndejte z lednice vzorky a **všechna** požadovaná činidla. Po dobu 15 až 30 minut je nechejte temperovat, aby dosáhly rovnovážné teploty $20 - 25\text{ °C}$.
4. Vytvořte rozmístění destiček za použití softwaru *digene* pro analýzu s pomocí protokolů testu *digene* pro GC. Podrobné informace naleznete v příslušném návodu k použití softwaru.
5. Pro každý test je třeba nově připravit negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a kontroly kvality. Kontroly kalibrátorů a kvality důkladně promíchejte. Pokud budete používat třepací zařízení Vortexer 2 určené pro zkumavky s více vzorky, odeberte z každé z nich $500\text{ }\mu\text{l}$ do prázdných a náležitě označených odběrových zkumavek. Případně můžete z každé odebrat $200\text{ }\mu\text{l}$ do náležitě označených polypropylenových zkumavek určených do mikrocentrifugy.
6. **NEJDŘÍVE musí být testován negativní kalibrátor a pozitivní kalibrátor** třikrát pro každou dávku testovaných vzorků. Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky se testují jednotlivě. Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky se musí testovat v konfiguraci ve sloupcích po 8 mikrojamkách tak, že replikáty negativního kalibrátoru (NC) jsou umístěny v pozicích A1, B1, C1; pozitivní kalibrátor (PC) v D1, E1, F1; QC CT v G1; QC GC v H1; vzorky jsou v pozicích počínaje A2. Viz příklad rozvržení níže. Nahlédněte do návodu k použití k příslušnému luminometru schválenému společností QIAGEN a návodu k použití příslušného softwaru k analýze *digene*, kde najdete správné umístění kontrol /kalibrátoru/kvality/vzorků.

PŘÍKLAD USPOŘÁDÁNÍ PRO TEST S 24 MIKROJAMKAMI:

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

DENATURACE

Poznámky:

- **Upozornění:** Denaturační činidlo je korozivní. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní pomůcky pro oči a obličej. Postupujte opatrně a při práci s činidly používejte ochranné gumové rukavice bez mastku.
- **Důležité:** Některé cervikální vzorky mohou obsahovat krev nebo jiný biologický materiál, který může po přidání denaturačního činidla překrývat barevné změny. U vzorků, které budou před přidáním denaturačního činidla zbarveny tmavě, může být v těchto fázích zaznamenána nesprávná barevná změna. Tato skutečnost, tedy že nebyla zaznamenána příslušná barevná změna, nebude mít vliv na výsledky analýzy. Zda došlo ke správnému smísení je možné ověřit na základě pozorování barevných změn u kontrol kalibrátorů a kvality.
- Během denaturační a hybridizační fáze se ujistěte, že ve vodní lázni je dostatečné množství vody, aby mohl být ponořen celý objem vzorku ve zkumavce.
- Vzorky je možné připravit během denaturační fáze a následně uskladnit při teplotě 2-8 °C přes noc, nebo při -20 °C po dobu do 3 měsíců. Maximálně mohou být provedeny 3 cykly zmrazení/rozmrazení, přičemž doba jednotlivých rozmrazení při pokojové teplotě nesmí přesáhnout 2 hodiny. Před použitím důkladně promíchejte.
- Kontroly kalibrátoru a kvality je možné připravit během denaturační fáze a následně uskladnit přes noc při teplotě 2 - 8 °C. **Nesmí se však zmrazit.** Pokud budou kontroly kalibrátoru a kvality zamrazeny, musí být zlikvidovány.
- Po denuraci a inkubaci nejsou již vzorky považovány za infekční.¹³ Laboratorní personál však musí i nadále dodržovat bezpečnostní opatření platná v daném státě/místě.

ZPŮSOB PŘÍPRAVY KONTROL KALIBRÁTORŮ, KVALITY A VZORKŮ STM

Poznámky:

- Neodstraňujte odběrový kartáček před denurací.
- Abyste se vyvarovali falešně pozitivních výsledků, je naprosto nezbytné, aby všechny materiály – kontrola kalibrátoru, kvality a vzorky – přišly do styku s denaturačním činidlem. Míchání po přidání denaturačního činidla je kritický krok: **Ujistěte se, že zařízení Multi-Specimen Tube Vortexer 2 (určené pro více zkumavek se vzorky) je nastaveno na hodnotu 100 (maximální rychlost) a že se během vortexování na hladině vytvořil okem pozorovatelný vír, a to takový, aby kapalina opláchla celý vnitřní povrch zkumavky. Jestliže provádíte vortexové míchání manuálně, ujistěte se, že každá kontrola kalibrátoru, kvality a vzorek je míchán individuálně do víru (vortex), každý nejméně po dobu 5 vteřin při nejvyšší rychlosti tak, že vír kapaliny smáčí celý vnitřní povrch zkumavky. Pak zkumavku jednou obraťte dnem vzhůru.**

1. Ze zkumavek s kontrolami kalibrátoru, kvality a STM vzorky sejměte víčka a zlikvidujte je.

Poznámka: Víčka odstraněná ze zkumavek se vzorky jsou považována za potenciálně infekční. Zlikvidujte je podle národních/místních předpisů.

2. Do každé kontroly kalibrátorů, kvality nebo vzorku STM napipetujte pomocí opakovací nebo nastavitelné pipety denaturační činidlo s indikátorovým barvivem. Dejte pozor, abyste se nedotkli stěn zkumavky – mohlo by dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků. Denaturační činidlo bude potřeba v takovém objemu, který se rovná polovině objemu vzorku. Přesné objemy pro jednotlivé typy kontroly kalibrátoru, kvality a vzorku jsou uvedeny v tabulce níže.

- **Předtím, než zbytek denaturačního činidla v lahvičce v souladu s platnými státními/místními laboratorními postupy zlikvidujete, tak jej zředťte.**

Kontrola kalibrátoru, kvality nebo vzorek	Požadované objemy denaturačního činidla
Negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a kontrola kvality, 200 µl	100 µl
Negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a kontrola kvality, 500 µl	250 µl
Cervikální vzorek, 1 ml	500 µl

3. Promíchejte vzorky za použití jedné ze dvou metod popsaných níže.

Poznámka:

Metoda s použitím třepacího zařízení pro více zkumavek najednou (Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2)

Poznámka: Vzorky QIAGEN promíchávané pomocí zařízení MST Vortexer 2 **se musí** hybridizovat za použití hybridizační mikrodestičky a metody inkubace Microplate Heater I. Pokud je to potřeba, další pokyny naleznete v návodu k použití k zařízení MST Vortexer 2.

- Zakryjte zkumavky kontrol kalibrátorů, kvality a STM vzorků fólií DuraSeal[®] tak, že přetáhnete fólii přes zkumavky ve stojanu.
- Umístěte víčko stojanu na zkumavky pokryté fólií a zajistěte ho zaklapnutím dvou postranních spon. Odřízněte fólii řezacím nástrojem.
- Umístěte stojan na MST Vortexer 2 a zajistěte jej sponou. Ověřte nastavení rychlosti na hodnotu 100 (maximální rychlost) a zapněte spínač vortexeru do polohy "zapnuto" ("ON"). Míchejte do víru po dobu 10 vteřin.

Manuální třepání do víru/třepání zkumavek jednotlivě

- U zkumavek s kontrolou kalibrátorů, kvality a vzorky STM vyměňte víčka za čisté šroubovací uzávěry určené pro zkumavky pro odběr vzorků.
- Obsah každé zkumavky důkladně promíchejte, a to jednotlivě, třepáním (do víru) při vysoké rychlosti po dobu 5ti vteřin.
- Každou zkumavku se vzorkem převraťte dnem vzhůru (jednou), aby se vymyl povrch vnitřní stěn zkumavky, uzávěr a okraj.
- Vraťte zkumavku do stojanu.

4. **Během třepání se na kapalině uvnitř každé zkumavky musí vytvořit viditelný vír, aby kapalina opláchla celý vnitřní povrch zkumavky**, a to bez ohledu na to, jakou metodu míchání (do víru) jste si zvolili. Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky by měly změnit barvu na tmavě fialovou.

5. Inkubace obsahu zkumavek probíhá ve stojanu umístěném ve vodní lázni při 65 ± 2 °C po 45 ± 5 minut (denaturované kontroly kalibrátorů, kvality a vzorky mohou být testovány okamžitě. Kontroly kalibrátoru a kvality lze uskladnit přes noc při teplotě 2 - 8 °C jak je popsáno výše v **Poznámkách**). Uskladnění vzorků, viz *Bod volitelného zastavení*. Během této inkubace připravte směs sondy GC. Viz oddíl *Příprava činidel a jejich uskladnění*.

POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO PRESERVICYT SOLUTION

Poznámky:

- Úplné podrobnosti najdete v návodu k použití k soupravě *digene* HC2 Sample Conversion Kit.
- Při manuálním testování stačí zpracování 4 ml dávky PreservCyt Solution pro dva testy. Minimální zpracovatelný objem je 4 ml. Podrobnosti k minimálnímu zbytkovému objemu naleznete v části „*Ekvivalence mezi vzorky digene STM a PreservCyt Solution*“.
- Vzorky PreservCyt Solution si připravte v dávkách 36 nebo menších; v opačném případě se pelety mohou uvolnit při dekantaci supernatantu. Je to důležité kvůli zachování integrity buněčné pelety během dekantace. Připravujete-li další lahvičky s PreservCyt Solution, nezačínajte je připravovat dříve, než dokončíte přípravu první dávky.

Použijte buď denaturační činidlo (DNR) dodávané s *digene* HC2 GC-ID DNA Test (viz *Příprava činidla a skladování*) nebo DNR dodávané se soupravou *digene* HC2 Sample Conversion Kit. DNR dodávané s *digene* HC2 Sample Conversion Kit připravíte tak, že do lahvičky DNR přidáte 3 kapky indikačního barviva a dobře zamícháte. Měl by vzniknout stejnorodý, tmavě fialový roztok. Požadavky na objem určíte podle Tabulky 1.

Tabulka 1. Požadavky na objem: Příprava činidla.

Počet testů	Objem PreservCyt Solution	Objem pufru
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Označte zkumavku na zpracování vzorků *digene* HC2, 10 ml kónickou zkumavku Sarstedt nebo 15 ml VWR nebo kónickou zkumavku značky Corning řádným identifikačním číslem vzorku.
2. Manipulace s jednotlivými vzorky:
 - a. Rukou silně zatřepejte lahvičkou PreservCyt, až se buňky homogenně rozptýlí.
 - b. Okamžitě, protože se buňky velice rychle usazují, napipetujte příslušné množství vzorku PreservCyt do označené zkumavky. Snažte se dostat roztok PreservCyt na dno kónické zkumavky a minimalizovat tak přilnutí buněčného materiálu ke vnitřní stěně zkumavky.
3. Do každé zkumavky přidejte příslušné množství pufru (viz Tabulka 1).
4. Všechny zkumavky uzavřete a pomocí vortexové míchačky s kalíškovým nástavcem dobře promíchejte.

Poznámka: Postup s třepačkou MST Vortexer 2 nebyl validován pro vzorky s PreservCyt Solution s puftrem před odstředováním a proto se v tomto kroku nesmí používat.
5. Zkumavky odstředujte v centrifuze s výkyvným rotorem při $2.900 \pm 150 \times g$ po dobu 15 ± 2 minuty.
6. Během odstředování si připravte směs transportního média (*digene* STM)/denaturačního činidla (STM/DNR) v poměru 2:1 (podle Tabulky 2).

Poznámka: Směs STM/DNR musíte připravit vždy čersvou v den testu.

- a. Celkové množství požadované směsi STM/DNR určíte tak, že vezmete počáteční množství vzorku pro PreservCyt Solution jako vodítko a poté vynásobíte objemy STM a DNR pro jednu zkumavku počtem zpracovávaných vzorků (viz Tabulka 2).

Tabulka 2. Požadavky na objem: STM/DNR.

Počet testů	Objem PreservCyt Solution	Objem STM pro jednu zkumavku pro koncovou směs STM/DNR*	Objem DNR pro jednu zkumavku pro koncovou směs STM/DNR*	Směs STM/DNR přidaná do zkumavky
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

* Objemy uvedené v těchto sloupcích se nesmí přímo přidávat do zkumavky se vzorkem.

- b. Důkladně roztok promíchejte vortexováním.
7. Zkumavky vyjměte po jedné z centrifugy a umístěte je na stojan. Na dně každé zkumavky by měla být růžová/oranžová peleta.
- Poznámka:** Vzorky, které po centrifugaci nemají viditelnou peletu, nejsou vhodné pro testování a měly by se zlikvidovat.
8. Manipulace s každou zkumavkou jednotlivě:
- Sejměte víčko a položte na papírový ubrousek bez vláken.
 - Opatrně slijte supernatant.
 - Držte zkumavku v obrácené pozici a jemně blotujte (asi 6 krát) na savých papírových ubrouscích bez vláken, až ze zkumavky neodkapává žádná kapalina. Pokaždé použijte čistou část ubrousku. Dávejte si pozor, aby při blotování **nevyklouzla** buněčná peleta ze zkumavky.
- Poznámky:**
- Neblotujte na jednom místě na savých papírových ubrouscích bez vláken více než jednou.
 - Je důležité, abyste blotováním odstranili co jak největší množství PreservCyt Solution. Nicméně je běžné, že i po blotování uvidíte zbytky PreservCyt Solution.
- d. Umístěte zkumavku na stojan.

Vortexování a Denaturace

Postup při manuálním vortexování

- Přidejte požadované množství STM/DNR ke každé peletě (viz Tabulka 2). Uzavřete každou zkumavku víčkem a znovu suspendujte pelety tak, že každou zkumavku budete zvlášť vortexovat alespoň 30 sekund za nejvyšší rychlosti. Je-li obtížné peletu znovu suspendovat, vortexujte dalších 10-30 s, nebo do doby, kdy se peleta uvolní ze dna zkumavky. Je-li i po dalším vortexování peleta nerozpuštěná (celkově maximálně 2 minuty), poznamenejte si identifikátor vzorku a přejděte k dalšímu kroku.
 - Umístěte zkumavky na stojan.
 - Vložte stojan na 15 ± 2 minuty do vodní lázně o teplotě 65 ± 2 °C. Ujistěte se o tom, že vodní hladina je dostatečně vysoko na to, aby v ní byla ponořena veškerá kapalina ve zkumavkách.
 - Vyjměte stojan se vzorky z vodní lázně a jednotlivě vortexujte vzorky po dobu 15 - 30 sekund.
- Poznámka:** Ujistěte se, že všechny pelety jsou v tomto okamžiku zcela resuspendovány. Vzorky, které stále mají viditelnou peletu, nejsou vhodné pro testování a měly by se zlikvidovat.
- Vložte opět stojan na 30 ± 3 minuty do vodní lázně o teplotě 65 ± 2 °C a pokračujte v denuraci.
 - Přejděte dále ke kroku *Hybridizace* nebo v případě uskladnění a nakládání s denaturovanými vzorky si přečtěte sekci *Bod volitelného zastavení*.

