

HC

Hybrid Capture<sup>®</sup> 2

GC-ID DNA Test

Käyttöohjeet

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

Kemiluminesenssikuoppalevyllä suoritettava signaalin vahvistava *in vitro* nukleiinihappohybridisaatiomääritys *Neisseria gonorrhoeae* (GC) DNA:n kvalitatiiviseksi osoittamiseksi kohdunkaulanäytteistä.

Käytettäväksi yhdessä seuraavien kanssa:

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

## TÄRKEIMMÄT MUUTOKSET EDELLISEEN PAKKAUSSELOSTEESEEN

1. Päivitetty tuotenimi
2. Päivitetty refleksikoeviitteet ja tiedot.

Vain koulutetun ja laillistetun laboratoriohenkilöstön ammattikäyttöön. Lue nämä ohjeet huolellisesti ennen kokeen käyttöä.



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



QIAGEN GmbH  
 QIAGEN Str. 1  
 D-40724 Hilden  
 Germany

©2011 QIAGEN



CE-merkintä on osoitus siitä, että digene HC2 GC-ID DNA Test -koe täyttää *in vitro* diagnostiseen käyttöön tarkoitetuista lääkinnällisistä laitteista annetun direktiivin (98/79/EY).

IVD



96

REF 5140-1330

L2172FI Rev. 3

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>NIMI JA KÄYTTÖTARKOITUS</b> .....	<b>1</b>
<b>TIIVISTELMÄ JA SELITYKSET</b> .....	<b>1</b>
<b>MENETELMÄN PERIAATE</b> .....	<b>1</b>
<b>PAKKAUKSEEN SISÄLTÄVÄT REAGENSIT JA MATERIAALIT</b> .....	<b>3</b>
<b>TARVITTAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY PAKKAUKSEEN</b> .....	<b>4</b>
<b>VAROITUKSET JA VAROTOIMET</b> .....	<b>5</b>
TURVALLISUUSVAROTOIMET .....	5
TIETOJA TURVALLISUUS- JA TERVEYSVAAROISTA.....	6
KÄSITTELYÄ KOSKEVAT VAROTOIMET .....	7
<b>REAGENSIN VALMISTAMINEN JA SÄILYTYS</b> .....	<b>7</b>
<b>NÄYTTEIDEN OTTAMINEN JA KÄSITTELY</b> .....	<b>10</b>
KOHDUNKAULANÄYTTEET STM:SSÄ .....	10
KOHDUNKAULANÄYTTEET HOLOGIC PRESERVCYT -LIUKSESSA .....	10
<b>KOEMENETELMÄ</b> .....	<b>11</b>
RAPID CAPTURE SYSTEM -JÄRJESTELMÄN KÄYTTÖ LUKUISIEN NÄYTTEIDEN TEHOTESTAAMISESSA .....	11
MANUAALINEN MENETELMÄ.....	11
DENATUROIINTI .....	12
Kalibraattorit, Laatukontrollit Ja STM-Näytteiden Valmistusmenetelmä .....	12
PreservCyt-Liuosnäytteiden Valmistusmenetelmä .....	14
Vaihtoehtoinen Pysähtymiskohta .....	17
HYBRIDISAATIO .....	17
HYBRIDINSIEPPAUS.....	18
HYBRIDIEN DETEKOINTI .....	19
PESEMINEEN .....	19
Automaattinen Kuoppalevypesuri -Menetelmä .....	19
Manuaalinen Pesumenetelmä .....	20
SIGNAALIN VAHVISTUS .....	21
<b>ANALYYSIN KALIBROINNIN VERIFIOINTIKRITEERIT</b> .....	<b>21</b>
<b>RAJA-ARVON LASKENTA</b> .....	<b>23</b>
<b>LAADUNTARKKAILU</b> .....	<b>23</b>
<b>NÄYTETULOSTEN TULKINTA</b> .....	<b>24</b>
<b>MENETELMÄN RAJOITUKSET</b> .....	<b>24</b>
<b>ODOTETTAVISSA OLEVAT TULOKSET</b> .....	<b>25</b>
YLEISYYS .....	25
POSITIIVISET JA NEGATIIVISET PREDIKTIIVISET ARVOT .....	25
FREKVENSISIJAKAUMA: <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST -KOEEN RLU/CO-TULOKSET .....	26
<b>SUORITUSARVOT</b> .....	<b>27</b>
KLIINISEN TUTKIMUKSEN TULOKSET NÄYTTEEN MUKAAN.....	27
TOISTETTAVUUS .....	30
TARKKUUS .....	31
PreservCyt-Näytteiden Tarkkuus.....	32
ANALYYTTINEN HERKKYYS .....	33
PreservCyt-Näytteiden Muita Tietoja .....	34
ANALYYTTINEN SPESIFISYYS .....	36
KOETTIMIEN VASTAAVUUS KOKONAISPLASMI- JA GENOMIPERÄISEN DNA:N KANSSA.....	38
VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS STM-NÄYTTEISIIN .....	38
VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS PRESERVCYT-NÄYTTEISIIN .....	39
<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST -KOEEN RAJA-ARVON TARKKUUS STM- NÄYTTEENKULJETUSAINEESEEN KERÄTYILLÄ KLIINISILLÄ NÄYTTEILLÄ.....	39
HISTORIATIE TOA.....	40
STM- JA PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VASTAAVUUSTIEDOT .....	40
<b>KIRJALLISUUS</b> .....	<b>42</b>
<b>VIANETSINTÄOPAS</b> .....	<b>43</b>
KONTAMINAATIO TARKISTUS .....	47
<b>QIAGEN N YHTEYSTIEDOT</b> .....	<b>48</b>
<b>YHTEENVETO <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST -KOEESTA</b> .....	<b>49</b>

## NIMI JA KÄYTTÖTARKOITUS

*digene*<sup>®</sup> Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (HC2) GC-ID DNA -koe on kemiluminesenssikuoppalevyllä suoritettava signaalin vahvistava *in vitro* nukleiinihappohybridisaatiomääritys *Neisseria gonorrhoeae* DNA:n kvalitatiiviseksi osoittamiseksi kohdunkaulanäytteistä, jotka on kerätty *digene* HC2 DNA -näytteenottimella [joka koostuu kohdunkaulaharjasta ja *digene* Specimen Transport Medium (STM) –näytteenkuljetusaineesta] ja kohdunkaulanäytteistä, jotka on kerätty *digene* Female Swab Specimen Collection -välinepakkauksella (vanutuppo ja STM) tai näytteistä, jotka on kerätty harjamaisella keräysvälineellä ja asetettu Hologic PreservCyt<sup>®</sup> -liuokseen. *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe on tarkoitettu käytettäväksi symptomaattisilla tai asympytomaattisilla naisilla osoittamaan *Neisseria gonorrhoeae* (GC) -infektio.

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

*In vitro* diagnostiseen käyttöön IVD

## TIIVISTELMÄ JA SELITYKSET

*Neisseria gonorrhoeae* -bakteerit ovat liikkumattomia, gramnegatiivisia diplokokkeja, joiden kasvuaatimukset ovat melko monimutkaiset. Ne ovat aerobisia bakteereja ja niiden kasvu on optimaalista lämpötila-alueella 35–37 °C, ympäristön CO<sub>2</sub>-pitoisuuden ollessa 3–7 % ja ilman suhteellisen kosteuden ollessa ≥70 %. Perinteisesti presumptiivinen *Neisseria gonorrhoeae* -diagnoosi on saatu eristämällä organismit kliinisistä näytteistä tehdyistä viljelyistä ja käyttämällä gramvärjäystä morfologisessa tutkimuksessa. Definiivinen diagnoosi saadaan viljelystä tehdyllä positiivisella oksidaasikokeella ja/tai katalaasikokeella. Lisävahvistusta tuloksille saadaan mm. hiilihydraattidegradaatio-, agglutinaatio- ja sokerinkäymiskokeilla. Definiivisempiin, suoriin *Neisseria gonorrhoeae* -kokeisiin kuuluu mm. antigeenien detekointi ja nukleiinihappokoe. Entsyymisidonnaisen immunoabsorbenttimäärityksen on osoitettu olevan yhtä herkkä ja yhtä spesifinen kuin gramvärjäyksenkin detekointiaessa gonokokkibakteereja miehen virtsaputkesta ja ensivirtsanäytteistä otetuista näytteistä, mutta sen herkkyys ei ole yhtä hyvä, kun kohteena ovat endoservikaalinäytteet.<sup>1,2</sup> Koska antigeenidetekointikoe voi reagoida ristiin kommensaalisten *Neisseria*-bakteerien ja niille sukua olevien lajien kanssa<sup>3</sup>, tätä koetta ei voi käyttää muuhun kuin presumptiivisen diagnoosin tekemiseen.<sup>3</sup>

Tuoreemmissa tapauksissa nukleiinihappo-hybridisaatikokeita on käytetty arvioitaessa kliinisten näytteiden *Neisseria gonorrhoeae* -bakteerien esiintymistä erittäin riskialttiisiin populaatioihin kohdistuvissa selvityksissä, joissa on käytetty sekä endoservikaalinäytteitä että miehiltä otettuja uretraalinäytteitä.

## MENETELMÄN PERIAATE

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

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

GC-koetin sisältää koetinseoksen, joka on nimenomaan valittu eliminoimaan tai minimoimaan ristiin reagoivien sellaisten DNA-sekvenssien kanssa, jotka ovat peräisin ihmisluista, muista bakteerilajeista tai muista *Neisseria*-lajeista kuin *Neisseria gonorrhoeae*. *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen mukana toimitettu GC-koetin on komplementaarinen n. 9 700 bp:n (0,5 %) *Neisseria gonorrhoeae* genomiseen DNA:han nähden ( $1,9 \times 10^6$  bp).<sup>4</sup> Yksi koetin on komplementaarinen 4200 bp:n (100 %) kryptiseen plasmidiin nähden.

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

## PAKKAUKSEEN SISÄLTÄVÄT REAGENSIT JA MATERIAALIT

Yksi *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koepakkaus sisältää 96 koetta (REF 5140-1330). Potilastulosten määrä vaihtelee pakkauksen käyttömäärästä riippuen:

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

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

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

# TARVITAVAT MATERIAALIT, JOTKA EIVÄT SISÄLLY PAKKAUKSEEN

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

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

Hybrid Capture System Rotary Shaker I -

Hybridinsiippausjärjestelmän tasoravistin I

Hybrid Capture System Microplate Heater I -

Hybridinsiippausjärjestelmän kuoppalevyn lämmitin I

Hybrid Capture System Automated Plate Washer

Hybridinsiippausjärjestelmän automaattinen kuoppalevypesuri

Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 or 2 (Optional)<sup>B</sup> Hybridinsiippausjärjestelmän moninäyteputkivortexi 1 tai 2 (lisävaruste)<sup>B</sup>

Konversioteline ja telineen kansi (lisävaruste manuaaliseen käyttöön: tarvitaan käytettäessä Rapid Capture -järjestelmää *digene* HC2 GC-ID DNA Test- ja PreservCyt-näytteiden kanssa)

*digene*-näyteteline ja telineen kansi (lisävaruste manuaaliseen käyttöön: tarvitaan käytettäessä Rapid Capture -järjestelmää *digene* HC2 CT-ID Test- ja *digene* HC2 -näytteiden kanssa, jotka on kerätty *digene* HC2 DNA -näytteenottimella)

EXPAND-4 Pipettor and Stand (optional)<sup>C</sup> - EXPAND-4 -pipetti ja teline (lisävaruste)

*digene* HC2 DNA -näytteenotin<sup>D</sup>

*digene* Female Swab Specimen Collection Kit - Hybridinsiippausjärjestelmään sisältyvä naispotilaan vanutupponäytteiden keräilypakkaus (koostuu kahdesta vanutuposta ja *digene* Specimen Transport Medium<sup>TM</sup> -näytteenkuljetusaineesta)<sup>D</sup>

Tube Sealer Dispenser and cutting device - Putkentiivisteiden annostelija ja leikkuri (lisävaruste, käytetään MST Vortexer 2:ssa)

Rapid Capture System - Rapid Capture<sup>E</sup> -järjestelmä (lisävaruste suurten näytemäärien tehostamiseen)<sup>E</sup>

Pesulaite

Hybridisaatiokuoppalevyt

Kuoppalevyn kannet

Tyhjät kuoppalevyluskat (toimittaja Costar, mallinro 2581); lisävaruste käytettäväksi automaattisen kuoppalevypesuri I:n kanssa

Erikoispitkät pipetinkärjet näytteen siirtämiseen

Näytteenottoputket

Näytteenottoputkikelit

Näytteenottoputkien kierrekorkit

Kertakäyttöiset reagenssialtaat

DuraSeal<sup>®</sup>-putkentiivistekalvo

### Yleisiä laboratorioissa käytettäviä laitteita ja tarvikkeita

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

Mikrosentrifugi (lisävaruste koetinpullojen sentrifugointiin maksimaalisen koetintilavuuden saamiseksi)