Postup při použití třepačky MST Vortexer 2 pro více vzorků

Poznámky:

- Postup s třepačkou MST Vortexer 2 je validován pro vzorky s PreservCyt Solution po odstředování a dekantaci supernatantu.
 - Pro zpracování vzorků s PreservCyt Solution je určena pouze třepačka MST Vortexer 2. Stojan a víko jsou zvlášť navrženy tak, aby pojmyly *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (VWR nebo 15 ml kónické zkumavky značky Corning). Uživatel by měl používat na stojanu v jednu chvíli pouze jeden typ zkumavky. Jiné značky nejsou pro použití validovány.
 - Je nutné přísně dodržovat určené časy vortexování stojanu s víkem.
 - Stojan s víkem nelze použít pro vortexování kontrol *digene* HC2 DNA Test kit, kalibrátorů nebo kontrol kvality. Výška zkumavek STM zabraňuje adekvátnímu vortexování pomocí stojanu s víkem.
1. Po blotování všech označených 15 ml kónických zkumavek umístěte zkumavky na stojan na jejich řádné pozice.
 2. Ke každé peletě přidejte příslušné množství směsi STM/DNR (viz Tabulka 2).
 3. Zakryjte kónické zkumavky fólií DuraSeal tak, že přetáhnete fólii přes zkumavky ve stojanu.
 4. Umístěte víko stojanu na zkumavky pokryté fólií a zajistěte ho zaklapnutím dvou postranních spon. Když bude víko pevně uchycené, odřízněte řezačkou fólii.
 5. Otočte červenou páčku tak, aby byla v horizontální pozici.
 6. Umístěte stojan a víko na třepačku MST Vortexer 2 tak, aby největší diagonální roh stojanu byl umístěný v pravém předním rohu. Umístěte stojan a víko na plošinu třepačky MST Vortexer 2 tak, aby byl pevně uchycen vodítky. Posunutím červené páčky do vertikální pozice upevněte stojan na místě. Tím bude stojan pevně uchycen.
 7. Ověřte si, že je rychlost nastavena na hodnotu 100 (maximální rychlost) a že přepínač impulzů je v pozici vypnuto (OFF).
 8. Zapněte spínač třepačky Vortexer do pozice zapnuto (ON). **Vortexujte po dobu 30 vteřin.**
 9. Otočte spínač třepačky Vortexer do pozice vypnuto (OFF).
 10. Zvedněte červenou páčku a vyjměte stojan a víko z třepačky MST Vortexer 2.
 11. Vložte stojan na 15 ± 2 minuty do vodní lázně o teplotě 65 ± 2 °C. Ujistěte se o tom, že vodní hladina je dostatečně vysoko na to, aby v ní byla ponořená veškerá kapalina ve zkumavkách.
 12. Po 15 minutové inkubaci vyjměte stojan se vzorky z vodní lázně.
 13. Před tím, než umístíte stojan na třepačku MST Vortexer 2, stojan osušte, abyste zabránili rozstříku.
 14. Upevněte stojan a víko na třepačku MST Vortexer 2 podle popisu v *kroku 6*.
 15. Ověřte nastavení rychlosti na hodnotu 100 a zapněte spínač vortexeru do polohy zapnuto (ON). **Vortexujte po dobu 1 minuty.**
 16. Otočte spínač třepačky Vortexer do pozice vypnuto (OFF).
Poznámka: Postup s třepačkou MST Vortexer 2 standardizuje rychlost míchání, čas a zpracování a eliminuje tak potřebu vizuálně kontrolovat buněčné pelety, jak to je nutné při manuálním postupu vortexování.
 17. Vložte opět stojan na 30 ± 3 minuty do vodní lázně o teplotě 65 ± 2 °C a pokračujte v denaturaci.
 18. Vyjměte stojan z vodní lázně, stojan osušte a upevněte do třepačky.
 19. Zapněte spínač třepačky Vortexer do pozice zapnuto (ON). **Vortexujte 10 vteřin při maximální rychlosti.**
 20. Otočte spínač třepačky Vortexer do pozice vypnuto (OFF). Vyjměte stojan.
 21. Okamžitě sejměte víko stojanu a těsnicí fólii zkumavky DuraSeal ze vzorků.

22. Přejděte k níže uvedenému kroku *Hybridizace* nebo v případě uskladnění a nakládání s denaturovanými vzorky přečtěte si sekci *Bod volitelného zastavení*.

BOD VOLITELNÉHO ZASTAVENÍ

Po denuraci mohou být vzorky STM a konvertované vzorky PreservCyt skladovány při teplotě 2 - 8 °C přes noc, nebo při -20 °C po dobu do 3 měsíců. V případě skladování v lednici přes noc můžete vzorky ponechat na stojanu uzavřené fólií DuraSeal a víkem stojanu. Před skladováním při -20 °C musíte odstranit víko stojanu a fólii DuraSeal a zkumavky musíte uzavřít víčky. V každém případě musí být vzorky vytemperovány na teplotu 20 – 25 °C a důkladně vortexovány předtím, než se přejde k *Hybridizačnímu kroku*.

Poznámka: Neskladujte ani nezasílejte denaturované vzorky na suchém ledě.

Maximálně mohou být provedeny 3 cykly zmrazení/rozmrazení s maximální dobou 2 hodin při pokojové teplotě během každého cyklu rozmrazení.

HYBRIDIZACE

Poznámky:

- Směs sondy GC je viskózní. Věnujte pozornost tomu, aby se zajistilo dokonalé smísení a aby do každé jamky hybridizační mikrodestičky bylo nadávkováno požadované množství směsi. Viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*.
- Pokud byl denaturovaný vzorek uskladněn při teplotě -20 °C, nechte jej roztát na teplotu 20-25 °C a před provedením hybridizace jej důkladně promíchejte (do víru).
- Mikrodestičkový inkubátor I nechejte před použitím po dobu alespoň 60 minut předeřhřát na teplotu 65 ± 2 °C. V případě potřeby podrobnější informace naleznete v *Návodu k použití mikrodestičkového inkubátoru I*.

1. Připravte si hybridizační mikrodestičku a označte ji.
2. Po inkubaci vyjměte kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky z vodní lázně. Je-li použit Multi-Specimen Tube Vortexer 2, promíchejte obsah celého stojanu vzorků STM do víru po dobu minimálně 5 vteřin při nastavení maximální rychlosti. V případě vzorků PreservCyt Solution vortexujte celý stojan po dobu minimálně 10 sekund při maximální rychlosti. Jinak můžete míchat každou zkumavku do víru jednotlivě, po dobu nejméně 5 vteřin.
3. Napipetujte 75 µl každé kontroly kalibrátoru, kvality nebo vzorku na **dno** prázdné jamky hybridizační mikrodestičky podle navrženého rozvržení destičky, uvedeného v *Rozvržení pokusu*. Nedotýkejte se stěn jamek a omezte možnost tvorby vzduchových bublinek. Použijte čistou dlouhou pipetovací špičku pro každý přenos, abyste zamezili zkřížené kontaminaci kontrol kalibrátoru, kvality nebo vzorků. V případě vzorků STM neodstraňujte odběrový kartáček z transportní zkumavky. Denaturované vzorky mohou být uzavřeny šroubovacími uzávěry pro zkumavky a uloženy s odběrovými kartáčky ponechanými ve zkumavkách. Denaturované vzorky PreservCyt mohou být uzavřeny původními víčky.

Poznámky:

- **Pokud nebudou alikvotní podíly vzorků přeneseny s náležitou péčí, mohou se vyskytnout falešně pozitivní výsledky. Dbejte na to, abyste se během přenosu vzorku, při odebrání alikvotního podílu 75µl, nedotkli špičkou pipety vnitřní stěny zkumavky.**
4. Po přenosu posledního vzorku zakryjte destičku víčkem a **nechejte hybridizační mikrodestičku inkubovat, a to po dobu 10ti minut při teplotě 20 - 25 °C.**

5. Přeneste připravenou a důkladně promísenou (třepáním do víru) směs sondy do zásobníku činidla na jedno použití. Pozorně napipetujte 25 µl směsi sond do každé jamky obsahující kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky pomocí 8-kanálové pipety a nových špiček pro každou řadu. Nadávkujte objem směsi sondy do každé hybridizační jamky; zabraňte zpětnému odstříku. Nedotýkejte se stěn jamek.

Poznámka: Pro výše uvedený krok použijte 8-kanálovou pipetu, která je vybavená 25 - 200 µl špičkami a může přenést 25 - 75 µl. Pro malé množství jamek použijte jednorázovou pipetu (se 25 - 200 µl špičkami) místo 8-kanálové pipety.

6. Hybridizační mikrodestičku zakryjte příslušným víčkem. Hybridizační destičku následně třepejte na rotační třepačce I, a to při rychlosti 100 ± 100 ot/min po dobu 3 ± 2 minuty. *Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky by měly po protřepání zežloutnout.* V těch jamkách, které zůstaly fialové, pravděpodobně nebylo odpovídající množství směsi sondy. Do těchto (fialových) vzorků přidejte dalších 25 µl směsi sondy a znovu je protřepejte. Pokud jamky zůstanou fialové i po této proceduře, vzorky testujte znovu.
7. Inkubace probíhá v mikrodestičkovém inkubátoru I, který byl předehřát a vytemperován na 65 ± 2 °C, po dobu 60 ± 5 minut před použitím.

Poznámky:

- Věnujte pozornost při umístění hybridizační mikrodestičky do mikrodestičkového inkubátoru I, aby nedošlo k rozstříku vzorků.
- Po protřepání by měly vzorky PreservCyt Solution zrudnout místo zežloutnout.

IMOBILIZACE HYBRIDU

1. Z imobilizační mikrodestičky odstraňte všechny přebytečné jamky (ponechte pouze počet potřebný pro daný test). Nepoužité mikrojamky vraťte to původního obalu a obal opět uzavřete. Pomocí značkovače očísľujte jednotlivé sloupce 1, 2, 3... a mikrodestičku označte příslušným identifikačním štítkem. Vzorky budou dávkovány do jamek podle příkladu uspořádání podle předem připravené šablony uložené pod heslem Uspořádání pokusu (*Setup*).
2. Z mikrodestičkového inkubátoru I opatrně vyjměte hybridizační mikrodestičku s kontrolami kalibrátoru, kvality a vzorky. Ihned sejměte víko destičky a umístěte ji na čisté místo.
3. Pomocí 8-kanálové pipety přeneste z jamek hybridizační mikrodestičky celý obsah (přibližně 100 µl) - sestávající z kontrol kalibrátorů, kvality a vzorků - na dno příslušných imobilizačních mikrojamek. Při přenosu použijte u 8-kanálové pipety pro každý sloupec nové pipetové špičky a každou špičku pipety nechte zcela vyprázdnit, aby byl zaručen úplný přenos vzorku. Pipetu můžete stabilizovat, a to tak, že **střední** část pipetových špiček opřete o horní okraj imobilizačních mikrojamek (viz nákres 1).

NÁKRES 1: SPRÁVNÉ PIPETOVÁNÍ



4. Zakryjte mikrodestičku víčkem a třepejte na rotační třepačce Rotary Shaker I při $1\ 100 \pm 100$ ot/min, při $20 - 25\ ^\circ\text{C}$ po dobu 60 ± 5 minut.
5. Během tohoto inkubačního procesu připravte promývací pufr a u automatické promývačky destiček případně zkontrolujte odpadní a výplachové zásobníky. Viz oddíl o přípravě a uskladnění činidel.
6. Po dokončení imobilizačního kroku vyjměte imobilizační mikrodestičku z třepačky Rotary Shaker I a opatrně sejměte víčko destičky. Odstraňte kapalinu z jamek vylitím do výlevky. Obraťte destičku nad výlevkou a silně ji vytřepejte pohybem směrem dolů tak, aby nedošlo ke zpětnému odstříkování v blízkosti dna výlevky. **Neobracejte destičku do původní polohy**; odstraňte zbytek kapaliny energickým oklepáním 2-3 krát na čisté tampóny Kimtowels® nebo na ekvivalentní papírové ubrousky neuvolňující vlákna (blotování). Ujistěte se o tom, že všechna kapalina byla z jamek odstraněna a že je vrchní část destičky suchá.

DETEKCE HYBRIDU

Poznámky:

- Činidlo na destičku přidávejte pomocí 8-kanálové pipety ve směru zleva doprava.
 - Doporučuje se použití reverzní pipetovací techniky, aby se zlepšila jednotnost dávkování činidla. Při tomto způsobu pipetování se pomocí druhé zarážky na ovladači pro nasávání/dávkování (na pístu) pipetové špičky nejprve přeplní. Viz postup popsán níže. Než začnete činidlo dávkovat na destičku, otřete špičky pipety o zásobník s činidlem nebo o papírový ubrousek, neuvolňující vlákna a odstraňte přebytečné činidlo.
 - Pipetu můžete stabilizovat, a to tak, že střední část pipetových špiček opřete o horní okraj imobilizačních mikrojamek. Dejte pozor, abyste se nedotkli stěn mikrojamek, mohlo by tak dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků. Viz nákres 1 uvedený výše.
1. Do zásobníku činidla nadávkujte příslušný alikvotní podíl detekčního činidla 1 (pokyny viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*). Pomocí 8-kanálové pipety opatrně napipetujte (reverzní pipetovací technikou, která je popsána níže) do každé jamky imobilizační mikrodestičky $75\ \mu\text{l}$ detekčního činidla 1.

Reverzní pipetovací metoda:

 - a) Na 8-kanálovou pipetu nasadte špičky a zkontrolujte, zda jsou všechny pevně usazeny.
 - b) Píst pipety zatlačte přes první zarážku ke druhé zarážce.
 - c) Ponořte špičky do roztoku detekčního činidla 1.
 - d) Pomalu uvolňujte píst, přičemž se do špiček nasaje roztok.
 - e) Roztok nadávkujte do mikrojamek ($75\ \mu\text{l}$), a to tak, že píst zatlačíte na první zarážku. Píst neuvolňujte, dokud špičky znovu neponoříte do roztoku detekčního činidla 1.
 - f) Znovu naplňte špičky a postup opakujte, dokud nebudou naplněny všechny jamky. Jamky mikrodestičky plňte ve směru zleva doprava. *Podle intenzity růžové barvy zkontrolujte, zda byly řádně naplněny všechny jamky. Všechny jamky by měly mít přibližně stejnou intenzitu.*
 2. Destičky zakryjte příslušným víčkem a po dobu 30 - 45 minut nechejte inkubovat při teplotě $20 - 25\ ^\circ\text{C}$.

PROMÝVÁNÍ

Promyjte imobilizační destičku za použití jedné z uvedených dvou metod.

PROMÝVÁNÍ POMOCÍ AUTOMATICKÉ PROMÝVAČKY DESTIČEK

Poznámka: Automatickou promývačku destiček nikdy nevypínejte. Zkontrolujte, zda je zásobník pro výplach naplněn a zda je odpadní zásobník prázdný. Automatická promývačka destiček se bude v rámci běžného čistícího režimu sama automaticky vyplachovat. Bude-li to vyžadovat situace, podrobnější informace naleznete v *Návodu k použití a údržbě automatické promývačky destiček*.

PŘED KAŽDÝM POUŽITÍM:

- Ověřte, zda je zásobník pro vyplachování naplněn minimálně ke značce 1 l roztokem promývacího pufu. Pokud tomu tak není, připravte roztok promývacího pufu. Viz oddíl *Příprava činidel a jejich uskladnění*.
 - Ověřte, že je vyplachovací zásobník naplněn destilovanou nebo demineralizovanou vodou.
 - Ověřte, že je odpadní zásobník prázdný a že uzávěr je bezpečně uzavřen.
 - Automatická promývačka destiček se automaticky sama poprvé naplní před každým nadávkováním a vypláchne se po každém promývání.
1. Odstraňte víčko destičky a umístěte destičku do automatické promývačky.
 2. Ověřte, že je přístroj zapnutý a že displej ukazuje „Digene Wash Ready” nebo „P1“.
Poznámka: Je-li použita jen část stripu imobilizačních jamek, bude potřeba doplnit před promýváním mikrodestičky celý sloupec prázdnými jamkami. Informace pro objednání jsou uvedeny v oddílu Příslušenství.
 3. Zvolte počet stripů, které mají být promyty, stisknutím „Rows” a pak pomocí „+” nebo „-” nastavte hodnotu. Stisknete „Rows” a displej se vrátí k „Digene Wash Ready” nebo „P1“.
 4. Stisknete „Start/Stop” pro začátek procesu.
 5. Automatická promývačka provede šest plnicích a odsávacích cyklů, což potrvá přibližně 10 minut. Potom následuje krátká přestávka v programu, je třeba počkat a nevyndat destičku předčasně. Když automatická promývačka destiček skončí promývání, displej ukazuje „Digene Wash Ready” nebo „P1“.
 6. Po skončení programu vyndejte mikrotitrační destičku z promývačky. Destička má být bílá a v mikrojamkách nemá zbývat žádná růžová kapalina.

MANUÁLNÍ PROMÝVÁNÍ

Poznámka: Nedostatečné promývání může způsobit zvýšení pozadí a falešně pozitivní výsledky (vzhledem k reziduální alkalické fosfatáze). Pro zajištění efektivního vymytí pomocí promývacího přístroje dohlédněte na to, aby byl promývací přístroj umístěn minimálně 61 cm a maximálně 91 nad promývací oblastí a aby během promývání byla deska umístěna mezi 61 a 91 cm pod promývacím přístrojem. Pokud je promývací přístroj v provozu, uzavírací kohoutek je třeba otočit do krajní polohy „open“ (*otevřeno*), a mimo provoz je třeba jej nastavit do polohy „off“ (*vypnuto*).

1. Z jamek odstraňte detekční činidlo 1, a to tak, že na destičku položíte čisté tampóny Kimtowels nebo ekvivalentní papírové ubrousky bez vláken a opatrně ji převrátíte. Předtím, než destičku obrátíte, se ujistěte, že papír je v kontaktu s celým povrchem destičky. Destičku nechte odkapat po dobu 1-2 minut a potom ji důkladně vysušte (blotujte) pomocí čistých tampónů Kimtowels nebo pomocí papírových ubrousků bez vláken (se srovnatelnými vlastnostmi). Použité papírové ubrousky náležitě zlikvidujte, aby v následujících fázích nedošlo ke kontaminaci alkalickou fosfatázou.
2. Destičku šestkrát ručně promyjte pomocí promývacího přístroje. Každá jamka je promyta tak, aby došlo k přetečení promývacího roztoku a aby tak bylo odstraněno detekční činidlo 1 z horního okraje jamek. Promývání začíná u jamky A1 a pokračuje esovitě ve směru doprava a dolů. Po naplnění všech jamek kapalinu rychlými pohyby směrem dolů slijte do výlevky. Druhé promývání začíná u jamky H12 a pokračuje esovitě směrem doleva a nahoru. Tyto 2 promývací fáze ještě dvakrát opakuje tak, aby každá jamka byla vymyta celkem šestkrát.