Astially varustettu vortekssekoitin

Yksikanavainen mikropipetti (mikroannostelija); muunneltavat asetukset 20–200 µl:n ja 200–1000 µl:n tilavuuksille

Sarja-annosteleva täsmämäntäpipetti, kuten esim. Eppendorf Repeater<sup>®</sup> -pipetti tai vastaava

8-kanavainen pipetti: muunneltavat asetukset 25–200 µl:n tilavuuksille

Ajastin

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

Parafilm<sup>®</sup> tai vastaava

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

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

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

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

Kertakäyttöinen pöytäsuojus

Puuterittomat suojakäsineet

5 ml:n ja/tai 15 ml:n painokorkilliset, pyöreäpohjaiset polypropeeniputket (koettimen laimennukseen)

Korkilliset 2,0 ml:n polypropyleeniset mikrosentrifugiputket

### Lisälaitteet ja -varusteet PreservCyt-liuosnäytteen prosessointiin

Swinging Bucket Centrifuge -sentrifugi, jonka suurin nopeus on 2900±150 x g ja johon mahtuu 10 ml:n tai 15 ml:n kartiopohjaisia polypropeeniputkia

5 ml:n serologiset pipetit tai siirtopipetit

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

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

#### Manuaaliseen vorteksimenetelmään:

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

Näyteputkikelit, johon mahtuu 10 ml:n tai 15 ml:n kartiopohjaisia putkia

#### Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmään

*digene* HC2 -näytteenkonversioputket (15 ml:n kartiopohjaiset)<sup>F</sup> Moninäyteputkien (MST) vortexi 2 Konversioteline ja telineen kansi (vain 15 ml:n kartiopohjaisille putkille)

Putkentiivisteiden annostelija ja leikkuri

DuraSeal-putkentiivistekalvo (käytetään MST Vortexer 2:ssa)

<sup>A</sup> QIAGEN toimittaa vain laitteita ja varusteita, jotka on validoitu käytettäväksi *digene* HC2 CT/GC DNA -kokeiden kanssa.

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

- <sup>C</sup> Käyttäjakohtainen varuste. Muita käyttäjän laajennettavissa olevia monikanavapipettejä voidaan käyttää, mikäli karkiväliksi säädettäessä saadaan 3,2 cm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää yksikanavapipettä, jonka annostelukapasiteetti on 75 µl.
- <sup>D</sup> *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suoritusarvot on määritetty vain tässä mainittuja näytteenottopakkauksia käyttäen.
- <sup>E</sup> Ks. *Rapid Capture* -järjestelmän käyttöopas liittyen ko. järjestelmän käyttämiseen lukuisien näytteiden tehostaamisen yhteydessä tätä määritysmenetelmää käytettäessä.
- <sup>F</sup> Käytettävä QIAGEN n toimittamia *digene* HC2 -näytteenkonversioputkia (VWR tai Corning® -merkkisiä), sen varmistamiseksi, että analyysi sujuu suunnitellusti moninäyteputkivortexi 2 –menetelmää käytettäessä.

## **VAROITUKSET JA VAROTOIMET**

OHJEET LUETTAVA HUOLELLISESTI ENNEN KOKEEN KÄYTTÖÄ.

### **TURVALLISUUSVAROTOIMET**

KAIKKIA NÄYTTEITÄ täytyy pitää mahdollisina tartuntalähteinä. Mikään tunnettu testausmenetelmä ei pysty antamaan täyttä varmuutta siitä, että näytteet eivät levittäisi tartuntaa. Ihmisestä peräisin olevia näytteitä suositellaan käsiteltäväksi asianmukaisten kansallisten/alueellisten biologista turvallisuutta koskevien käytäntöjen mukaisesti.<sup>5,6,7,8</sup> Tätä biologista turvallisuutta koskevaa käytäntöä tulee soveltaa materiaaleihin, jotka sisältävät tai joiden epäillään sisältävän tartunnanaiheuttajia. Vähintään seuraavat menettelyt kuuluvat tällaisiin varotoimiin:

1. Älä pipetoi suun avulla.
2. Älä tupakoi äläkä syö tai juo tiloissa, joissa käsitellään reagensseja tai näytteitä.
3. Reagenssien tai näytteiden käsittelyssä on käytettävä kertakäyttöisiä puuterittomia suojakäsineitä. Kokeen suorittamisen jälkeen kädet on pestävä huolellisesti.
4. Kaikki näytteistä peräisin olevat roiskeet tulee puhdistaa ja desinfioida tuberkulosidisella (esim. 0,5 % v/v natriumhypokloriitilla) tai muulla sopivalla desinfiointiaineella.<sup>9,10</sup>
5. Kaikki näytteet, reagenssit ja muut mahdollisesti saastuneet materiaalit tulee dekontaminoida ja hävittää kansallisten ja paikallisten säännösten edellyttämällä tavalla.<sup>11,12</sup>

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

## TIETOJA TURVALLISUUS- JA TERVEYSVAAROISTA

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



T

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

R25: Myrkyllistä nieltynä.

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

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

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



C

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

R35: Aiheuttaa vakavia palovammoja.

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

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

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



Xi

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

R36/38: Ärsyttää silmiä ja ihoa.

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

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

HÄTÄTIETOJÄRJESTELMÄ (24 H)

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


**MAINZIN MYRKYTYSTIETOKESKUS SAKSASSA**

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


**Ks. lukuisien näytteiden tehotestaamiseen liittyviä lisävaroituksia ja varotoimenpiteitä *Rapid Capture -järjestelmän käyttöoppaasta.***



## KÄSITTELYÄ KOSKEVAT VAROTOIMET

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

## REAGENSSEIEN VALMISTAMINEN JA SÄILYTYS

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

Ks. GC-koetinseoksen, pesupuskuritiivisten, detekointireagenssi 1:n ja detekointireagenssi 2:n valmistamiseen liittyviä käyttöohjeita *Rapid Capture -järjestelmän käyttöoppaasta*, sillä ko. ohjeet koskevat nimenomaan tilanteita, joissa järjestelmää käytetään suuria lukumääriä käsittävien näytteiden tehostamiseen.