- Po promytí destičku vysušte (blotujte), a to tak, že ji obrátíte dnem vzhůru na čisté tampóny Kimtowels nebo na papírové ubrousky bez vláken (se srovnatelnými vlastnostmi) a silně na ni 3-4 krát poklepete. Podložte další papírové ubrousky a vysušení opakujte. Destičku ponechte otočenou dnem vzhůru a nechejte ji 5 minut odkapat. Potom ji ještě jednou vysušte.
- Destička by měla být bílá a v mikrojamkách by neměla zůstat žádná růžová kapalina.

AMPLIFIKACE SIGNÁLU

Poznámky:

- Při práci s detekčním činidlem 2 použijte nový pár rukavic bez mastku.
 - Do zásobníku pro činidlo nadávkujte **pouze** takový alikvotní podíl požadovaného činidla, jaký je potřeba k provedení testu, aby nedošlo ke kontaminaci detekčního činidla 2 v původní lahvičce. Viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*. **Detekční činidlo 2 nikdy nevracejte zpět do původní láhve. Nepoužitý materiál zlikvidujte.**
 - Detekční činidlo 2 je třeba přidat najednou (tj. bez přerušení). U všech jamek by měla být zajištěna pokud možno stejná inkubační doba.
 - Postupujte opatrně, nedotýkejte se stěn mikrojamek a zamezte rozstříku činidla, aby se nedostalo zpět na špičky, protože by mohlo dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků (viz náčrt 1).
- Pomocí 8-kanálové pipety opatrně napipetujte (reverzní pipetovací technikou, která je popsána výše) do každé jamky imobilizační mikrodestičky 75 μ l detekčního činidla 2. *Všechny mikrojamky by měly zežloutnout*. Podle intenzity barvy zkontrolujte, zda byly náležitě naplněny všechny jamky. Barva činidla by měla mít ve všech jamkách přibližně stejnou intenzitu.
 - Mikrodestičku zakryjte příslušným víčkem nebo čistou fólií Parafilm (nebo jinou fólií se srovnatelnými vlastnostmi), a po dobu 15 minut nechejte inkubovat při teplotě 20 - 25 °C. Chraňte před přímým slunečním zářením.
 - Po 15 minutách inkubace (a ne později než po 30 minutách inkubace) změřte hodnoty mikrodestičkovým luminometrem schváleném společností QIAGEN.
 - Příslušný software *digene* pro tento test zajistí vstup informací o výsledcích testu přímo do vyhodnocovacího počítačového programu.
 - Jestliže nebyla použita celá mikrodestička, odstraňte nepoužité mikrojamky z rámečku mikrodestičky, důkladně jej vypláchněte destilovanou či demineralizovanou vodou, vysušte a uschovejte pro příští stanovení.

OVĚŘOVACÍ KRITÉRIA PRO KALIBRACI ANALÝZY

Ověření kalibrace pro stanovení se provádí proto, aby se zajistila kontrola správné funkce činidel a dodaných materiálů pro kalibrátory a kontroly, a aby bylo zajištěno přesné stanovení hodnoty hranice pozitivita pro test. Pomocí softwaru *digene* pro příslušný test bude automaticky vypočítáno a vyhodnoceno, zda jsou ověřovací kritéria správná nebo nesprávná. V případě testu DNA *digene* HC2 GC-ID je třeba kalibraci provádět pro každý test zvlášť, a proto je nezbytné verifikovat každý jednotlivý test pomocí následujících kritérií. Smyslem této verifikace není nahradit test interní kontroly kvality.

1. Negativní kalibrátor

Negativní kalibrátor musí být pro každý zkušební test zařazena třikrát. U negativního kalibrátoru musí být dosažena průměrná hodnota ≥ 10 a ≤ 150 RLU (*relativních světelných jednotek*), jinak nebude možné v testu pokračovat. U replikátů negativního kalibrátoru by měl být zaznamenán variační koeficient (% CV) ≤ 25 %. Pokud bude variační koeficient > 25 %, program automaticky vyřadí replikát s tou hodnotou RLU, která se bude nejvíce lišit od průměrné hodnoty, jakožto « ležící mimo rozsah », a na základě zbývajících dvou replikátů stanoví novou průměrnou hodnotu. Nově stanovený variační

koeficient by měl být $\leq 25\%$. V opačném případě jsou **ověřovací kritéria pro kalibraci stanovení neplatná a test musí být zopakován pro všechny vzorky pacientů. Výsledky vyšetření vzorků pacientů se tudíž nesmí vykázat.**

2. Pozitivní kalibrátor

Pro každý zkušební test musí být pozitivní kalibrátor zařazen třikrát. U replikátů pozitivního kalibrátoru musí být dosažen variační koeficient (% CV) (20%). Pokud bude variační koeficient $> 20\%$, program automaticky vyřadí replikát s touto hodnotou RLU, která se bude nejvíce lišit od průměrné hodnoty, jakožto « ležící mimo rozsah », a na základě zbývajících dvou replikátů stanoví novou průměrnou hodnotu. Nově stanovený variační koeficient by měl být (20%). V opačném případě jsou ověřovací kritéria pro kalibraci stanovení neplatná a test musí být zopakován pro všechny vzorky pacientů. Výsledky vyšetření vzorků pacientů se tudíž nesmí vykázat.

3. Poměr průměrné hodnoty pozitivního kalibrátoru a průměrné hodnoty negativního kalibrátoru

Průměrná hodnota vypočítaná z replikátů pozitivního kalibrátoru (průměr PC) a průměrná hodnota vypočítaná z replikátů negativního kalibrátoru (průměr NC) se používají pro výpočet poměru průměr PC/průměr NC. Tento poměr (průměr PC/průměr NC), který bude automaticky vypočítán programem, musí splňovat následující kritéria pro ověření kalibrace analýzy, a teprve potom bude možné u daných vzorků interpretovat výsledky: Pokud bude tento poměr ($2,0$ a (20 , program přejde na výpočet hranice pozitivivity. Je-li poměr $< 2,0$ nebo > 20 , ověřovací kritéria pro kalibraci stanovení jsou neplatná a test se musí opakovat pro všechny vzorky pacientů. Výsledky vyšetření vzorků pacientů se tudíž nesmí vykázat.

Poznámka: Pro stanovení reprodukovatelnosti kalibrátorů u testovací sady DNA *digene* HC2 GC-ID byly v rámci interních studií, které zahrnovaly 62 testů provedených pomocí přístroje Rapid Capture System a 43 pokusů provedených manuálním způsobem, shromážděny výsledky zpracované pomocí přístroje *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) (viz tabulka 3). Z těchto výsledků vyplynulo, že u pozitivního kalibrátoru byl po 105 testech zaznamenán průměrný variační koeficient (% CV) roven nebo nižší než $6,5\%$ a u negativního kalibrátoru roven nebo nižší než $14,6\%$. U průměrného negativního kalibrátoru bylo při manuálních testech dosaženo průměrné hodnoty RLU 43, přičemž při testech prováděných pomocí zařízení RCS bylo dosaženo průměrné hodnoty 54, z čehož vyplývá, že při metodě prováděné pomocí RCS byly u negativního kalibrátoru ve srovnání s manuální metodou dosaženy mírně vyšší hodnoty. Ukázalo, že tento rozdíl nemá (ani u jedno z těchto postupů) žádný vliv na výsledky testu. U negativního kalibrátoru byla stanovena průměrná prahová hodnota 250 RLU, a to na základě statistického výpočtu průměrné hodnoty RLU $\pm 3SD$ pro negativní kalibrátor pozorovanou při testu *digene* HC2 CT/GC DNA, přičemž v průběhu vývoje zařízení RCS byl proveden velký počet testů. Horní mez tohoto rozsahu $\pm 3SD$ byla navýšena o dalších 20% , aby u negativní hodnoty bylo možné dosáhnout prahové hodnoty RLU v rutinní klinické praxi.

U negativního kalibrátoru by měla být standardně dosahována hodnota RLU (150 a variačního koeficientu CV (25%). Každá laboratoř by měla monitorovat kontrolu kvality a průběh kalibrace v souladu s dokumentem C24-2A vydaným Národním výborem pro normy týkající se klinických laboratoří (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Průměrná hodnota RLU dosažená při metodě se zařízením RCS může ve výjimečných případech přesáhnout hodnotu 150, přičemž může dojít i k odpovídajícímu snížení poměru PC (pozitivní kalibrátor) /NC (negativní kalibrátor), kde by podle tabulky 3 byla po kalibraci dosažena průměrná hodnota 8,29. V takovém případě budou výsledky přijatelné, avšak za předpokladu, že u negativního kalibrátoru (NC) zůstane RLU ≤ 250 a poměr PC/NC bude $\geq 2,0$. Pokud bude negativní kalibrátor vykazovat hodnotu RLU vyšší než 250 (NC RLU > 250) nebo pokud poměr PC/NC bude nižší než $2,0$, nebo je větší než 20 , test bude neplatný.

Tabulka 3. Souhrn statistických hodnot negativního kalibrátoru a pozitivního kalibrátoru pro manuální testy a testy prováděné pomocí metody RCS.

Metoda	Počet destiček	Vypočítané průměrné hodnoty pro PC/NC				Kontroly kvality testovací soupravy (průměr RLU/CO)	
		průměr	medián	Min	max	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Manuální	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Metoda	kalibrátor	Vypočítané průměrné hodnoty pro RLU				Průměr vypočítaného variačního koeficientu (%CV)
		průměr	medián	Min	max	
RCS	negativní	54	46	24	127	14,4
	pozitivní	399	405	179	606	6,5
Manuální	negativní	43	36	16	120	14,6
	pozitivní	295	309	167	415	4,7

VÝPOČET HRANICE POZITIVITY

Po ověření sady testů podle výše uvedených kritérií bude použito platných replikátů pozitivních kalibrátorů pro stanovení hodnot limitu positivity RLU, od kterého budou vzorky určeny jako pozitivní. Tyto hodnoty limitu positivity se počítají takto:

Hranice positivity RLU = průměrná hodnota RLU pozitivního kalibrátoru

Příklad výpočtu hranice positivity:

	Hodnoty NC RLU	Hodnoty PC RLU
	97	312
	101	335
	91	307
Průměrná hodnota	96	318
Variační koeficient (%CV)	4,9	4,7
Průměr PC/průměr NC	N/A	3,31

Hranice positivity RLU je tedy (průměrná hodnota PC) = 318

Všechny hodnoty RLU vzorků budou převedeny na poměr k příslušné hranici positivity (CO) RLU software *digene* pro příslušný test. Tak například všechny výsledky z celé sady testů vzorků by měly být vyjádřeny hodnotou poměru RLU vzorku pacienta/hranice positivity testu.

Poznámka: Hodnoty RLU/CO a pozitivní/negativní výsledky dosažené u všech testovaných vzorků budou uvedeny ve zprávě o analýze dat provedené pomocí programového softwaru *digene* pro příslušný test.

KONTROLA KVALITY

Vzorky pro kontrolu kvality jsou dodávány s DNA testem *digene* HC2 GC-ID. Konzultujte návod k použití k příslušnému software *digene* analýzy pro pokyny, jak vkládat čísla šarží a data expirace pro kontroly kvality. Tyto kontroly musí být součástí každého testu a hodnota RLU/CO každé kontroly kvality musí spadat do limitu následujících rozmezí, aby byl daný test považován za platný. **Jestliže kontroly kvality nespádají do daných rozmezí, stanovení je neplatné a musí být opakováno.** V důsledku toho nelze pro neplatné stanovení zaznamenat žádné výsledky, týkající se pacientek.

	QC CT	QC GC
Minimální hodnota RLU/CO	0	1,0
Maximální hodnota RLU/CO	0,9999	20,00
Maximální hodnota %CV	20,00	20,00

1. Kontroly kvality, které jsou součástí soupravy, jsou klonované terčičky CT a GC DNA, které se skládají ze stejného plazmidu vytvořeného pro každý jednotlivý organismus (jeden pro CT a jeden pro GC), stejně tak jako je tomu u pozitivního kalibrátoru, který je součástí testovací soupravy DNA *digene* HC2 GC-ID.
2. Tento materiál pro kontrolu kvality není totožný s organismem CT nebo GC v matrici vzorku a není vhodný jako účinná kontrola kvality pro transportní médium *digene* STM nebo PreservCyt Solution.
3. Pozitivní kalibrátor se používá pro normalizaci výsledků vzorků vytvořením hranice positivity RLU. Kontroly kvality dodané s touto soupravou musí být použity pro interní kontrolu kvality. Další kontroly kvality mohou být testovány podle směrnic nebo požadavků místních, státních nebo národních předpisů nebo pravidel příslušných organizací.
4. Aby mohla být u vzorků testována efektivita lyze a denaturace, laboratoře by měly pravidelně připravovat kontroly pro přípravu vzorků, a to tak, že se do nové zkumavky pro STM (*médium pro přenos vzorků*) přidá $\geq 5\ 000$ CFU/ml *Neisseria gonorrhoeae* (auxotyp 1, 5 nebo kmen Type z ATCC). Předtím, než začnete provádět test (stejným způsobem jako u klinických vzorků), nechte vzorek inkubovat při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Pokud bude vzorek zpracován náležitým způsobem, mělo by být dosaženo $RLU/CO \geq 2,50$. Případně je pro tento účel možné použít i vzorky z testovacích panelů s organismy GC, které jsou komerčně dostupné.
5. Přijatelná rozmezí pro kalibrátory a kontroly kvality byla určena pouze pro luminometr schválený společností QIAGEN. Negativní kalibrátor a kontroly kvality monitorují případné podstatné selhání reagentů a nezajišťují přesnost hranice positivity stanovení.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ VZORKŮ

Použitá kritéria DNA testu *digene* HC2 GC-ID

1. Vzorky s poměrem hodnot $RLU/CO \geq 2,50$ jsou považovány za pozitivně testované pro DNA *Neisseria gonorrhoeae*. Životaschopnost nebo infekčnost mikroorganismů nelze odvodit, protože DNA v testovaném vzorku může perzistovat i za nepřítomnosti živých mikroorganismů.
2. Vzorky s poměrem hodnot $RLU/CO < 1,00$ neobsahují DNA *Neisserie gonorrhoeae* nebo obsahují množství DNA pod detekovatelným limitem daného testu. Tyto vzorky by měly být hodnoceny jako vzorky, kde DNA *Neisserie gonorrhoeae* nebyla zjištěna. Negativní výsledek nevylučuje infekci *Neisserie gonorrhoeae*, protože výsledky závisí na adekvátním odběru vzorků a na dostatečném množství DNA k detekci.

3. Vzorky s poměrem hodnot $RLU/CO \geq 1,00$ a $< 2,50$ jsou považovány za nejednoznačné, tj. v šedé zóně. Výsledky by měly být považovány za pravděpodobně pozitivní na DNA *Neisseria gonorrhoeae*. Je doporučeno opakované testování nového vzorku od pacientky nebo další testování alternativními postupy vzhledem k omezené prediktivní hodnotě pozitivního výsledku při uvedených hodnotách poměru RLU/CO.
 4. Pokud je pravděpodobnost infekce *Neisseria gonorrhoea* nejistá nebo zpochybněna klinickým obrazem a jinými laboratorními výsledky, doporučuje se potvrdit pozitivní výsledky jinou metodou. Analytické studie používající tento test ukázaly omezenou zkříženou reaktivitu s určitými sekvencemi jiných DNA, což může způsobit falešně pozitivní výsledky. Další informace viz oddíl Analytická specifita.
- * Během klinického hodnocení testu DNA *digene* HC2 GC-ID byly 3 ze 17 výsledků v rozmezí šedé zóny potvrzeny kultivačním vyšetřením na gonokoky jako pozitivní. Zbývajících 14 bylo falešně pozitivních. Následně byla u 5ti vzorků počáteční hodnota RLU/CO mezi 1,00 a 2,50, 3 z nich byly kultivací na gonokoky potvrzeny jako pozitivní. Opakované dvojité testování těchto tří vzorků testem DNA *digene* HC2 GC-ID přineslo výsledek RLU/CO větší než $\geq 1,00$. Zbývajících 2 vzorky byly kultivačně negativní a také byly dvojitým testem DNA *digene* HC2 GC-ID hodnoceny jako negativní.

OMEZENÍ METODY

Další omezení metody při použití systému k testování velkého objemu vzorků viz *Uživatelská příručka pro zařízení Rapid Capture System*.