### Reagenssien valmistusmenetelmä

<p><b>Denaturointi-reagenssi</b></p>	<p><b>VALMISTA ENSIN:</b> Lisää denaturointireagenssipullon viisi tippaa osoitinväriä ja sekoita hyvin. Denaturointireagenssin tulee olla väriltään tasaisen tummanvioletti.</p> <p>Valmis denaturointireagenssi pysyy stabiilina kolmen kuukauden ajan säilytettynä 2–8 °C:n lämpötilassa. Varusta uudella viimeinen käyttöpäivä -merkinnällä. Jos väri heikkenee, lisää kolme tippaa osoitinväriä ja sekoita perusteellisesti ennen käyttöä.</p> <p><b>Varoitus:</b> Denaturointireagenssi on syövyttävää. Käytettävä tarkoituksenmukaista suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Noudata varovaisuutta käsitteilyn aikana.</p>																		
<p><b>GC -koetinseos (valmistettu GC-koettimen ja koettimen laimentimen reagensseista)</b></p>	<p><b>VALMISTA NÄYTTEEN DENATUROINTI-INKUBAATION AIKANA:</b></p> <p><b>TÄRKEÄÄ: KOETIN TARTTUU JOSKUS PULLON KANTEEN.</b></p> <p><b>Huom.:</b> Noudata tässä vaiheessa koettimen ja koetinseoksen ribonukleasikontaminaation estämiseksi <b>äärimmäisen suurta huolellisuutta</b>. Käytä koettimen pipetointiin aerosolin estäviä pipetinkärkiä. Koettimen laimennin on tahmeaa. <b>Varmista, että GC-koetinseosta valmistettaessa sekoitus suoritetaan huolellisesti. Sekoittamisvaiheessa tulee nesteeseen muodostua näkyvä pyörre. Riittämätön sekoittuminen voi johtaa heikentyneeseen signaaliin.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sentrifugoi GC-koetinpulloa hetken ajan, jotta neste saadaan pullon pohjalle. Napauta kevyesti, jotta sekoittuisi.</li> <li>• Määritä tarvittavan koetinseoksen määrä (25 µl/koe). Koetinseosta suositellaan valmistettavan sen verran enemmän, että voidaan korvata se määrä, joka mahdollisesti häviää pipetin kärkiin tai pullon reunoihin. Ks. ehdotetut tilavuudet alla olevasta luettelosta. Suositeltava vähimmäismäärä kaivoja kutakin käyttöä kohti on 24. Jos halutaan käyttää vähemmän kuin 24 kaivoa analyysiä kohti, testien kokonaismäärä pakkausta kohden saattaa jäädä pienemmäksi sekä koettimen että koettimen laimentimen riittämättömyyden vuoksi.</li> <li>• Siirrä tarvittava määrä koettimen laimenninta uuteen kertakäyttöiseen astiaan. Kokeiden määrästä riippuen suositellaan joko 5 ml tai 15 ml painokorkillisia, pyöreäpohjaisia polypropeeniputkia. Valmista 1:25 laimennus GC-koetinta koettimen laimentimeen koetinseoksen valmistamista varten.</li> </ul> <table border="1" data-bbox="446 1348 1339 1516"> <thead> <tr> <th><u>Kokeiden/liuskojen lkm</u></th> <th><u>Koettimen laimentimen tilavuus*</u></th> <th><u>Koettimen tilavuus*</u></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>Kaivoa kohti</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Näihin arvoihin sisältyy suositeltu ylimäärä.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetoi koetin koettimen laimentimeen asettamalla pipetin kärki putken sisäseinää vasten aivan kuperan linssin yläpuolelle ja tyhjennä sisältö. <b>Älä upota kärkeä koettimen laimentimeen.</b></li> <li>• Vorteksoi vähintään 5 sekunnin maksiminopeudella, jotta sekoittuminen olisi perusteellinen. <b>Näkyvä pyörre tulee muodostua.</b> Varusta "GC-koetinseos"-merkinnällä ja säilytä suljetussa astiassa kunnes se käytetään. <b>Käyttämätön koetinseos tulee hävittää.</b></li> </ul>	<u>Kokeiden/liuskojen lkm</u>	<u>Koettimen laimentimen tilavuus*</u>	<u>Koettimen tilavuus*</u>	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Kaivoa kohti	0,045 ml	1,8 µl
<u>Kokeiden/liuskojen lkm</u>	<u>Koettimen laimentimen tilavuus*</u>	<u>Koettimen tilavuus*</u>																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
Kaivoa kohti	0,045 ml	1,8 µl																	

<b>Pesupuskuri</b>	<p><b>VALMISTA SIEPPAUSVAIHEESSA:</b>  <b>Hybridinsieppausjärjestelmän automaattisen kuoppalevypesuri</b> pesupuskuri voidaan valmistaa alla kuvatulla tavalla ja säilyttää kannellisessa astiassa tai valmistaa 1 litra kerrallaan ja panna se automaattisen kuoppalevypesuri säiliöihin. Ks. alla olevassa taulukossa annettavat sekoitetilavuudet:</p> <p><b>Automaattisen kuoppalevypesuri hoito- ja ylläpito-ohjeet on esitetty laitteen käyttöoppaassa.</b></p> <p><b>Varoitus:</b> Pesupuskuritiiviste on myrkyllistä nieltynä. Käytettävä tarkoituksenmukaista suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Minimoi altistumista tiivisteelle lisäämällä siihen vettä valmistuksen yhteydessä.</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Pesupuskuritiivisten <u>määrä</u></th> <th style="text-align: center;">Tislattun tai deionisoidun <u>veden määrä</u></th> <th style="text-align: center;">Pesupuskurin <u>lopullinen määrä</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1.933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2.900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Huom.:</b> On erittäin tärkeää, että automaattinen kuoppalevypesuri pidetään aina päälle kytkettynä. Tällöin kunnossapitohuuhdeltu käynnistyy automaattisesti, kun laitetta ei ole käytetty kahdeksaan tuntiin.</p> <p><b>Ennen jokaista tutkimusta on varmistettava, että laitteen jätesäiliö on tyhjä ja että huuhteluallas on täytetty tislattulla tai deionisoidulla vedellä.</b></p> <p>Automaattisen kuoppalevypesurin hoito- ja ylläpito-ohjeet on esitetty laitteen käyttöoppaassa.</p> <p><b>Kuoppalevyn manuaalista pesumenetelmää varten:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekoita pesupuskuritiiviste huolellisesti.</li> <li>• Laimenna pesulaitteessa 100 ml pesupuskuritiivistettä 2,9 litraan deionisoitua vettä ja sekoitetaan hyvin (lopullisen määrän tulee olla 3 litraa).</li> <li>• Sulje säiliö tiiviisti kontaminaation ja haihtumisen estämiseksi</li> </ul> <p>Valmis pesupuskuri pysyy stabiilina kolmen kuukauden ajan säilytettynä 2–30 °C:n lämpötilassa. Varusta uudella viimeinen käyttöpäivä -merkinnällä. Jos pesupuskuriainetta on pidetty kylmässä, anna sen lämmetä 20–25 °C:n lämpötilaan ennen käyttöä.</p> <p>Pesulaitteen ja putkien puhdistamista 0,5 % natriumhypokloriittiliuoksella ja perusteellista huuhtelua tislattulla tai deionisoidulla vedellä suositellaan kolmen kuukauden välein, jotta estettäisiin bakteerien ja homeiden sisältämän alkalisen fosfaatin mahdollisesti aiheuttama kontaminoituminen.</p>	Pesupuskuritiivisten <u>määrä</u>	Tislattun tai deionisoidun <u>veden määrä</u>	Pesupuskurin <u>lopullinen määrä</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
Pesupuskuritiivisten <u>määrä</u>	Tislattun tai deionisoidun <u>veden määrä</u>	Pesupuskurin <u>lopullinen määrä</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											