- K užití pouze pro *In-Vitro* testy.
- Postup, kontrola kvality a hodnocení výsledků testu DNA *digene* HC2 GC-ID je třeba přesně dodržovat, aby byly dosaženy spolehlivé výsledky testu.
- Test DNA *digene* HC2 GC-ID může být použit pouze s cervikálními vzorky, odebranými pomocí soupravy *digene* HC2 DNA Collection Device a umístěnými v STM, s cervikálními vzorky, odebranými pomocí soupravy *digene* Female Swab Specimen Collection Kit a umístěnými v STM nebo s cervikálními vzorky, odebranými pomocí kartáčku a umístěnými v Hologic PreservCyt Solution.
- Výsledky testu by měly být hodnoceny pouze ve spojení s klinickými údaji o pacientce a s výsledky dalších vyšetření.
- Test DNA *digene* HC2 GC-ID poskytuje kvalitativní výsledky. Číselná hodnota (poměr) nad hranicí positivity stanovená ve vzorku od pacientky nekoreluje s množstvím DNA gonokoků přítomných ve vzorku.
- Negativní výsledek nevylučuje možnost infekce *Neisseria gonorrhoeae*, protože detekce závisí na množství mikroorganismů přítomných ve vzorku a může být ovlivněna způsobem odběru vzorku, pacientkou, stádiem infekce nebo kmenem *Neisseria gonorrhoeae*, který infekci vyvolal.
- Test DNA *digene* HC2 GC-ID není určen k hodnocení výsledků léčby.
- Test DNA *digene* HC2 GC-ID byl validován pouze pro použití automatické promývačky destiček nastavené dle návodu k testu. Tato hodnotící studie byla provedena v domovské laboratoři, výsledky jsou uloženy ve společnosti QIAGEN. Jiné promývačky destiček nebo jiné nastavení uvedené promývačky nejsou pro test DNA *digene* HC2 GC-ID přípustné.
- Aby se minimalizovala variabilita výsledků získaných pomocí testu DNA *digene* HC2 GC-ID, je nezbytné řádně zaškolit personál laboratoře, který tento test provádí. Každá laboratoř musí také kontrolovat technickou kvalitu provádění testu. K tomuto účelu jsou komerčně dodávány vzorové testovací panely obsahující gonokoky nebo DNA gonokoků, které je třeba pravidelně testovat v souladu s ustanovenými postupy při kontrole kvality.

PŘEDPOKLÁDANÉ VÝSLEDKY

PREVALENCE

Prevalence vzorků pozitivních na *Neisseria gonorrhoeae* se liší v závislosti na charakteristice populace – věku, pohlaví nebo rizikových faktorech. Prevalence *Neisseria gonorrhoeae* zjištěná pomocí testu DNA *digene* HC2 GC-ID v populaci účastníci se klinické studie se pohybovala mezi 1,1% a 13,0 %. Prevalence byla vypočítána za předpokladu, že 17 vzorků s nejednoznačným výsledkem bylo GC DNA pozitivních (tabulka 4). 8 z těchto 17 vzorků bylo potvrzeno jako pozitivní pomocí kultivace gonokoků nebo polymerázovou řetězovou reakcí.

Tabulka 4. Prevalence pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 GC-ID podle místa testování

Pracoviště	Pozitivní/Testováno	% Prevalence
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
celkem	131/1825	7,2

PREDIKTIVNÍ HODNOTA POZITIVNÍCH A NEGATIVNÍCH VÝSLEDKŮ

Hypotetické pozitivní a negativní predikční hodnoty (PPH a NPH) testu DNA *digene* HC2 GC-ID pro různé úrovně prevalence byly počítány s použitím celkové senzitivity a specificity určené jednotlivě pro vzorky získané cervikálním kartáčkem *digene* HC2 DNA Collection Device a pro vzorky odebrané tamponem *digene* Female Swab Collection Kit. Tabulka 5 ukazuje hypotetické PPH a NPH pro vzorky získané kartáčkem (celková senzitivita 92,6 % a specifická 98,5 %), v tabulce 6 jsou uvedeny hypotetické PPH a NPH pro vzorky získané stěrem tamponem (celková senzitivita 93,0 % a specifická 98,8 %)

Tabulka 5. Hypotetické prediktivní hodnoty testu DNA *digene* HC2 GC-ID při různých hodnotách prevalence (kartáček - cytobrush).

Prevalence (%)	Senzitivita (%)	Specifická (%)	PPH (%)	NPH (%)
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

Tabulka 6. Hypotetické prediktivní hodnoty *digene* HC2 GC-ID DNATestu při různých hodnotách prevalence (stěr štětičkou).

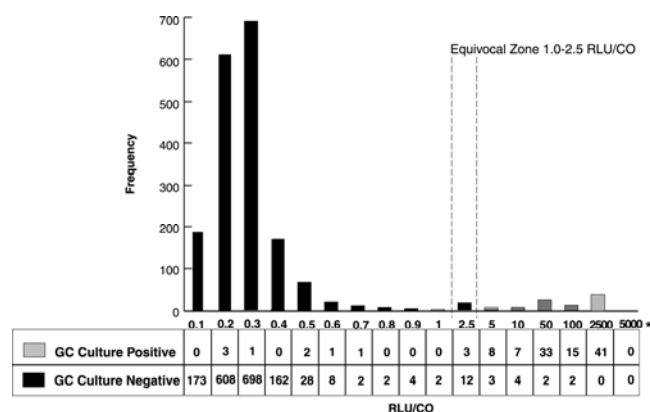
Prevalence (%)	Senzitivita (%)	Specifická (%)	PPH (%)	NPH (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

DISTRIBUCE ČETNOSTI:VÝSLEDKY RLU/CO U TESTU DNA *digene* HC2 GC-ID

Distribuce poměrů RLU/CO testu DNA *digene* HC2 GC-ID pozorované v průběhu multicentrové klinické studie je znázorněna na obrázku 1. Tyto údaje zahrnují všechny vzorky testované pomocí testu DNA *digene* HC2 GC-ID, pro něž byly dostupné také výsledky kultivačního vyšetření (n=1828). Rozbor výsledků byl proveden podle následujících podmínek: vzorky s hodnotou RLU/CO < 1,00 byly považovány za negativní. Vzorky s hodnotou RLU/CO ≥ 2,50 byly považovány za pozitivní. Vzorky s hodnotami RLU/CO ≥ 1,00 a < 2,50 byly považovány za nejednoznačné.

Mezi pozitivními a negativními výsledky testu DNA *digene* HC2 GC-ID je zřejmý velký rozdíl poměrů RLU/CO. U 99 % (1 676 z 1 690) z negativních výsledků testu byly hodnoty poměru RLU/CO mezi 0,0 a 0,5. Pět negativních výsledků (5 z 1 690) mělo hodnotu RLU/CO mezi 0,6 a 0,8. Celkem méně než 1 % (méně než 0,9 %, 17 z 1 825) výsledků vzorků spadá do šedé zóny testu, 47 % (8 ze 17) z nich bylo kultivačně nebo PCR metodou potvrzeno jako pozitivní. 89 % (93 ze 104) pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 GC-ID mělo hodnotu poměru RLU/CO mezi 10 a 2 500.

Obrázek 1. Distribuce četností výsledků poměru RLU/CO testu DNA *digene* HC2 GC-ID



*Ukazuje horní limit rozsahu včetně uvedených hodnot.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKA TESTU

VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE PODLE VZORKŮ

Funkční charakteristika testu DNA *digene* HC2 GC-ID byla stanovena srovnáním výsledků testu a výsledků kultivace gonokoků. Bylo testováno 1825 vzorků od pacientek z 5 různých pracovišť (např. oddělení pohlavně přenosných chorob, poradna pro plánování rodičovství, gynekologicko-porodnické kliniky). Testy PCR byly provedeny u vzorků s pozitivním *digene* HC2 GC-ID DNA testem, ale s negativní kultivací. Výsledky testu *digene* HC2 GC-ID DNA nebyly hodnoceny pomocí výsledků testů PCR, proto nemá PCR metoda žádný vliv na výpočty funkční charakteristiky *digene* HC2 GC-ID DNA testu. Výsledky klinické studie pro vzorky získané cervikálním kartáčkem (*digene* HC2 DNA Collection Device) jsou uvedeny v tabulce 7, výsledky pro vzorky získané stěrem tamponem (*digene* Female Swab Collection Kit) jsou uvedeny v tabulce 8.

Funkční charakteristika testu DNA *digene* HC2 GC-ID byla stanovena s využitím hranic positivity 1,0 a 2,5 bez ohledu na předpoklad, že předběžně pozitivní výsledky spadají do nejednoznačné oblasti výsledků testu, jak je popsáno v odstavci *Hodnocení výsledků* v tomto návodu k použití. Proto se funkčnost testu *digene* HC2 GC-ID DNA může ve vaší laboratoři lišit v závislosti na distribuci hodnot, které spadají do šedé zóny a výsledky získané novým testováním předběžně pozitivních vzorků se opakují. Jako pomůcka může posloužit fakt, že méně než 0,9 % testovaných vzorků (17 z 1 825) v multicentrické studii užití ke stanovení funkčnosti testu *digene* HC2 GC-ID DNA spadalo do tohoto rozmezí šedé zóny. Podívejte se na distribuci četností poměrů RLU/CO v odstavci *Očekávané výsledky* v tomto návodu k použití.

Nebyly získány dostatečné údaje, které by přesněji porovnály senzitivitu a pozitivní predikční hodnotu testu DNA *digene* HC2 GC-ID při použití stěrů tamponem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit a při sběru vzorků cervikálním kartáčkem HC Cervical Sampler. Protože použití cervikálního kartáčku *digene* HC2 DNA Collection Device je kontraindikováno při odběru vzorků u těhotných žen, schopnost testu zjistit přítomnost gonokokové DNA může být v této skupině omezena stejně, jako když je pro odběr vzorku použit stěr tamponem. Funkční charakteristika testu předpokládá, že testované vzorky jsou uchovávány při 2 - 8 stupních Celsia nebo zamražené a zpracovány do 1 - 2 týdnů po odběru.

Klinická senzitivita a specifita testu DNA *digene* HC2 GC-ID pro detekci pacientek s klinicky manifestní infekcí v nakažlivém stádiu, kdy nemoc může být přenesena na sexuálního partnera nebo způsobit komplikace onemocnění, nebyla srovnávána s jinými komerčně dostupnými metodami amplifikace nukleových kyselin (NAA) k detekci gonokokové DNA. V klinických studiích testování modifikovanými komerčně vyráběnými NAA testy ukázalo pozitivitu u některých vzorků s pozitivním testem DNA *digene* HC2 GC-ID, ale negativním kultivačním výsledkem. Očekávaná senzitivita je založena na počtu pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 GC-ID u pacientek s negativními výsledky kultivace *Neisseria gonorrhoeae*. Senzitivita testu DNA *digene* HC2 GC-ID je proto možné odvodit pouze od hodnoty pozitivních kultivačních výsledků, jejichž senzitivita se pohybuje kolem 60 – 85 %.

Tabulka 7. Srovnání testu DNA *digene* HC2 GC-ID s výsledky kultivace gonokoků ze vzorků odebraných kartáčkem. Funkční charakteristika vypočtena s použitím RLU/CO hranic pozitivit 1,0 a 2,5 uvedena níže. Hodnoty v závorkách představují funkčnost za předpokládané hranice pozitivit RLU/CO 2,5. Interval spolehlivosti 95 % zahrnuje obě hranice pozitivit, bodové odhady se lišily u každé hodnocené hranice pozitivit poměru RLU/CO.

Pracoviště ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: kultivace n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Senzitivita	PPH	Specificita	NPH	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ kultivace- PCR ³ +
Příznaky nemoci										
1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00)	84,78 (92,68)	97,75 (99,04)	99,67 (99,35)	5/7 (2/3)
95% CI						83,1-99,9	80,1-98,5	97,2-99,8	98,2-100	
2	188	13	2	4	169	76,47	86,67	98,83	97,69	1/2
95% CI						50,1-93,2	59,5-98,3	95,8-99,9	94,2-99,4	
3	233	14	6 (3)	1	212 (215)	93,33	70,00 (82,35)	97,25 (98,62)	99,54	0 ³ /6
95% CI						68,1-99,8	56,6-96,2	96,0-99,7	97,4-100	
4	163	4	0	0	159	100,00	100,00	100,00	100,00	N/A
95% CI						39,8-100	39,8-100	97,7-100	97,7-100	
všechna	935	70 (69)	15 (8)	6 (7)	844 (851)	92,11 (90,79)	82,35 (89,61)	98,25 (99,07)	99,29 (99,18)	6³/15
95% CI						83,6-97,1	80,1-95,4	98,2-99,6	98,5-99,7	
Bez příznaků										
1	101	10 (9)	2	0 (1)	89	100,00 (90,00)	83,33 (81,82)	97,80	100,00 (98,89)	2/2
95% CI						69,2-100	51,6-97,9	92,3-99,7	95,9-100	
2	12	2	0	0	10	100,00	100,00	100,00	100,00	N/A
95% CI						15,8-100	15,8-100	69,2-100	69,2-100	
3	84	1 (0)	0	0 (1)	83	100,00 (0,00)	100,00	100,00	100,00 (98,81)	N/A
95% CI						2,5-100	2,5-100	95,7-100	95,7-100	
4	226	4	2 (0)	1	219 (221)	80,00	66,67 (100,00)	99,10 (100,00)	99,55	1/2
95% CI						28,4-99,5	39,8-100	98,3-100	97,5-100	(N/A)
5	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100,00	100,00	N/A
95% CI								2,5-100	2,5-100	
všechna	424	17 (15)	4 (2)	1 (3)	402 (404)	94,44 (83,33)	80,95 (88,24)	99,01 (99,51)	99,75 (99,26)	3/4 (2/2)
95% CI						72,7-99,9	63,6-98,5	98,2-99,9	98,6-100	
Všechny pacientky										
1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	98,00 (94,00)	84,48 (90,38)	97,76 (98,76)	99,75 (99,25)	7/9 (4/5)
95% CI						89,4-100	79,0-96,8	97,1-99,6	98,6-100	
2	200	15	2	4	179	78,95	88,24	98,90	97,81	1/2
95% CI						54,4-94,0	63,6-98,5	96,1-99,9	94,5-99,4	
3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50)	71,43 (82,35)	98,01 (99,00)	99,66 (99,33)	0 ³ /6
95% CI						69,8-99,8	56,6-96,2	97,1-99,8	98,1-100	
4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89	80,00 (100,00)	99,47 (100,00)	99,74	1/2 (N/A)
95% CI						51,8-99,7	63,1-100	99,0-100	98,5-100	
5	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100,00	100,00	N/A
95% CI								2,5-100	2,5-100	
Všichni	1359	87 (84)	19 (10)	7 (10)	1246 (1255)	92,55 (89,36)	82,08 (89,36)	98,50 (99,21)	99,44 (99,21)	9³/19
95% CI						85,3-97,0	81,3-94,8	98,6-99,6	98,9-99,8	

¹ pouze informativní charakter; vzorky nebyly rozlišeny pomocí PCR.

² pracoviště 5 nedalo vzorky získané kartáčkem od symptomatických pacientek

³ ve 2 případech nebyla PCR provedena.

N/A = nelze uplatnit

Tabulka 8. Srovnání testu DNA *digene* HC2 GC-ID s výsledky kultivace gonokoků ze vzorků odebraných stěrem štětičkou. Funkční charakteristika vypočtena s použitím RLU/CO hranic pozitivity 1,0 a 2,5 uvedena níže. Hodnoty v závorkách představují funkčnost za předpokládané hranice pozitivity RLU/CO 2,5. 95 % interval spolehlivosti zahrnuje obě hranice pozitivity, bodové odhady se lišily u každé hodnocené hranice pozitivity poměru RLU/CO.

Pracoviště ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: kultivace n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Sensitivita	PPH	Specificita	NPH	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ kultivace - PCR ¹⁺
Příznaky nemoci										
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)	N/A
95% CI						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% CI						66,1-99,8	75,3-100	95,4-100	93,2-100	
3	5	2	0	0	3	100	100	100	100	N/A
95% CI						15,8-100	15,8-100	29,2-100	29,2-100	
5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	N/A	0,00	98,15 (99,38)	100	1 ³ /3
95% CI							2,5-100	96,6-100	97,7-100	
Všechna	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% CI						84,05-98,79	75,93-94,82	97,45-99,50	98,43-99,89	
Bez příznaků										
1	61	1	0	1	59	50,00	100	100	98,33	N/A
95% CI						1,26-98,74	2,50-100	93,94-100	91,06-99,96	
2	10	2	0	0	8	100	100	100	100	N/A
95% CI						15,8-100	15,8-100	63,1-100	63,1-100	
3	2	0	0	0	2	N/A	N/A	100	100	N/A
95% CI								15,8-100	15,8-100	
4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100	100	N/A
95% CI								2,5-100	2,5-100	
5	186	1	0	0	185	100	100	100	100	N/A
95% CI						2,5-100	2,5-100	98,0-100	98,0-100	
Všechna	260	4	0	1	255	80,00	100	100	99,61	N/A
95% CI						28,36-99,49	39,76-100	98,56-100	97,84-99,99	
Všichni										
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)	N/A
95% CI						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% CI						69,8-99,8	63,6-100	91,9-100	93,6-100	
3	7	2	0	0	5	100	100	100	100	N/A
95% CI						15,8-100	15,8-100	47,8-100	47,8-100	
4	1	0	0	0	1	N/A	N/A	100	100	N/A
95% CI								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% CI						2,5-100	1,3-98,7	98,4-100	98,9-100	
Všechna	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% CI						83,00-98,05	72,74-92,12	97,76-99,41	98,74-99,87	

¹ pouze informativní charakter; vzorky nebyly rozlišeny pomocí PCR.