#### Käyttövalmiiden reagenssien määrät

<b>Detekointi-reagenssi 1 ja detekointi-reagenssi 2.</b>	<p><b>VÄLITTÖMÄSTI ENNEN KÄYTTÖÄ:</b>  Sekoita reagenssi perusteellisesti, <u>mittaa</u> sen jälkeen tarvittava määrä detekointireagenssia 1 tai detekointireagenssia 2 puhtaaseen reagenssialtaaseen huolellisesti alla olevia ohjeita noudattaen. Kontaminaation välttämiseksi näitä reagensseja <b>EI SAA</b> palauttaa alkuperäisiin pulloihin: <b>Käyttämättömät aineet on hävitettävä.</b> Jos ei käytetä 8-kanavaista pipettiä, voidaan käyttää asianmukaista sarja-annostelijaa. Siinä tapauksessa reagenssista otetaan alikvootit riittävän kokoiseen polypropeeniputkeen, johon mahtuu alla merkitty tarvittava määrä</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Kokeiden/ liuskojen lkm</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Detekointi-reagenssi 1:n tai 2:n määrä</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">Pullon sisältö</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 koe</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> </tbody> </table>	<u>Kokeiden/ liuskojen lkm</u>	<u>Detekointi-reagenssi 1:n tai 2:n määrä</u>	96/12	Pullon sisältö	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 koe	0,125 ml
<u>Kokeiden/ liuskojen lkm</u>	<u>Detekointi-reagenssi 1:n tai 2:n määrä</u>												
96/12	Pullon sisältö												
72/9	7,0 ml												
48/6	5,0 ml												
24/3	3,0 ml												
1 koe	0,125 ml												

## NÄYTTEIDEN OTTAMINEN JA KÄSITTELY

Suosittelemme, että *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa käytetään ainoastaan sellaisia kohdunkaulanäytteitä, jotka on otettu ja siirretty *digene* HC2 DNA -näytteenottimella (joka koostuu kohdunkaulaharjasta ja *digene*-näytteenkuljetusaineesta) ja *digene* Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkauksella (vanutuppo ja näytteenkuljetusaine) tai näytteitä, jotka on kerätty harjamaisella keräysvälineellä ja asetettu Hologic PreservCyt -liuokseen. Näytteitä, jotka on kerätty muilla näytteenottovälineillä tai siirretty muissa kuljetusaineissa, ei voida käyttää tässä tutkimuksessa. Tämän välinepakkauksen suoritusarvot on määritetty vain tässä mainittuja näytteenottopakkauksia käyttäen. Mikäli suoritetaan kolposkopia, kohdunkaulanäytteet on kerättävä ennen etikkahappo- tai jodikäsittelyä. Ks. näytteenkeräys- ja käsittelymenetelmiin liittyviä lisätietoja *digene* HC2 DNA -näytteenottimen käyttöohjeista.

### KOHDUNKAULANÄYTTEET STM:SSÄ

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

STM-näytteen 2 viikkoa kestävä stabiliteetti huoneenlämmössä sekä yksi lisäviikko 2–8 °C:n lämpötilassa perustuu suorittamaamme 90 simuloidun näytteen testaamiseen. Näihin 90 näytteeseen sisältyi 40 näytettä, jotka sisälsivät alhaisia määriä GC-organismeja [tutkimuksen detekointirajalla, limit of detection (LOD), tai sen lähellä olevia määriä]), 35 näytettä, jotka olivat lievästi positiivisia näytteitä (määrät n. 2-5 kertaa LOD-raja-arvoa suurempia) ja 5 erittäin positiivista näytettä, jotka ylittivät LOD-raja-arvon kymmenkertaisesti. Muut 10 näytettä olivat GC-negatiivisia, viidessä niistä oli kuitenkin suuri määrä CT-organismeja. Tutkimuksen suorituskykyarviot perustuvat näytteisiin, joita säilytettiin 2–8 °C:n lämpötilassa tai pakastettuina ja jotka testattiin 1-2 viikon kuluessa näytteenottohetkestä.

#### Huom.:

1. Kustakin 90 näytteestä otettu denaturoimaton alikvootti asetettiin ääriämpötilaan tarkoituksena simuloida kuljetusolosuhteita (3 päivän säilytys –20 °C:ssa, sitten 5 päivän säilytys 50 °C:ssa ja lisäksi 2 viikon säilytys huoneenlämmössä). Vaikka signaalin heikkenemistä (RLU/CO) havaittiinkin näissä olosuhteissa 8 päivän kuluttua, se ei vaikuttanut tulosten kvalitatiiviseen tulkintaan. Kahden viikon mittaisen huoneenlämmössä inkuboinnin jälkeen kvalitatiivisia eroja havaittiin niissä näytteissä, jotka sisälsivät alhaisia määriäorganismeja.
2. Tulppien irtoaminen pakastetuista näytteistä voidaan estää seuraavasti:
  - Peitetään tulpat Parafilm<sup>®</sup>-kalvolla ennen jo pakastettujen näytteiden lähettämistä. Näytteet voidaan lähettää pakastettuina tai 20–25 °C:n lämpötilassa.
  - Poistettaessa näytteitä pakastimesta testaamista varten niihin on välittömästi vaihdettava näytteenottoputkien kierrekorkit.
3. *digene* HC2 DNA -näytteenotinta ei saa käyttää raskaana olevia naisia tutkittaessa. Raskaana olevilta naisilta näyte otetaan *digene* Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkausta käyttämällä.

### KOHDUNKAULANÄYTTEET HOLOGIC PRESERVCYT -LIUKSESSA

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa voidaan käyttää näytteitä, jotka on kerätty harjamaisella keräysvälineellä ja asetettu Hologic PreservCyt -liuokseen käytettäväksi valmistettaessa Hologic ThinPrep Pap -koeliuskoja. Näytteet tulee ottaa tavalliseen tapaan ja ThinPrep Pap -koeliuskat on valmistettava Hologic-ohjeiden mukaisesti.

PreservCyt-liuosnäytteet voidaan pitää huoneenlämmössä (20–25 °C) enintään yhden kuukauden ajan näytteenottohetken jälkeen ja ennen *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koetta varten prosessoimista. PreservCyt-liuosnäytteitä ei saa pakastaa. Näiden näytteiden prosessoimisesta ks. *PreservCyt-näytteiden valmistusmenetelmä*.

## KOEMENETELMÄ

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

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

Rapid Capture System -järjestelmä on yleiskäytössä oleva automatisoitu pipetointi- ja laimennusjärjestelmä, jota voidaan käyttää *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen yhteydessä käsiteltävien lukuisien näytteiden tehotestaamisessa. Järjestelmällä voidaan käsitellä enimmillään 352 näytettä 8 tunnissa, johon sisältyy 3,5 tunnin jakso, jolloin käyttäjän väliintuloa ei edellytetä; jopa 704 näytetulosta voidaan tuottaa 13 tunnissa. Näytteiden denaturointi testausta varten suoritetaan RCS-järjestelmästä erillään, ja se tapahtuu primäärisessä näytteenottoputkessa (samoin kuin jäljempänä kuvatussa manuaalisessa *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa), ennen näytteiden asettamista RCS-alustalle. Lisäksi suoritetaan kemiluminesenssisignaalin detekointi ja tulosten raportointi offline-tilassa olevalla QIAGENin hyväksymällä luminometrijärjestelmällä, joka on yhteinen sekä manuaaliselle että RCS-menetelmälle. Jokainen *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen vaihe suoritetaan täsmälleen samassa järjestyksessä kuin manuaalinen testi. RCS-sovellus mahdollistaa enintään 4 eri vaiheissa etenevän kuoppalevyn prosessoinnin, jolloin kukin kuoppalevy sisältää näytteet ja tarvittavat tutkimuskalibraattorit ja -laatukontrollit.

**Kun aiot käyttää Rapid Capture System -järjestelmää, ks. ensin ohjeet laitteen mukana toimitetusta *Rapid Capture System -käyttöoppaasta* näiden käyttöohjeiden lisäksi.**

### MANUAALINEN MENETELMÄ

#### Asetus

1. Anna kuoppalevyn lämmitin 1:n tasaantua vähintään 60 minuutin ajan kylmäkäynnistyksen jälkeen lämpötilaan  $65 \pm 2$  °C . Ks. lisätietoja *kuoppalevyn lämmitin 1:n käyttöohjeista*.
2. Varmista, että vesihauteen lämpötila on 65 °C ja että veden pinta on tarpeeksi korkealla, jotta jokaisen näyteputken sisältö on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
3. Ota näytteet ja **kaikki** tarvittavat reagenssit jääkaapista **ennen tutkimuksen aloittamista**. Niiden annetaan lämmitä  $20-25$  °C:n lämpötilaan 15-30 minuutin ajan.
4. Laadi levystä esimerkki-layout käyttäen *digene* analyysimääritysohjelmia CT:n *digene* analyysiprotokollien kanssa. Ks. lisätietoja käytetyn ohjelmiston käyttöoppaasta.
5. Negatiivinen kalibraattori, positiivinen kalibraattori ja laaduntarkkailukontrolli on kukin valmistettava **tuoreena** kutakin analyysiä varten. Sekoita kalibraattorit ja laatukontrollit hyvin. Jos käytössä on MST-vortexi 2, siirrä 500 µl kutakin asianmukaisesti merkittyihin tyhjiin näytteenottoputkiin. Vaihtoehtoisesti voit siirtää 200 µl kutakin asianmukaisesti merkittyihin 2 ml:n polypropyleenisii mikrocentrifugiputkiin.
6. **Negatiivinen kalibraattori ja positiivinen kalibraattori on testattava ENSIN** kolme rinnakkain kustakin näyte-erästä. Laaduntarkkailukontrollit ja näytteet tulee testata yksitellen. Kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet tulee tutkia 8 kuoppalevysarakkeen asetelmassa siten, että negatiivisen kalibraattorin (NC) replikaatit pannaan sarakkeisiin A1, B1, C1; positiivisen kalibraattorin (PC) toistot sarakkeisiin D1, E1, F1; QC CT sarakkeeseen G1; QC GC sarakkeeseen H1; ja näytteet aloittaen sarakkeesta A2. Ohessa esimerkkiasetus. Ks. asianmukaisiin kalibraattori-/laatukontrolli/näyteasetelmiin liittyviä lisätietoja sopivan QIAGENin hyväksymän luminometrin käyttöoppaasta ja sopivan *digene* analyysimääritysohjelmiston käyttöoppaasta.