² pracoviště 5 nedalo vzorky získané stěrem štětičkou od symptomatických pacientek

³ ve 2 případech nebyla provedena PCR.

N/A nelze uplatnit

REPRODUKOVATELNOST METODY

Jako součást multicentrové klinické studie byla provedena studie reprodukovatelnosti testu, která by určila každodenní, rutinní, na místě nezávislou celkovou reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 GC-ID s použitím panelu sestaveného ze sekvencí DNA *Neisseria gonorrhoeae* a *digene* HC2 GC-ID DNA pozitivních a *digene* HC2 GC-ID DNA negativních klinických vzorků.

Byl testován 10-prvkový panel slepých, denaturovaných klinických a laboratorních vzorků sestávající z 8 pozitivních vzorků a 2 negativních vzorků, po šesti kopiích dvakrát denně po dobu 3 dnů na 4 pracovištích (3 externí pracoviště a QIAGEN). Každé pracoviště vytvořilo 36 položek údajů pro každou testovanou sekvenci. Všechny vzorky byly před testováním denaturovány a uloženy ve zmraženém stavu. 100 % shody správných výsledků bylo dosaženo u 1 152 očekávaných pozitivních testů (1 152 z 1 152) a u 288mi očekávaně negativních testů bylo dosaženo 100 % správných výsledků (288 z 288). Celková správnost výsledků byla 100 % (1 440 z 1 440), s intervalem spolehlivosti 95 %, 99,7-100 a kappa = 1,00. Nebyl shledán významný rozdíl mezi provedením jednotlivých testů, dny provádění testů nebo pracovišti, proto údaje ze všech zkoušek na každém pracovišti byly sestaveny do tabulky 9:

Tabulka 9. Reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 GC-ID v multicentrické klinické studii.

Číslo terčiku	Pracoviště 1		Pracoviště 2		Pracoviště 3		Pracoviště 4		celkem		
	\bar{X} RLU /CO	% shoda	\bar{X} RLU /CO	% shoda	\bar{X} RLU /CO	% shoda	\bar{X} RLU /CO	% shoda	\bar{X} RLU /CO	pozorováno / očekáváno	% shoda
1	2,5	100	2,1	100	2,7	100	2,6	100	2,5	144/144	100
2	4,8	100	4,2	100	5,0	100	5,2	100	4,8	144/144	100
3	29,4	100	23,3	100	30,1	100	30,4	100	28,3	144/144	100
4	51,5	100	43,0	100	52,1	100	54,1	100	50,2	144/144	100
5	2,5	100	2,0	100	2,5	100	2,5	100	2,4	144/144	100
6	4,7	100	3,5	100	4,9	100	4,8	100	4,5	144/144	100
7	14,0	100	10,6	100	13,9	100	14,1	100	13,2	144/144	100
8	16,7	100	12,7	100	17,4	100	18,2	100	16,3	144/144	100
9	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
celkem										1440/1440	100

Druhá studie účinnosti a reprodukovatelnosti testu používající celý mikroorganismus *Neisseria gonorrhoeae* (GC) inokulovaný do základní hmoty modelového klinického vzorku epiteliálních buněk byla provedena na třech externích pracovištích. 25 testovaných vzorků zahrnovalo zástupce negativních, slabě (na hranici nebo nad hranicí detekovatelnosti) a středně pozitivních vzorků se dvěma kmeny gonokoků, smíšené infekce s *Chlamydia trachomatis* (CT) a vzorky obsahující krev. 12 vzorků bylo očekávaně pozitivních a 13 vzorků bylo očekávaně negativních. Procentuální shoda mezi očekávanými a dosaženými výsledky v testu DNA *digene* HC2 GC-ID na třech jednotlivých pracovištích a pro všechna pracoviště dohromady ukazuje tabulka 10. Senzitivita, specifická, shoda a index kappa pro každé pracoviště jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 10. Test DNA *digene* HC2 GC-ID procentuální shoda podle pracoviště.

pracoviště	Pozorované/očekávané	% shody*
1	25/25	100% (86,28%-100%)
2	25/25	100% (86,28%-100%)
3	25/25	100% (86,28%-100%)
Kombinace pracovišť	75/75	100% (95,20%-100%)

* čísla v závorkách uvádějí 95% interval spolehlivosti

Tabulka 11. Výsledky DNA *digene* HC2 GC-ID testu – souhrnná statistika (hranice pozitivita 1,0).

Statistická míra	pracoviště 1	pracoviště 2	pracoviště 3	celkově
Senzitivita	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Specifická	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Shoda	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

** čísla v závorkách uvádějí 95% interval spolehlivosti

Při běžném testování účinnosti je 12 nejednoznačných vzorků uvedených v tabulce 10 obsahujících nízké koncentrace gonokoků ($\sim 5 \times 10^4$ mikroorganismů/ml) podle oddílu Interpretace výsledků v tomto návodu k použití jako očekávaně pozitivní. Test ukázal svou schopnost rozlišit DNA gonokoků ve vzorcích s úrovní koncentrace mikroorganismů na hranici detekovatelnosti pro danou testovací metodu. Další důkaz byl pozorován při testování panelu, který obsahoval vzorky s malým počtem mikroorganismů na úrovni určené k detekci pomocí metod amplifikace nukleových kyselin. Testování na třech externích pracovištích a ve společnosti QIAGEN přineslo 100 % pozitivních (nebo očekávaně pozitivních) výsledků u vzorku na panelu obsahujícím gonokoky. Ve dvou případech se hodnoty RLU/CO dostaly do šedé zóny testu (viz Tabulka 12).

Tabulka 12. Výsledky panelů se vzorky Chlamydia tr. (CT) a gonokoků (GC).

Výsledek testu DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID			
Pracoviště	RLU/CO	Hodnocení	Očekávaný výsledek
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

PŘESNOST

Studie přesnosti byla provedena na třech pracovištích s cílem určit celkovou a dílčí přesnost testu DNA hc2 GC-ID s použitím panelu pozitivních a negativních slepých, simulovaných klinických vzorků. Byla též hodnocena přesnost dvou luminometrů s využitím stejného panelu. Dva luminometrické modely zahrnovaly přístroj DML 2000, který se doporučuje používat v kombinaci s testem DNA *digene* HC2 CT-ID, a luminometr MLX; který byl jedním z luminometrických modelů používaných během klinického hodnocení, které již nejsou k dispozici. Jedno ze tří pracovišť mělo potíže s jinými DNA *digene* HC2 testy prováděnými jako součást této studie, které byly způsobeny postupem testování a nesprávnou obsluhou po nevyhovujícím zaškolení laboranta. I když testování přesnosti testu DNA *digene* HC2 GC-ID nebyl ovlivněno, laborant provádějící test musel být přeškolen na správný postup testu.

Tabulka 13 ukazuje funkčnost testu DNA *digene* HC2 GC-ID kombinovaně pro všechna pracoviště (včetně pracoviště, kde se vyskytly technické potíže před přeškolením obsluhy na správný postup při provádění testu). Test ukázal srovnatelnou přesnost po přeškolení laborantního technika, avšak pro složku 3 panelu (který obsahoval nízkou koncentraci gonokoků) byly naměřené hodnoty RLU/CO blízko nebo uvnitř šedé zóny 1,0-2,5. Pro potřeby analýzy dat byly hodnoty RLU/CO spadající do šedé zóny nebo přesahující 2,5 považovány za pozitivní. I když to z této tabulky není patrné, kvalitativní výsledky byly 100 % (54 z 54) (93,4 % - 100 % 95 % interval spolehlivosti) v souladu s očekávanými výsledky na těchto třech pracovištích.

Tabulka 13. Odhady přesnosti - rozdíly v přístrojích, sériích testů, celková přesnost RLU/CO podle testu na terčiku.

Prvek panelu	n	Průměr RLU/CO	U 1 přístroje		Mezi 2 přístroji		V baterii testů		Celkem	
			Standard odchylka (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

Pro potřeby této analýzy dat byly všechny hodnoty RLU/CO spadající do šedé zóny nebo přesahující hodnotu 2,5 považovány za pozitivní. Další studie přesnosti byla provedena ve společnosti QIAGEN k určení celkové přesnosti testu DNA *digene* HC2 GC-ID s použitím přístroje DML 2000. Šestiprvkový panel na testování přesnosti byl připraven s využitím simulované substance klinického vzorku z tkáňových kultur epiteliálních buněk v suspenzi s transportním médiem (*digene* STM) a obsahoval 2 negativní vzorky, 2 slabě pozitivní vzorky a dva středně pozitivní vzorky, všechny obsahovaly kartáček na odběr vzorků. Každý panel byl testován ve třech kopiích, dva panely na destičce, a zpracováván 2 laboranty v průběhu pěti dnů. Na destičce byl použit čerstvě denaturovaný panel. Výsledky celkové přesnosti testu DNA *digene* HC2 GC-ID shromážděné z celých 5ti dnů testování jsou uvedeny v tabulce 14. I když to v tabulkách není uvedeno, kvalitativní interpretace výsledků byla 100 % v souladu s očekávanými výsledky (120 ze 120; 96,97 % - 100 % 95 % interval spolehlivosti), RLU/CO hodnota stanovena na 1,0.

Tabulka 14. Celková přesnost testu DNA *digene* HC2 GC-ID.

Prvek panelu	n	Průměr RLU/CO	SD	CV%	Průměr -2xSD	Průměr +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

PŘESNOST SE VZORKY PRESERVICYT

Při testu vzorků PreservCyt Solution byla provedena multicentrová studie, která charakterizovala přesnost testu od laboratoře k laboratoři a den ke dni. Dvě externí centra (nepatřící QIAGEN) testovala dvanáctidílný panel simulovaných vzorků pacientů odebraných v PreservCyt Solution. Každá laboratoř poté testovala panel třikrát, dvakrát denně po tři dny pomocí výrobně stejných šarží činidel. Dvanáctidílný panel simulovaných vzorků PreservCyt Solution byl připravený s různým množstvím GC (Auxotype 22; ATCC 27631) a byl vytvořen panel jako v tabulce 15.

Tabulka 15. Panel simulovaných vzorků PreservCyt Solution pro testování DNA *digene* HC2 GC-ID.

Bulk vzorek	Části panelu*	Očekávaný výsledek testu DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID	Přibližné RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Nízko GC pozitivní	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Středně GC pozitivní	~10
C	5N, 11N	Negativní	~0,20
D	6N, 12N	Negativní	~0,20

*Identifikátor vzorku indikuje známý status *Neisseria gonorrhoeae*[pozitivní (P) nebo negativní (N)].

Pro účely analýzy dat byly části panelu získané ze stejného bulk vzorku spojené.

Tabulka 16. Kvalitativní výsledky podle bulk vzorku – postup testu DNA *digene* HC2 GC-ID

Pool bulk vzorků	Pozitivní na GC n (%)	Šedá zóna n (%)	Negativní n (%)	Celkem
Negativní (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negativní (6N, 12N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negativní celkem	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Nízká pozitivita (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Střední pozitivita (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Pozitivní celkem	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

Tabulka 17. Standardní odchylky (SD) a variační koeficienty (CV) pro přesnost podle laboratoře a dne: *digene* HC2 GC-ID DNA Test v PreservCyt

Vzorek	n	Průměr RLU/CO	SD v rámci stanovení	SD mezi stanoveními	SD mezi dny	SD mezi centry	Celková SD	%CV
Negativní (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negativní (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
GC střední pozitivita (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
GC nízká pozitivita (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

*Složky negativní proměnlivosti byly nastaveny na nulu.

ANALYTICKÁ CITLIVOST

Analytická citlivost (limit detekce) testu DNA *digene* HC2 GC-ID byla stanovena přímým testováním sérií ředění panelu vzorků sestávajících z 114 jednotlivých izolátů *Neisseria gonorrhoeae*. Těchto 114 izolátů představovalo 13 auxotypů, 5 serovarů, 10 kmenů rezistentních na antibiotika, 6 izolátů kmenů bez plazmidů a 2 necharakterizovaných izolátů nalezených během multicentrické studie. Čtyřstupňové ředění každého z izolátů řazené v sériích bylo jednorázově testováno metodou DNA *digene* HC2 GC-ID ke stanovení detekčních limitů testu. Detekční limit pro každý auxotyp *Neisseria* je uveden v tabulce 18. Úroveň limitu detekce byla uvedena jako ředění každého z auxotypů, kde byla detekovaná hodnota blízko zóny nebo v šedé zóně testu 1,0-2,5 RLU/CO.

Analytická citlivost testu DNA *digene* HC2 GC-ID se pohybovala mezi 25 až 50 000 CFU/ test u 114 testovaných izolátů *Neisserie*, zahrnujících auxotypy, serovary, izoláty bez plazmidů a kmeny rezistentní na antibiotika. Pouze jeden ze šesti kmenů bez plazmidů a jeden z pěti testovaných serovarů *Neisseria gonorrhoeae* IA-5 byl detekován při koncentraci 50 000 CFU/test; žádný z dalších 112 izolátů nebyl detekován při koncentracích nad 5000 CFU/ test. Průměrný limit detekce u všech 114 izolátů se pohyboval mezi 974 a 2 887 CFU/ test, zohledněny byly též izoláty v ředění spadajícím do nejednoznačné zóny testu a nad 2,5 RLU/CO. Celkový průměrný limit detekce byl 1 931 CFU/test ($3,8 \times 10^4$ CFU/ml). Klinické vzorky, které obsahují mikroorganismy na úrovni nebo blízko úrovně limitu detekce, mohou vyžadovat provedení opakovaného testu alternativní metodou nebo náběr nového vzorku od pacientky, jak je uvedeno v odstavci Hodnocení výsledků tohoto návodu k použití.

Tabulka 18. Souhrn limitů citlivosti detekce pro GC auxotypy, serovary, kmeny bez plazmidů a kmeny rezistentní k antibiotikům.

Auxotyp	Detekovatelná koncentrace	
	CFU/ml	CFU/test
<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	5×10^4	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp AHU (5 izolátů)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp Arg (5 izolátů)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp AU (5 izolátů)	10^3-10^4	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype PAU (5 izolátů)	10^3-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Pro (5 izolátů)	10^4-10^5	500 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Proto (5 izolátů)	10^3-10^4	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacin slabě citlivý (Cipl) (5 izolátů)	10^3-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacin rezistentní (Cip R) (4 izolátů)	10^3-10^4	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 izolátů)	10^4-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> jiné-5423	10^4-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> jiné-5658	10^3-10^4	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 izolátů)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 izolátů)	10^3-10^6	50 - 50,000
<i>N. gonorrhoeae</i> kmeny bez plazmidů (6 izolátů)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 izolátů)	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 izoláty)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-1 or IA-2 (5 izolátů)	10^4-10^6	500 - 50,000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-5 (4 izoláty)	10^3-10^4	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-1 (5 izolátů)	10^3-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-4 or IB-15 (5 izolátů)	10^3-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Spectinomycin rezistentní (SpecR)	10^5	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 izolátů)	10^3-10^5	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Americký (5 izolátů)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Holandský (5 izolátů)	10^4-10^5	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Typový kmen	500-5000	25 - 250

DALŠÍ FAKTORY TÝKAJÍCÍ SE VZORKŮ PRESERV CYT SOLUTION

Limit detekčních zkoumání popsaný v předešlé sekci pro STM nebyl opakován se vzorky PreservCyt Solution, protože se očekává, že analytická citlivost testu je nezávislá na STM i typu vzorku PreservCyt Solution, zvláště protože vzorky PreservCyt Solution podléhají konverznímu postupu (detaily viz Pokyny k použití *digene* HC2 Sample Conversion Kit). Tento postup vykazuje vzorky PreservCyt Solution v podobném složení, jako vzorky STM před použitím s testem DNA *digene* HC2 GC-ID.