## LAYOUT-ESIMERKKI 24 MIKROKAIVON TESTISTÄ:

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

## DENATUROIINTI

### Huom.:

- **Varo:** Denaturointireagenssi on syövyttävää. Käytä tarkoituksenmukaista suojavaatetusta, suojakäsineitä sekä silmä- tai kasvosuojainta. Käsiteltäessä käytettävä puuterittomia käsinettä.
- **Tärkeää:** Jotkut näytteet voivat sisältää verta tai muita biologisia aineita, ja nämä voivat vaikuttaa denaturointireagenssia lisäämässä tapahtuviin värinmuutoksiin. Näytteissä, jotka ennen denaturointireagenssin lisäämistä ovat tummia, ei tässä vaiheessa ehkä tapahdu kunnollista värinmuutosta. Näissä tapauksissa analyysin tuloksiin ei vaikuta, jos väri ei muutu oikealla tavalla. Kunnollinen sekoittuminen voidaan varmistaa tarkkailemalla kalibraattoreiden ja laatukontrollien värinmuutosta.
- Denaturointivaiheessa on varmistettava, että vesihautteen veden pinta on tarpeeksi korkealla, jotta jokaisen näyteputken sisältö on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
- Näytteet voidaan preparoida denaturointivaiheen aikana ja säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa yön yli tai –20 °C:n lämpötilassa enintään kolme kuukautta. Sulatusjaksoja saa olla korkeintaan kolme, jolloin kunkin sulatusjakson aikana pisin sallittu huoneenlämmössä säilytysaika on kaksi tuntia. Sekoitettava hyvin ennen käyttöä.
- Kalibraattorit ja laatukontrollit voidaan preparoida denaturointivaiheen aikana ja säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa yön yli, **mutta niitä ei saa pakastaa**. Pakastetut kalibraattorit ja laatukontrollit on hylättävä.
- Näytteiden ei enää denaturoinnin ja inkuboinnin jälkeen katsota olevan infektoivia.<sup>13</sup> Laboratorion henkilöstön on kuitenkin yhä noudatettava kansallisia/paikallisia varotoimenpiteitä.

## KALIBRAATTORIT, LAATUKONTROLLIT JA STM-NÄYTTEIDEN VALMISTUSMENETELMÄ

### Huom.:

- Näytteenottovälinettä ei saa poistaa ennen denaturointia.
- Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on ratkaisevan tärkeää, että kalibraattori-, laatukontrolli- ja STM-näyteaine joutuvat kosketuksiin denaturointireagenssin kanssa. Denaturointireagenssin lisäämistä seuraava sekoittaminen on ratkaiseva vaihe: **Varmista, että moninäyteputkivortexiin 2 on säädetty nopeus 100 (maksiminopeus) ja että nesteessä todetaan selvästi havaittavissa oleva pyörre sekoittamisen aikana niin, että neste pesee putken sisäpinnan kauttaaltaan. Manuaalisesti vorteksoitaessa varmista, että jokainen kalibraattori, laatukontrolli ja näyte sekoitetaan yksitellen vorteksoimalla kutakin vähintään viiden sekunnin ajan täydellä nopeudella siten, että nestepyörre pesee putken sisäpinnan kauttaaltaan, ja invertoi putki sen jälkeen kerran.**

1. Poista ja hävitä kalibraattoreiden, laatukontrollien ja testattavien STM-näytteiden tulpat.

**Huom.:** Näyteputkista poistetut tulpat ovat mahdollisia infektiolähteitä. Käsiteltävä kansallisia/paikallisia määräyksiä noudattaen.

2. Pipetoi denaturointireagenssia ja osoitinväriä kuhunkin kalibraattoriin, laatukontrolliin tai STM-näytteeseen sarja-annostelijalla tai säädettävällä pipetillä. Varo koskemasta putken sivuihin näytteiden ristikontaminaation välttämiseksi. Tarvittavan denaturointireagenssin määrä on puolet näytteen määrästä. Kalibraattori-, laatukontrolli- ja näytetyypin tarkat määrät käyvät ilmi alla olevasta taulukosta.

- **Laimenna jäljellä oleva denaturointireagenssi pullossa ennen kansallisten/paikallisten laboratorionkäytäntöjen mukaista hävittämistä.**

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

3. Käytä näytteiden sekoittamisessa jompaakumpaa alla olevista menetelmistä.

#### Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä

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

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

#### Putkien manuaalinen/yksittäinen vortexointimenetelmä

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

4. Riippumatta siitä, kumpaa vorteximenetelmää käytetään, **jokaisessa putkessa tulee olla sekoittamisen aikana selvästi nähtävissä oleva nestepyörre niin, että neste pesee putken koko sisäpinnan**. Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden värin tulee muuttua violetiksi.
5. Inkuboi telineessä olevia putkia  $65 \pm 2$  °C:n vesihautteessa  $45 \pm 5$  minuutin ajan (denaturoidut kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet voidaan testata välittömästi. Kalibraattorit ja laatukontrollit voidaan säilyttää  $2-8$  °C:ssa yön yli kuten kohdassa **Huom.** on kuvattu). Ks. näytteiden säilytystiedot kohdasta *Vaihtoehtoinen pysähdyskohta*. Valmista GC-koetinseos tämän inkubaation aikana. Ks. kohta *Reagenssien valmistus ja säilytys*.

## PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VALMISTUSMENETELMÄ

### Huom.:

- Ks. perusteelliset tiedot *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan käyttöohjeista.
- Prosessoimalla yksi 4 ml alikvootti PreservCyt-liuosta saadaan riittävä määrä kahta manuaalista testiä varten. Prosessoitavan määrän on oltava vähintään 4 ml. STM- ja PreservCyt-liuosnäytteiden ekvivalenssia koskevassa osassa on lisätietoja vähimmäisjäännöstilavuudesta.
- Preparoi PreservCyt-liuosnäytteet enintään 36 näytteen erinä; muussa tapauksessa pelletit saattavat irrota supernatanttia dekantoitaessa. Tämä on tärkeää solupelletin eheyden varmistamiseksi dekantointivaiheen aikana. Jos preparoidaan enemmän PreservCyt-liuospulloja valmistamista ei tule aloittaa ennen kuin ensimmäinen erä on valmis.

Käytä joko *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen mukana toimitettua denaturointireagenssia (DNR) (ks. *Reagenssien valmistus ja säilytys*) tai *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan mukana toimitettua DNR-reagenssia. Valmista *digene* HC2 -näytteenkonversiosarjan mukana toimitettu DNR lisäämällä kolme tippaa osoitinväriä DNR-pulloon ja sekoittamalla hyvin. Liuoksen tulee olla väriltään tasaisen tummanvioletti. Käytä taulukkoa 1 tarvittavien määrien määrittämisessä.

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

Testien lkm	PreservCyt-liuoksen määrä	Konversio-puskurin määrä
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Merkitse *digene* HC2 -näytteenkonversioputkeen, 10 ml kartiopohjaiseen Sarstedt-putkeen tai 15 ml VWR- tai Corning-merkkiseen kartiopohjaiseen putkeen asianmukainen näytteen tunnistenumero.
2. Yhden näytteen käsittely kerrallaan:
  - a. Ravista PreservCyt-pulloa voimakkaasti käsin kunnes solut näyttävät jakautuneen tasaisesti.
  - b. Koska solut laskeutuvat nopeasti, pipetoi haluttu määrä PreservCyt-näytettä valmiiksi merkittyyn putkeen heti. Vie PreservCyt-liuos kartiopohjaisen putken pohjalle, jotta soluaine ei kiinnittyisi putken sisäpinnalle.
3. Lisää kuhunkin putkeen asianmukainen määrä näytteen konversiopuskuria (ks. taulukko 1).
4. Sulje korkeilla ja sekoita kunkin putken sisältöä perusteellisesti astialla varustetussa vortekssekoittimessa.