Ale protože vzorek PreservCyt Solution podléhá během přípravy centrifugaci, bylo nezbytné vyhodnotit jakýkoli možný vliv centrifugace na analytickou citlivost testu DNA *digene* HC2 GC-ID. Aby bylo možné posoudit možný vliv centrifugace na analytickou citlivost, bylo připraveno osmdesát osm (88) párů *Neisseria gonorrhoeae* DNA negativních STM a PreservCyt Solution vzorků s odpovídajícím množstvím organismů *Neisseria gonorrhoeae* (bezplazmidový kmen NRL 33151). Byly testovány párové vzorky a srovnáním získaných hodnot RLU/CO byla odhadnuta analytická citlivost [(PreservCyt:STM) x 100].

Tabulka 19. Srovnání analytické citlivosti testu DNA *digene* HC2 GC-ID mezi párovanými cervikálními vzorky PreservCyt Solution a STM.

	Test DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Počet vzorků	88	88	-
Průměr RLU/CO	3,97	4,91	1,24
Medián RLU/CO	4,01	4,93	1,23
Standardní odchylka (SD)	0,34	1,00	-
Minimum RLU/CO	3,06	2,30	-
Maximum RLU/CO	4,77	7,10	-

Další studie poskytla podobné srovnání s párovanými, simulovanými vzorky pacientů. Vzorky pacientů, odebravé v roztoku PreservCyt, byly získány z centra nepatřící QIAGEN a pozitivní vzorky byly určeny testem DNA *digene* HC2 GC-ID. Tyto pozitivní vzorky pacientů byla pak kombinovány tak, aby vzniklo celkem 10 koncentrovaných poolů vzorků PreservCyt. Z těchto poolů byly připraveny dva alikvotní podíly a zpracovány tak, aby vznikly buněčné pelety. Buněčné pelety byly resuspendovány ve fosfátovém fyziologickém roztoku (PBS). Podíl A byl připraven přidáním resuspendované pelety do STM a podíl B byl připraven přidáním resuspendované pelety do PreservCyt. Oba alikvotní podíly byly testované pomocí testu DNA *digene* HC2 GC-ID s následujícími výsledky:

Tabulka 20. Srovnání analytické citlivosti testu DNA *digene* HC2 GC-ID – simulované (poolované) cervikální vzorky PreservCyt Solution párované s STM.

	Test DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID		PC: STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Počet vzorků	10	10	-
Průměr RLU/CO	4,80	4,32	0,90
Medián RLU/CO	2,66	2,47	0,93
Standardní odchylka (SD)	5,44	5,08	-
Minimum RLU/CO	1,16	1,02	-
Maximum RLU/CO	18,97	17,26	-

ANALYTICKÁ SPECIFICITA

Byla testována série bakterií, virů, plazmidů a lidského buněčného materiálu a krevních složek, které se potencionálně vyskytují v ženském anogenitálním traktu. Cílem bylo stanovit výskyt zkřížené reaktivity testu DNA *digene* HC2 GC-ID. Všechny mikroorganismy byly testovány v koncentraci 10^5 a 10^7 organismů nebo CFU na ml, kde to bylo možné – v koncentraci 10^9 organismů nebo CFU na ml, pokud není níže uvedeno jinak. Purifikovaná DNA virů a plazmidů byla testována v různých koncentracích – viz níže.

Seznam testovaných bakterií:

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 izoláty) ^e
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 izoláty) ^f
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 izolátů)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 izoláty)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria species</i> ^g *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 izolátů) ^d
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (skupina A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 izolátů) ^d
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 izolátů)	<i>Neisseria sicca</i> (6 izolátů)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 izolátů)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^b	<i>Neisseria subflava biovar perflava</i> (4 izolátů) ^h
<i>Chlamydia psittaci</i> ^a (2 kmeny)	<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> (klinický izolát) [†]	<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 haemolysans</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>	

Testované koncentrace (organizmů/ml nebo CFU/ml pro druh *Neisseria*):

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

^b 2×10^6 , 2×10^7 a 2×10^8

^c 1×10^6 , 1×10^7 a 1×10^8

^d 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8

^e $1,1 \times 10^6$, $1,1 \times 10^7$, $1,1 \times 10^8$

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

^g 2×10^7 , 2×10^8 a 2×10^9

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

ⁱ 1×10^6 a 1×10^8

[†] Byl testován kmen *E. coli* kmen užitý ke kultivaci plazmidů (HB101) a klinický izolát *E. coli*.

* Kmen ATCC *Neisseria* má vlastnosti *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis* (ATCC #43831).

Všechny bakterie kromě *Neisseria gonorrhoeae*, které se potencionálně nacházejí v urogenitálním traktu s výjimkou tří komenzálních kmenů Neisserie a *Chlamydia psittaci*, vykazovaly negativní test DNA *digene* HC2 GC-ID. Pouze mírná zkřížená reaktivita interpretovaná jako pravděpodobně pozitivní byla zjištěna u *Chlamydia psittaci* a *Neisseria lactamica*. Tato zkřížená reaktivita by neměla ovlivnit hodnocení výsledků testu DNA *digene* HC2 GC-ID ve vzorcích z urogenitálního traktu. Mikroorganismy, které vykazovaly určitý stupeň zkřížené reaktivity, jsou:

	hodnocení	Koncentrace, při které se objevila zkřížená reakce
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 ze 2 izolátů)	Pravděpodobně pozitivní	1×10^7 organismů/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 ze 6 izolátů)	Pravděpodobně pozitivní*	1×10^9 CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (skupina Y, 1 ze 2 izolátů)	Pozitivní	1×10^7 CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 ze 6 izolátů)	Pozitivní	5×10^5 CFU/ml

* RLU/CO spadá do šedé zóny testu 1,00 až 2,50.

Tři komenzální kmeny Neisserie, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, a *Neisseria mucosa*, se primárně nacházejí v nosohltanu a horních dýchacích cestách. Jsou vzácně izolovány i v urogenitálním traktu^{13,14} Dále zkříženě reagující izolát *Neisseria meningitidis* skupiny Y, který nebylo možno zařadit podle typu lipopolysacharidu; je vzácně nalézán v běžné populaci. *Chlamydia psittaci* může být nalezena na kůži lidí pracujících nebo manipulujících s ptáky, avšak nebyla nalezena v anogenitální oblasti.¹⁵

Dokonce ani všechny izoláty daného kmene nereagovaly zkříženě v testu DNA *digene* HC2 GC-ID, čímž se snižuje pravděpodobnost nálezu falešně pozitivního výsledku z klinického vzorku v případě přítomnosti uvedeného kmene. Například pět ze šesti izolátů *Neisseria lactamica* nebo *Neisseria mucosa* byly testovány v testu DNA *digene* HC2 GC-ID negativně stejně jako jeden ze dvou kmenů *Chlamydia psittaci*. Proto se nepředpokládá, že zkřížená reaktivita v testu DNA *digene* HC2 GC-ID uvedená u zmíněných tří komenzálních kmenů Neisserie a *Chlamydia psittaci* by mohla vést k nesprávnému klinickému hodnocení pozitivního výsledku testování vzorku z anogenitálního traktu.

Přehled virové DNA, plazmidové DNA a lidského buněčného materiálu nebo složek krve, které byly testovány, včetně odpovídajících koncentrací:

Cytomegalovirus ^a	lidský Papillomavirus typ 6 ^f
Virus Epstein Barrové ^b	lidský Papillomavirus typ 11 ^f
HBsAg Pozitivní Serum ^c	lidský Papillomavirus typ 16 ^f
Herpes Simplex I ^d	lidský Papillomavirus typ 18 ^f
Herpes Simplex II ^d	pBR322 ⁱ
Human Immunodeficiency Virus (HIV) ^{b,g}	SV40 ^j
Lidská genomová DNA ^e	PGEM [®] 3Z ⁱ
Lidská placentární DNA ^e	PGEM [®] 3Zf(-) ^j
Lidská plná krev	lidské epitelální buňky ^k

Testované koncentrace:

^a 1×10^5 ; 1×10^7 ; 1×10^9 virových částic/ml

^b 1×10^5 ; 1×10^7 ; 1×10^8 virových částic/ml

^c $2,9 \times 10^8$; $1,1 \times 10^9$ virových částic/ml

^d $6,1 \times 10^6$; $2,4 \times 10^7$ virových částic/ml

^e $2,7 \times 10^2$; $1,1 \times 10^3$ kopií/ml

^f $1,1 \times 10^8$; $4,6 \times 10^8$ virových částic/ml

^g 2×10^6 ; 2×10^7 ; 2×10^8 virových částic/ml

^h 5%; 10%; 50%

ⁱ $2,1 \times 10^8$; $8,3 \times 10^8$ kopií/ml

^j 1 ng/ml; 4 ng/ml

^k 1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 buněk/ml

Žádný z testovaných virů nevykazoval zkříženou reaktivitu v testu DNA *digene* HC2 GC-ID; avšak zkřížená reakce se objevila u plazmidů pBR322, pGEM® 3Z, a pGEM® 3Zf(-). Všechny ostatní DNA preparáty včetně lidské DNA byla testována s negativním výsledkem. Lidská krev ani epiteliální buňky nevykazovaly v testu DNA *digene* HC2 GC-ID zkříženou reaktivitu. Zkřížená reaktivita mezi pBR322 a testem DNA *digene* HC2 GC-ID není překvapením vzhledem ke způsobu, jakým je GC sonda připravena. Přítomnost pBR322mologních sekvencí byla u lidských genitálních vzorků hlášena, vyskytují se falešně pozitivní výsledky v přítomnosti vysokých koncentrací bakteriálních plazmidů. Avšak žádný ze 103 vzorků pozitivně testovaných na *Neisseria gonorrhoeae* pomocí testu DNA *digene* HC2 GC-ID v americké multicentrické klinické studii nebyl označen za falešně pozitivní kvůli zkřížené reakci se sekvencemi pBR322. Tím je pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 GC-ID způsobených zkříženou reaktivitou homologních sekvencí pBR322 u klinických vzorků zřejmě nízká. I když test DNA *digene* HC2 GC-ID může zkříženě reagovat s *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM, a několika komenzálními kmeny *Neisserií*, pravděpodobnost, že tyto organizmy ovlivní hodnocení restu, je malá, jak ukazují výsledky multicentrické klinické studie.

HOMOLOGIE SOND S PLAZMIDOVOU A GENOMOVOU DNA

Genomové sondy jsou homologní k asi 0,5% genomu *Neisseria gonorrhoeae*. Je uvedena charakteristika pro každou sondu testu DNA *digene* HC2 GC-ID:

Sonda	Typ	Přibližná velikost inzerce (bp)	% genomu
pGC1	Genomový	6.400	0,34%
pGC2		3.300	0,17%
		9 700 (celkem)	0,51%
pGC3	kryptový plazmid	4.200	N/A*

* představuje celou sekvenci sondy

VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY SUSPENDOVANÉ V TRANSPORTNÍM MÉDIU (STM)

V testu DNA *digene* HC2 GC-ID byl hodnocen vliv krve a jiných potenciálně inhibujících definovaných látek. Plná krev a jeden z komerčně dodávaných typů sprchového gelu, antimykotický krém a spermicidní gel (látky, které se mohou běžně vyskytovat v cervikálních vzorcích) byly přidány do pozitivních vzorků (ze skupiny klinických vzorků) v koncentracích, které mohou být přítomny ve vzorcích z hrdla děložního (viz tabulka 21). Nebyly pozorovány žádné falešně pozitivní výsledky u žádné z těchto látek a v žádné z použitých koncentrací. Studie s neurčenými látkami přítomnými ve skupině 100 negativních klinických vzorků ukázala, že tyto nespecifikované látky nebrání vytvoření pozitivní reakce v testu DNA *digene* HC2 GC-ID ve srovnání s reakcí pozorovanou při testování gonokoků v suspenzi s transportním médiem.

Tabulka 21. Vliv interferujících látek na výsledky testu.

		výsledky testu DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID				Médium pro přenos vzorku		
Výsledek	Látka	Koncentrace	Skupina klinických vzorků		Pozitivní*			
			Negativní	Pozitivní*	Pozitivní*			
			RLI/CO	Zjištěno	RLU/CO	Zjištěno	RLU/CO	Zjištěno
Žádná (kontrola)			0,15	NA	3,41	NA	2,70	NA
Krev		1%	0,21	+37%	3,17	-7%	3,21	+19%
		5%	0,19	+22%	3,11	-9%	3,05	+13%
Sprchový gel		1%	0,21	+37%	3,48	+2%	2,80	+4%
		5%	0,18	+20%	3,47	+2%	3,20	+18%
Antimykotický krém		1%	0,19	+20%	3,60	+5%	2,95	+9%
		5%	0,20	+30%	3,52	+3%	3,09	+14%
Spermicidní gel		1%	0,08	-54%	3,18	-7%	2,98	+10%
		5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15%

* inokulováno 10³ CFU/ml autotypu 1 *Neisseria gonorrhoeae*.

VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY PRESERVCYT SOLUTION

Hodnocení konkrétních rušivých substancí, jak je uvedeno v předchozí sekci pro vzorky STM, nebylo provedeno pro vzorky PreservCyt Solution. Ale ani se neočekává, že vzorky PreservCyt Solution budou vykazovat rozdílné interferenční profily než vzorky STM, protože anatomické umístění odběru endocervikálních vzorků je identické jak pro vzorky PreservCyt Solution, tak pro vzorky STM. Dalším důvodem je to, že vzorky PreservCyt Solution podléhají přípravnému konverznímu postupu (popsanému v návodu k použití k *digene* HC2 Sample Conversion Kit), který je upraví do podobného složení jako vzorky STM.

Reziduální pufr (SCB)¹ může být přítomný ve stopovém množství v plně konvertovaných vzorcích PreservCyt Solution. Z tohoto důvodu byla provedena analytická studie, která ověřila analytický výkon testu DNA *digene* HC2 GC-ID v přítomnosti různých množství SCB. V STM byly připraveny různé koncentrace plasmidové DNA GC. Přebytečná množství SCB byla přidána do vzorků a tři alikvotní podíly z každého vzorku byly testovány a byl získán průměr RLU/CO pro každý vzorek za přítomnosti buď PreservCyt Solution, nebo SCB. Srovnání těchto průměrných hodnot RLU/CO pro každý vzorek s průměrem hodnot RLU/CO pro každý kontrolní vzorek STM vedlo k nulovému počtu falešně pozitivních výsledků nebo k falešně negativním výsledkům.

¹ Pufr je pufrovací roztok s eosinem Y a 0,05% azidu sodného, který je nutný ke konverzi vzorku PreservCyt. Viz další detaily v *digene* HC2 Sample Conversion Kit firmy QIAGEN .

PŘESNOST V HRANIČNÍ OBLASTI TESTU DNA *digene* HC2 GC-ID PŘI ZPRACOVÁNÍ KLINICKÝCH VZORKŮ UCHOVANÝCH V SUSPENZI S TRANSPORTNÍM MÉDIEM

Reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 GC-ID při zpracování vzorků odebraných do suspenze s transportním médiem byla stanovena studií využívající 30 klinických souborů (15 pozitivních a 15 negativních) připravených kombinováním již dříve denaturovaných a testovaných vzorků odebraných cervikálním kartáčkem do suspenze s transportním médiem (STM). Vzorky byly testovány ve 4 sériích po dobu pěti dnů, celkově pro každý vzorek byl test dvacetkrát opakován. K testování byl použit test DNA *digene* HC2 GC-ID. Byla vypočítána průměrná hodnota RLU/CO, 95 %ní interval spolehlivosti pro průměr (95 % interval spolehlivosti) a procentuální vyjádření positivity výsledků pro každý vzorek během pěti dnů, jak uvádí tabulka 22.

Tabulka 22. Průměrná hodnota RLU/CO s intervalem spolehlivosti a procentuální zastoupení pozitivních výsledků v testu DNA *digene* HC2 GC-ID (sestupné pořadí podle průměrné hodnoty RLU/CO).

Číslo	RLU/CO	95% interval spolehl.	% pozitivních
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)

Vzorky s průměrnou hodnotou RLU/CO 20 % a více nad hranicí positivity byly pozitivní nebo pravděpodobně pozitivní v 97 %, zatímco vzorky s průměrnou hodnotou RLU/CO 20 % a více pod hranicí positivity byly negativní ve 100 %. Tyto výsledky ukazují, že vzorky s hodnotou lišící se o 20 % a více od hranice positivity dávají spolehlivé výsledky v testu DNA *digene* HC2 GC-ID.

Vzorky s hodnotami blízko hranice positivity testu byly pozitivní i negativní: ty, jejichž hodnota se pohybovala do 20 % nad hranicí positivity, byly pozitivní nebo pravděpodobně pozitivní v 69,4 %. Vzorky do 20 % pod hranicí positivity byly negativní v 91,4 %.

Tyto závěry ukazují, že test DNA *digene* HC2 GC-ID dává reprodukovatelné výsledky při vyšetření klinických vzorků odebraných do suspenze s transportním médiem, jejichž hodnoty RLU/CO se pohybují v rozmezí do 20 % okolo hranice positivity testu.

INFORMACE O HISTORII TESTŮ

V minulosti se kromě přístroje DML 2000 k získání dat a stanovení funkční charakteristiky testu DNA *digene* HC2 GC-ID používal také luminometr Dynex Model MLX. Luminometr MLX již není k dispozici a pro odečítání výsledků je stále používán přístroj DML 2000. Následující údaje byly shromážděny v multicentrické klinické studii a posloužily ke stanovení reprodukovatelnosti pozitivního kalibrátoru a negativního kalibrátoru - jsou uvedeny níže jako historická informace.

K určení reprodukovatelnosti pozitivního kalibrátoru a negativního kalibrátoru a odhadu nutnosti provádět manuální přepočty byly shromážděny a zpracovány výsledky klinických zkoušek zahrnující 79 sérií testů DNA provedených metodou *digene* HC2 GC-ID (tabulka 23). Výsledky ukázaly, že průměrná hodnota % hranice positivity v těchto 79 sériích byla 5,79 % a žádná ze sérií testů neměla průměrné hodnoty negativního kalibrátoru přesahující 150 RLU. Pokud sledujeme 3 hodnoty opakování pozitivního kalibrátoru v každém testu, reprodukovatelnost kalibrátoru vyšší než 20 % hranice positivity byla pozorována pouze v 1 ze 79 testů (1,3 %), kde následně byla % hranice positivity přepočítána. Po korekci zůstala % hranice positivity v testu pod 15 %, což vyjadřovalo validitu všech sérií testů.

Tabulka 23. Funkční charakteristika pozitivního kalibrátoru a negativního kalibrátoru. Zpracovány údaje z multicentrické klinické studie a studie přesnosti (n = 79 sérií testů).

Přístroj	Počet sérií testů	Průměr S/N poměrů	Typ kontroly nebo kalibrátoru	Průměr vypočítaných průměrů (RLU)		Průměr vypočítaných variačních koeficientů %CV	
				3 opakování	Upraveno pro výsledky mimo rozsah	3 opakování	Upraveno pro výsledky mimo rozsah
DML2000	9	7,71	Negativní	40,300	34,470	18,960	12,240
			Pozitivní	292,370	292,370	6,670	6,670
Přístroj MLX*	70	4,52	Negativní	0,076	0,070	13,830	12,360
			Pozitivní	0,292	0,292	5,674	5,674

* již není k dispozici

EKVIVALENCE MEZI VZORKY STM A PRESERVCYT SOLUTION

Ekvivalence mezi vzorky STM a PreservCyt Solution byla zjištěna v klinickém vyšetření 1252 párovaných cervikálních vzorků. Vzorek PreservCyt Solution byl zpracován podle návodu k použití k *digene* HC2 Sample Conversion Kit a testován s párovým vzorkem STM testem DNA *digene* HC2 GC-ID. Výsledky tohoto vyšetření jsou uvedeny níže v tabulce 24. Klinická účinnost byla stanovena se zbytkovým objemem větším než 6,5 ml na vzorcích za použití roztoku PreservCyt. Testování vzorků se zbytkovým objemem od 4,0 - 6,5 ml musí být ověřeno laboratoří.

Tabulka 24. Souhrn statistických dat pro shodu testu DNA *digene* HC2 GC-ID mezi párovými cervikálními vzorky odebranými v PreservCyt Solution a STM.

Kohorta	Kapa 95% CI	Pozitivní shoda (n/N) 95% CI	Negativní shoda (n/N) 95% CI	Celková shoda (n/N) 95% CI
Exkluze dat šedé zóny	0,96	98,00 (49/50)	99,75 (1181/1184)	99,68 (1230/1234)
	0,92, 0,99	89,35, 99,95	99,26, 99,95	99,17, 99,91
Retestovací algoritmus šedé zóny	0,93	91,80 (56/61)	99,75 (1188/1191)	99,36 (1244/1252)
	0,88, 0,98	81,90, 97,28	99,27, 99,95	98,74, 99,72

*Vzorky v rozsahu 1,0 až 2,5 RLU/CO byly retestovány dvakrát. Klasifikace vzorků byla určena podle pravidla dva ze tří.

Reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 GC-ID byla součástí klinického vyšetření, aby se tak dokázalo, že lze dosáhnout ekvivalentní výsledky testu DNA *digene* HC2 GC-ID při použití panelu 20 vzorků PreservCyt Solution a testování po tři dny ve třech laboratořích. Výsledky této studie reprodukovatelnosti jsou uvedeny níže v tabulce 25.

Tabulka 25. Shoda testu DNA *digene* HC2 GC-ID v % podle centra.

Centrum	Pozorované proti Očekávané	Shoda v % (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)
Všechna centra společně	179/180	99.44 (96,94, 99,99)

*20 členů x 3 dny x 3 centra.

POUŽITÁ LITERATURA

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

CHYBY A JEJICH ODSTRANĚNÍ

Test DNA *digene* HC2 GC-ID

POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Během denaturace byla pozorována nesprávná barevná změna nebo k žádné barevné změně nedošlo.	<ul style="list-style-type: none"> Nebylo přidáno denaturační činidlo nebo bylo přidáno denaturační činidlo, které nebylo správně připravené. 	<ol style="list-style-type: none"> Zkontrolujte, zda denaturační činidlo obsahuje indikační barvivo a zda má tmavě fialovou barvu. Zkontrolujte zda bylo do vzorku přidáno denaturační činidlo tím, že změříte objem vzorku (měl by být 1,5 ml). Pokud na základě měření objemu zjistíte, že denaturační činidlo nebylo přidáno, přidejte jej v náležitém množství, zamíchejte a pokud dojde k příslušné barevné změně pokračujte v analýze.
	U vzorků, které budou obsahovat krev, může dojít k zakrytí barevné změny.	U těchto typů vzorků se neočekává, že dojde k přesně takové barevné změně, jaká je popsána; na výsledky testu by to nemělo mít žádný negativní vliv.
	pH vzorku může být neobvykle kyselé.	Vzorek může být neobvykle kyselý, a proto nedojde k očekávané barevné změně. Odeberte nový vzorek, a to ještě <u>předtím</u> , než na cervix aplikujete kyselinu octovou, protože nesprávné pH vzorku nepříznivě ovlivní výsledky testu.
Kontroly kvality poskytují nesprávné výsledky	Pro test byl vybrán nesprávný softwarový protokol	Pokud byl pro právě probíhající test zvolen nesprávný protokol, bude nutné do 30 minut po přidání detekčního činidla znovu odečíst hodnotu pro danou destičku pomocí správného protokolu.
	Obrácené umístění QC-CT a QC- GT.	Zopakovat test na vzorcích.
Během hybridizace byla pozorována nesprávná barevná změna.	<ul style="list-style-type: none"> Nedostatečné promíchání směsi sondy s denaturovaným kalibrátorem, kontrolou kvality, nebo se vzorky. Nebyla přidána směs sondy. Přidáno nesprávné množství činidla. 	Hybridizační mikrodestičku nechejte protřepat další 2 minuty. Jestliže některé jamky ještě zůstaly fialové nebo šedivé, přidejte dalších 25 µl směsi sondy a důkladně promíchejte. Jestliže k příslušné barevné změně nedojde ani po přidání sondy a protřepání a vzorek nebude obsahovat krev ani jiné materiály, otestujte vzorek znovu.
	U vzorků, které budou obsahovat krev, může dojít k zakrytí barevné změny.	U těchto typů vzorků se neočekává, že dojde k přesně takové barevné změně, jak je popsána, na výsledky testu by to však nemělo mít žádný negativní vliv.
	Ve vzorcích bylo < 1000 µl <i>digene</i> STM (<i>médium pro přenos vzorků</i>)	Zkontrolujte objem původního vzorku. Tento objem by měl být 1425 µl ± 20 µl (po odebrání 75 µl). Pokud bude objem <1405 µl, bude to znamenat, že původní vzorek obsahoval <1000 µl média pro přenos vzorků (STM). Vezměte nový vzorek.
Při analýze nebyla splněna ověřovací kritéria. U pozitivního kalibrátoru, kontrol kvality ani u vzorků nebyl pozorován žádný signál.	Do roztoku pro ředění sondy nebyla přidána žádná sonda.	Připravte směs sondy GC, a to tak, jak je to popsáno v tomto návodu k použití k soupravě, v oddíle Příprava a uskladnění činidla. Důkladně promíchejte. Zkumavku náležitě označte. Analýzu opakujte s nově připravenou směsí sondy.
	Sonda byla během přípravy kontaminována RNázou.	Při pipetování sondy používejte špičky pipet s aerosolovým filtrem a ochranné rukavice bez masky. Sondy zředit ve sterilní nádobce. Používejte pouze čisté, nové nádobky na jedno použití, které jsou určeny pro činidla.
	Nedostatečné smísení směsi sondy a roztoku pro ředění sondy.	Po přidání sondy do roztoku pro ředění sondy důkladně promíchejte (do víru) při vysoké rychlosti po dobu nejméně 5 vteřin. Na hladině se musí objevit viditelný vír.

Test DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Nedostatečné smísení zředěné sondy a denaturovaného vzorku.	Jakmile směs sondy přidáte do denaturovaného vzorku, hybridizační destičku zakryjte a pomocí rotační třepačky (<i>Rotary Shaker I</i>) nechejte protřepat po dobu 3 ± 2 při rychlosti 1100 ± 100 ot./min., jak je to popsáno v návodu k použití, v oddíle Postup testu, hybridizace, krok 6. Zkontrolujte, zda ve všech jamkách došlo k barevné změně z fialové na žlutou.
	Nesprávná doba nebo teplota během hybridizační fáze.	Proveďte hybridizaci, a to po dobu 60 ± 5 minut při teplotě 65 ± 2 °C, jak je to popsáno v návodu k použití, v oddíle Postup testu, hybridizace, krok 7. Zkontrolujte teplotu mikrodestičkového inkubátoru I (<i>Microplate Heater I</i>). Zajistěte, aby byl inkubátor nastaven tak, aby temperoval vzorky na správnou teplotu a aby byl předehřán 1 hodinu před použitím.
	Nedostatečné smísení během imobilizační fáze.	Pomocí rotační třepačky (<i>Rotary Shaker I</i>) nechejte protřepat po dobu 60 ± 5 minut při rychlosti 1100 ± 100 ot./min. a při teplotě 20 - 25 °C, jak je to popsáno v návodu, v oddíle Postup testu, hybridizace, krok 7. Pomocí kalibrace ověřte rychlost rotační třepačky I, jak je uvedeno v Příručce pro použití rotační třepačky I, v oddíle Kalibrace rychlosti třepačky.
	<ul style="list-style-type: none"> Nebylo přidáno odpovídající množství detekčního činidla 1. U inkubace nebyla dodržena stanovená doba. 	<p>Pomocí 8-kanalové pipety napipetujte do každé jamky 75 µl detekčního činidla 1.</p> <p>Nechejte inkubovat při teplotě 20 - 25 °C po dobu 30 - 45 minut.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Nebylo přidáno odpovídající množství detekčního činidla 2. U inkubace nebyla dodržena stanovená doba. 	<p>Pomocí 8-kanalové pipety napipetujte do každé jamky 75 µl detekčního činidla 2. Nechejte inkubovat při teplotě 20 - 25 °C po dobu 15 - 30 minut</p>
	Chyba funkce luminometru nebo nesprávné programování.	Postupujte podle pokynů v části údržba a odstraňování závad příslušného návodu k použití k softwaru pro příslušný test <i>digene</i> nebo kontaktujte oddělení technické podpory společnosti QIAGEN.
U kalibrátorů, kontrol kvality nebo vzorků byly zaznamenány zvýšené hodnoty RLU (v mnoha či všech jamkách byly hodnoty RLU ≥ 150). Je možné, že analýza nesplňuje ověřovací kritéria.	<ul style="list-style-type: none"> Nebylo přidáno denaturační činidlo, nebo bylo přidáno nesprávné množství činidla, nebo denaturační činidlo nebylo dostatečně smíšeno s vzorky, kalibrátorem nebo kontrolami kvality. Nesprávná teplota vodní lázně a nesprávná hladina vody. 	<ul style="list-style-type: none"> Před přidáním denaturačního činidla ověřte, zda opakovací pipeta odměňuje přesně. Používat je třeba kalibrované pipety. Do každé zkumavky přidejte polovinu objemu denaturačního činidla a dobře promíchejte. Abyste se vyhnuli falešně pozitivním výsledkům, ujistěte se, že kapalina smývá celý vnitřní povrch zkumavky (v případě manuálního mísení převraťte zkumavku dnem vzhůru). Kontroly kvality, kalibrátory a vzorky by měly po přidání denaturačního činidla zfialovět. U třepacího zařízení určeného pro více zkumavek (<i>Multi-Specimen Tube Vortexer 2</i>) zkontrolujte kalibraci rychlosti. Zkontrolujte hladinu a teplotu vody.
	<ul style="list-style-type: none"> Únik světla u luminometru. Poškozené těsnění. Dvířka nejsou těsně uzavřena. 	Zkontrolujte hodnotu pozadí (měření hrubých údajů) luminometru odečtem údajů pro prázdné jamky mikrodestičky. Pokud bude tato hodnota vyšší než 50 RLU, bude to znamenat, že dochází k úniku světla. Postupujte podle pokynů v části údržba a odstraňování závad příslušného návodu k použití k softwaru pro příslušný test nebo kontaktujte oddělení technické podpory společnosti QIAGEN
	Kontaminace detekčního činidla 2 či imobilizačních mikrojamek detekčním činidlem 1 nebo exogenní alkalickou fosfatázou.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
	Kontaminovaný promývací pufr.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.

Test DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Kontaminace automatické promývačky destiček 1.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
	Nedostatečné promytí imobilizačních mikrojamek po inkubaci s detekčním činidlem 1.	Mikrojamky důkladně šestkrát promyjte promývacím puřrem, přičemž pokaždé naplňte jamky do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček. Po vymytí by v jamkách neměla zůstat žádná růžová kapalina. Postup při ověřování, zda nedošlo ke kontaminaci nebo zda zařízení funguje správně viz <i>Návod k používání automatické promývačky destiček</i> , oddíl „Chyby a jejich odstranění“.
	Kontaminace mikrojamek detekčním činidlem 1.	Zajistěte, aby všechny pracovní plochy byly čisté a suché. Při práci s detekčním činidlem 1 postupujte opatrně. Vyvarujte se styku s aerosoly.
	Opakované vysušení (blotování) hybridizačního roztoku na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers nebo srovnatelných papírových ubrousků bez vláken. Pro vysušení byly použity nevhodné ubrousky.	Při vysušení (blotování) pomocí tamponů Kimtowels Wipers nebo papírových ubrousků bez vláken dbejte na to, abyste nepoužili opakovaně stejné místo. Pro vysušení (blotování) použijte tampóny Kimtowels Wipers či papírové ubrousky bez vláken se srovnatelnými vlastnostmi.
	Materiál kontroly kvality GC použitý jako pozitivní kalibrátor. Test neúspěšně validován.	Ujistěte se, že kalibrátory a kontroly kvality jsou správně umístěné.
Nízké hodnoty poměru PC/NC nebo velký počet vzorků s nízkou pozitivitou (>20% z celkového počtu vzorků) a s poměrem RLU/CO <2,0. Může se stát, že analýza neprojde přes ověřující kritéria.	Nedostatečná příprava vzorků.	Přidejte příslušné množství denaturačního činidla a důkladně promíchejte třepáním (do víru) (vortex). Abyste se vyhnuli falešně pozitivním výsledkům, ujistěte se, že kapalina při třepání (do víru) pomocí třepacího zařízení (Multi-Specimen Tube Vortexer 2) omývá celý vnitřní povrch zkumavky, a to po dobu minimálně 5 sekund (v případě manuálního třepání (do víru) také 5 sekund, po čemž je třeba zkumavku otočit dnem vzhůru). Přitom by se měla výrazně změnit barva z průhledné na tmavě fialovou. Proveďte inkubaci po dobu 45 ± 5 minut při teplotě 65 ± 2 °C. Při použití vzorků PreservCyt Solution, tyto hybridy se mohou nacházet na vnitřních stěnách zkumavky. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy CT/GC. Podrobnosti o postupu naleznete v návodu k použití k soupravě <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.
	Sonda je nedostatečně promísena nebo bylo pro účely analýzy přidáno nedostatečné množství sondy.	Připravte směs sondy podle návodu. Důkladně promíchejte (do víru) (vortex) a ujistěte se, že se na hladině vytvořil viditelný vír. Směs sondy je třeba přidat do jamek pomocí vícekanálové nebo opakovací pipety, aby se zajistilo přesné dávkování.
	Do jednotlivých hybridizačních jamek na mikrodestičce bylo přidáno nedostatečné množství směsi sondy.	Ověřte, že 8-kanálová pipeta dávkuje přesně před přidáním směsi sond jamek hybridizační mikrodestičky. 25 µl směsi sond by měla být přidána do deanturovaného vzorku ve spodní části každé mikrojamky. Před přidáním směsi sond do hybridizačních jamek se ujistěte, že 8-kanálová pipeta přesně dávkuje. Změna zabarvení by měla být z tmavě fialové do žluté po přidání směsi sond a důkladném protřepání.
	Detekční činidlo 1 přestalo být aktivní.	Detekční činidlo 1 uskladněte při teplotě 2-8 °C Použijte jej před vypršením doby použití, která je uvedena na štítku nalepeném na krabičce pro soupravu.

Test DNA <i>digene</i> HC2 GC-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Nedostatečná imobilizace RNA. Hybridy DNA.	Imobilizační fáze by měla být provedena s použitím rotační třepačky I nastavené na 1100 ±100 ot/min. Zkontrolujte rychlost třepačky, a to podle návodu uvedeného v návodu k použití pro rotační třepačku, v oddíle Kalibrace rychlosti třepačky.
	Nedostatečné promytí.	Jamky na mikrodestičce důkladně (šestkrát) promyjte promývacím pufrům, přičemž pokaždé naplníte jamky do přetečení, nebo použijte automatickou promývačku destiček.
	Kontaminovaný promývací pufr.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
Rady pozitivních vzorků s přibližně stejnými hodnotami RLU.	Během manipulace při analýze došlo ke kontaminaci imobilizačních mikrojamek.	Během všech inkubací zakryjte imobilizační mikrodestičku. Během analýzy zabraňte tomu, aby byly jamky na mikrodestičce kontaminovány aerosolem. Při manipulaci s materiály používejte ochranné rukavice bez mastku.
	Kontaminace detekčního činidla 2.	Dbejte na to, aby při pipetování detekčního činidla 2 do imobilizačních mikrojamek nedošlo ke kontaminaci zásobního roztoku. Zabraňte kontaminaci detekčního činidla 2 aerosoly z detekčního činidla 1 nebo z laboratorního prachu atd.
	Porucha automatické promývačky destiček I.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění nebo viz. návod k použití k automatické promývačky destiček.
Velké rozpětí u %CV mezi replikáty.	Nesprávné pipetování (tj. vzduchové bubliny, nekalibrovaná pipeta)	Zkontrolujte pipetu, zda jsou dávkovány reprodukovatelné objemy. Pipety pravidelně kalibrujte.
	Nedostatečné smíšení.	Při každé fázi důkladně promíchejte. Před a po denaturační inkubací promíchejte (do víru) (vortex). Na hladině se musí vytvořit viditelný vír.
	Neúplný přenos kapaliny z hybridizační mikrodestičky do imobilizačních mikrojamek.	Při přenosu z hybridizační mikrodestičky na imobilizační destičku dbejte na to, aby byly přeneseny reprodukovatelné objemy.
	Nevhodné podmínky pro promývání.	Jamky na mikrodestičce důkladně (šestkrát) promyjte promývacím pufrům, přičemž je pokaždé naplníte do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček a příslušný protokol pro automatickou promývačku destiček.
	Kontaminace mikrojamek detekčním činidlem 1.	Dbejte na to, aby všechny pracovní plochy byly čisté a suché. Při práci s detekčním činidlem 1 postupujte opatrně. Vyvarujte se styku s aerosoly.
	Kontaminace špičky pipety nedenaturovaným materiálem během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy GC.	Krok denaturace při postupu zpracování vzorků musí být proveden podle zde uvedených pokynů. Nesprávné míchání vzorku, obrácení zkumavky a míchání může mít za následek neúplnou denaturaci nespecifikovatelných hybridů RNA:DNA endogenních k cervikálním vzorkům. Zvláště při použití vzorků PreservCyt Solution se mohou tyto hybridy nacházet na vnitřních stěnách zkumavky. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do mikrozukavky nebo jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy GC.
	Vysušení několika řad (blotování) na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers.	Při vysušování pomocí tampónů Kimtowels Wipers, dbejte na to, abyste k vysušení nepoužívali opakovaně stejné místo.
U známých negativních vzorků byly vykázané falešně pozitivní výsledky.	Kontaminace detekčního činidla 2.	Dbejte na to, aby při přidávání detekčního činidla 2 mezi vzorky nedošlo ke zkřížené kontaminaci vzorků. Pokud používáte pouze část soupravy, než naplníte pipetu, nadávkujte do čistého zásobníku činidel alikvotní podíl, který je potřeba k provedení dané analýzy.

Test DNA *digene* HC2 GC-ID

POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Kontaminace mikrojamek detekčním činidlem 1.	Jamky na mikrodestičce důkladně (šestkrát) promyjte promývacím pufrem, přičemž pokaždé naplňte jamky do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček. Po vymytí by v jamkách neměla zůstat žádná růžová kapalina.
	Kontaminace špičky pipety nedenaturovaným materiálem během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy GC.	Krok denaturace při postupu zpracování vzorků musí být proveden podle zde uvedených pokynů. Nesprávné míchání vzorku, obrácení zkumavky a míchání může mít za následek neúplnou denaturaci nespecifikovatelných hybridů RNA:DNA endogenních k cervikálním vzorkům. Zvláště při použití vzorků PreservCyt Solution se tyto hybridy mohou nacházet na vnitřních stěnách zkumavky. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do mikrozkumavky nebo jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy GC.
	Nedostatečná příprava vzorků.	Přidejte příslušné množství denaturačního činidla a důkladně promíchejte třepáním do víru (vortexováním). Vyhněte se falešně pozitivním výsledkům tím, že zajistíte, aby kapalina při třepání do víru (vortexování) pomocí třepacího zařízení (Multi-Specimen Tube Vortexer 2) omývala celý vnitřní povrch zkumavky, a to po dobu minimálně 5 sekund (v případě manuálního třepání otočte zkumavku dnem vzhůru). Přitom by se měla výrazně změnit barva z průhledné na tmavě fialovou. Následně nechejte inkubovat při teplotě 65 ± 2 °C po dobu 45 ± 5 minut. Při použití vzorků PreservCyt Solution, tyto hybridy se mohou nacházet na vnitřních stěnách zkumavky. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy CT/GC. Podrobnosti o postupu naleznete v návodu k přípravě k soupravě <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.
	Nevhodné podmínky pro promývání.	Jamky na mikrodestičce důkladně šestkrát promyjte promývacím pufrem, přičemž je pokaždé naplňte do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček a příslušný protokol pro automatickou promývačku destiček.
U negativního kalibrátoru zaznamenány zvýšené hodnoty RLU (>150 RLU). Jinak analýza probíhá podle očekávání.	Inkubace detekčního činidla 2 byla provedena při teplotě vyšší než 20-25 °C.	Test je neplatný, protože u kalibrátorů byly zaznamenány vysoce negativní hodnoty. Proveďte test znovu a zajistěte, aby inkubace během imobilizační a detekční fáze byla provedena při teplotě 20 - 25 °C.
	Inkubace detekčního činidla 2 trvala déle než 30 minut.	Po 15 minutách inkubace (nejpozději po 30 minutách inkubace) při 20 - 25 °C přečtěte údaj pro destičku.
	Detekční činidlo 2 nebo promývací pufr byly kontaminovány alkalickou fosfatázou nebo detekčním činidlem 1.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.

Testování na kontaminaci

Zvýšená hodnota čidla	Postup testování na kontaminaci	Interpretace výsledků
<p>Poznámka: Aby se zamezilo kontaminaci, postupujte opatrně při pipetování detekčního čidla 2. Použít rukavice a zamezit dotyku špičky pipety s pracovní plochou.</p>		
Detekční čidlo 2	<ul style="list-style-type: none"> Napipetovat 75 µl alikvótní, zbývající část nebo z originální ampulky detekčního čidla 2 do prázdné jamky v imobilizační mikrodestičce. Inkubovat 20 - 25 °C po dobu 15 minut. Nevystavovat přímému světlu. Odečíst výsledky jamky mikrodestičky pomocí luminometru. <p>Poznámka: Optimální hodnocení účinnosti je dosaženo testováním detekčního čidla 2 na 3 replikacích.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola detekčního čidla 2 musí být < 50 RLU. Jestliže jsou hodnoty detekčního čidla 2 < 50 RLU, lze detekční čidlo 2 použít k opakování testu. Pokud je kontaminováno (>50 RLU), použít novou soupravu a zopakovat test.
Promývací přístroj nebo zdroj vody	<ul style="list-style-type: none"> Napipetovat 75 µl detekčního čidla 2 do 4 zvláštních jamek v imobilizační mikrodestičce. Jamky označit 1 - 4. Jamka 1 slouží jako kontrola detekčního čidla 2. Napipetovat 10 µl promývacího pufru z promývací láhve do jamky 2. Počkat, až se promývací pufr dostane do promývacích hadic. Napipetovat 10 µl promývacího pufru z hadic do jamky 3. Díl použité vody použít k přípravě promývacího pufru. Napipetovat 10 µl této vody do jamky 4. Inkubovat při 20 - 25 °C po dobu 15 minut. Nevystavovat přímému světlu. Odečíst výsledky jamek mikrodestičky pomocí luminometru. 	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola detekčního čidla 2 (jamka 1) musí být < 50 RLU. Porovnat hodnoty RLU z jamek 2, 3 a 4 s hodnotou RLU kontroly detekčního čidla 2 (jamka 1). Jednotlivé hodnoty RLU jamek 2, 3 a 4 nesmí překročit 50 RLU hodnoty RLU kontroly detekčního čidla 2 (jamka 1). Hodnoty překračující 50 RLU kontroly detekčního čidla 2 zamenají kontaminaci. Pokyny k vyčištění a údržbě promývacího přístroje naleznete v části Příprava čidel a jejich uskladnění.
Automatická promývačka destiček	<ul style="list-style-type: none"> Napipetovat 75 µl detekčního čidla 2 do 5 zvláštních jamek v imobilizační mikrodestičce. Jamky označit 1 - 5. Jamka 1 slouží jako kontrola detekčního čidla 2. Napipetovat 10 µl promývacího pufru z láhve promývačky označené jako <i>Promývání (Wash)</i> do jamky 2. Napipetovat 10 µl tekutiny na vyplachování z láhve promývačky označené jako <i>Vyplachování (Rinse)</i> do jamky 3. Stisknout tlačítko „Prime“ na klávesnici promývačky destiček, tím promývací pufr proteče řádky. Napipetovat 10 µl proteklého promývacího pufru do jamky 4. Stisknout tlačítko „Rinse“ na klávesnici promývačky destiček, tím se vyplachovací roztok dostane do řádků. Napipetovat 10 µl proteklého promývacího pufru do jamky 5. Zakrýt a inkubovat po dobu 15 minut při 20 - 25 °C. Nevystavovat přímému světlu. Odečíst výsledky jamek mikrodestičky pomocí luminometru. 	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola detekčního čidla 2 (jamka 1) musí být < 50 RLU. Porovnat hodnoty RLU z jamek 2, 3, 4 a 5 s hodnotou RLU kontroly detekčního čidla 2 (jamka 1). Jednotlivé hodnoty RLU jamek 2, 3, 4 a 5 nesmí překročit 50 RLU hodnoty RLU kontroly detekčního čidla 2 (jamka 1). Hodnoty překračující 50 RLU kontroly detekčního čidla 2 zamenají kontaminaci promývačky destiček. Viz Postup dekontaminace návodu k použití automatické promývačky destiček Automated Plate Washer.

KONTAKTY NA SPOLEČNOST QIAGEN

K tomuto výrobku je přiložen seznam kontaktů pro případ, že bude potřeba kontaktovat nejbližšího zástupce společnosti QIAGEN .

QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] a Rapid Capture[®] jsou registrovanými ochrannými známkami firmy QIAGEN.

Technika Hybrid Capture je chráněna Evropským patentem č. 0 667 918, registrovaným v Rakousku, Belgii, Švýcarsku, Lichtenštejnsku, Německu, Dánsku, Španělsku, Francii, Spojeném království, Řecku, Irsku, Itálii, Lucembursku, Holandsku a Švédsku.

U.S. patentová čísla pro Hybrid Capture jsou:6,228,578B1

Uznání ochranných známek:

ThinPrep[®] and PreservCyt[®]: Hologic Corporation
Kimtowels[®]: Kimberly-Clark Corporation
Eppendorf[®] and 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.

SHRnutí PRO TEST DNA *digene* HC2 GC-ID

Důležité: Je nutné, abyste se před použitím tohoto souhrnu důkladně seznámili s podrobnostmi celého postupu.

	POSTUP	
Denaturace (Vzorky PreservCyt Solution, viz Postup přípravy vorků PreservCyt Solution)	Manuální třepání (do víru) (vortex) Vytvořte rozvržení na destičce. Označte hybridizační destičku. Připravte denaturační činidlo. ↓ Napipetujte denaturační činidlo (v množství, které odpovídá polovině objemu vzorku) do kontrol kvality, kalibrátoru a vzorků. Každou kontrolu kvality, kalibrátor a vzorek jednotlivě promíchejte (do víru) (vortex), a to po dobu 5ti vteřin při vysoké rychlosti, a zkumavky následně otočte dnem vzhůru (podrobnější informace viz tento návod k použití). Zkontrolujte, že se všechny zkumavky zbarvily do fialova. ↓ Proveďte inkubaci při 65 ± 2 °C po dobu 45 ± 5 minut. ↓ Připravte směs sondy GC. ↓ ↓ ↓ ↓	Pomocí třepacího zařízení pro více zkumavek (Multi-Specimen Tube Vortexer 2) Vytvořte rozvržení na destičce. Označte hybridizační destičku. Připravte denaturační činidlo. ↓ Napipetujte denaturační činidlo (v množství, které odpovídá polovině objemu vzorku) do kontrol kvality, kalibrátoru a vzorků. Zkontrolujte, že se všechny zkumavky zbarvily do fialova. ↓ Zakryjte stojan fólií a víkem. ↓ Důkladně promíchejte (do víru) (vortex) při maximální rychlosti. ↓ Nechejte inkubovat při teplotě 65 ± 2 °C po dobu 45 ± 5 minut. ↓ Připravte směs sondy GC. ↓ ↓
Hybridizace	Denaturované vzorky důkladně promíchejte a následně pipetujte 75 µl denaturovaného vzorku, kalibrátoru nebo kontroly kvality do příslušné jamky na mikrodestičce. ↓ Nechte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 10 minut. ↓ Napipetujte 25 µl směsi sondy GC do jamek na mikrodestičce. ↓ Zakryjte mikrodestičku víkem a třepejte na rotační třepečce I při rychlosti 1100 ± 100 ot/min po dobu 3 ± 2 minut. <i>Zkontrolujte, zda se všechny zkumavky zbarvily dožluta.</i> (Vzorky PreservCyt Solution se zbarví do žluta). ↓ Nechejte inkubovat při teplotě 65 ± 2 °C po dobu 60 ± 5 minut. ↓ Připravte imobilizační mikrodestičku.	
Imobilizace hybridu	Obsah z jednotlivých jamek hybridizační destičky přeneste pomocí 8-kanálové pipety do příslušné jamky imobilizační mikrodestičky. ↓ Destičku zakryjte příslušným víkem nebo fólií. ↓ Protřepejte při rychlosti 1100 ± 100 ot/min, při teplotě 20-25 °C po dobu 60 ± 5 minut. Připravte promývací pufr. ↓ Imobilizační mikrodestičku slijte a vysušte (blotujte) (podrobnější informace viz tento návod k použití). ↓	
Detekce hybridu	Do každé jamky imobilizační mikrodestičky napipetujte 75 µl detekčního činidla 1. Imobilizační mikrodestičku zakryjte příslušným víčkem, fólií Parafilm nebo jinou fólií se srovnatelnými vlastnostmi. Nechejte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 30 - 45 minut. Promyjte destičku za použití jedné z níže uvedených metod. ↓	
Promývání	Manuální promývání Proveďte dekantaci a vysušte (blotujte) imobilizační mikrodestičku (podrobnější informace viz návod přiložený k sadě). ↓ Šestkrát promyjte. ↓ Vysušte (blotujte) pomocí papírových ubrousků bez vláken. ↓	Promývání pomocí automatické promývačky destiček Umístěte destičku na promývačku a stisknutím tlačítka „START/STOP“ ji uveďte do chodu. ↓ ↓ ↓ ↓
Amplifikace signálu	Do každé jamky imobilizační mikrodestičky napipetujte 75 µl detekčního činidla 2. Přikryjte víčkem. Nechte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 15-30 minut. ↓	
Přečtení hodnot	Na luminometru schváleném společností QIAGEN odečtěte výsledky pro imobilizační destičku. ↓ Potvrďte platnost analýzy a proveďte interpretaci výsledků pro vzorky.	