**Huom.:** MST Vortexer 2 -menetelmää ei ole validoitu PreservCyt-liuosnäytteiden vorteksointiin näytteenkonversiopuskurin kanssa ennen sentrifugointia eikä sitä saa käyttää tässä vaiheessa.
5. Sentrifugoi putkia Swinging Bucket -roottorissa 15±2 minuuttia nopeudella 2.900±150 x g.
6. Valmista sentrifugoinnin aikana *digene* näytteenkuljetusaine/denaturointireagenssiseos (STM/DNR) suhteessa 2:1 taulukon 2 mukaisesti.

**Huom.:** STM/DNR-seos on aina valmistettava tuoreena jokaisena testauspäivänä.

- a. Käytä tarvittavan STM/DNR-seoksen kokonaismäärän määrittämiseksi PreservCyt-liuosnäytteen aloitusmäärää viitteenä ja kerro sitten STM- ja DNR "putkea kohti" -määrät prosessoitavien näytteiden lukumäärällä (ks. taulukko 2).



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

Testien lkm	PreservCyt-liuoksen määrä	STM-määrä putkea kohti lopullista STM/DNR-seosta* varten	DNR-määrä putkea kohti lopullista STM/DNR-seosta* varten	Putkeen lisätyn STM/DNR-seoksen määrä
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

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

- b. Sekoita liuos vorteksoimalla perusteellisesti.
7. Ota putket sentrifugista yksi kerrallaan ja aseta telineeseen tai konversiotelineeseen. Kunkin putken pohjalla tulee olla vaaleanpunainen/oranssi pelletti (sakka).

**Huom.:** Näytteitä, joissa ei näy pellettiä sentrifugoinnin jälkeen, ei voi käyttää testiin vaan ne on hylättävä.

8. Kunkin putken käsittely yksittäin:
- Poista korkki ja aseta puhtaalle vähänukkaiselle liinalle.
  - Dekantoi supernatantti varovasti.
  - Pidä putki invertoituna ja pyyhi sitä (noin kuusi kertaa) imukykyiseen vähänukkaiseen paperipyyhkeeseen, kunnes putkesta ei enää tipu nestettä. Joka kerralla käytetään pyyhkeen puhdasta osaa. Solupellettiä **ei saa** päästää liukumaan putkea alas pyyhkimisen aikana.

**Huom.:**

- Putkea ei saa pyyhkiä samaan vähänukkaiseen paperipyyhkeen kohtaan kuin kerran.
- On tärkeää poistaa suurin osa PreservCyt-liuosta pyyhkimällä. On kuitenkin normaalia, että jäljellä olevaa PreservCyt-liuosta on hieman näkyvässä pyyhkimisen jälkeen.

- d. Aseta putki telineeseen tai konversiotelineeseen.

## Vorteksointi ja denaturointi

### Manuaalinen vorteksointimenetelmä

- Lisää kuhunkin pellettiin asianmukainen määrä STM/DNR-seosta (ks. taulukko 2). Sulje kukin putki korkilla ja suspendoi pelletit uudelleen vorteksoimalla kutakin putkea yksittäin suurimmalla nopeudella vähintään 30 sekunnin ajan. Jos pellettiä on vaikea suspendoida, vorteksoi putkea vielä 10-30 sekuntia tai kunnes pelletti irtoaa putken pohjasta. Jos pelletti ei ole liuennut lisävorteksoinnin jälkeen (enintään 2 minuuttia), merkitse muistiin näytteen tunnistekoodi ja jatka seuraavaan vaiheeseen.
- Aseta putket telineeseen.
- Aseta teline 65±2 °C:n vesihauteeseen 15±2 minuutiksi. Varmista, että vedenpinta on tarpeeksi korkealla, jotta jokaisessa putkessa oleva neste on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
- Poista näyteteline vesihauteesta ja vorteksoi näytteitä yksittäin 15-30 sekuntia.

**Huom.:** Varmista tässä vaiheessa, että kaikki pelletit ovat täysin suspendoituneet. Näytteitä, joissa näkyy vielä pellettejä, ei voi käyttää testiin vaan ne on hylättävä.

- Aseta teline uudelleen 65±2 °C:n vesihauteeseen ja jatka denaturointia vielä 30±3 minuuttia.
- Siirry seuraavaan vaiheeseen *Hybridisaatio* tai ks. kohtaa *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta*, kun haluat säilyttää ja käsitellä denaturoituja näytteitä.

## Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä

### Huom.:

- Moninäyteputkivortexi 2 -menetelmä on validoitu supernatantin sentrifugoinnin ja dekantoinnin jälkeen tapahtuvaan PreservCyt-liuosnäytteiden prosessointiin .
  - Vain MST Vortexer 2 on tarkoitettu PreservCyt-liuosnäytteiden prosessointiin.
  - Konversioteline ja telineen kansi on suunniteltu erityisesti *digene* HC2 -näytteensekoitusputkia (VWR- tai Corning-merkkisiä 15 ml:n kartiopohjaisia putkia) varten. Konversiotelineessä saa käyttää vain yhtä putkityyppiä kerrallaan. Muita tuotemerkkejä ei ole validoitu käyttöä varten.
  - On ehdottoman tärkeää noudattaa tarkasti konversiotelinettä ja telineen kantta varten määritettyjä vorteksointiaikoja.
  - Sekoitustelinettä ja telineen kantta ei saa käyttää *digene* HC2 DNA -koesarjojen kalibraattoreiden tai laaduntarkailukontrollien vorteksointiin. STM-putkien korkeus estää putkien riittävän vorteksoinnin konversiotelinettä ja telineen kantta käyttämällä.
1. Kun jokainen tunnisteella varustettu 15 ml:n kartiopohjainen putki on kuivattu, aseta ne paikoilleen konversiotelineeseen.
  2. Lisää kuhunkin pellettiin asianmukainen määrä STM/DNR-seosta (ks. taulukko 2).
  3. Peitä 15 ml:n kartiopohjaiset putket DuraSeal-putkentiivistekalvolla vetämällä kalvo telineessä olevien putkien päälle.
  4. Aseta telineen kansi kalvolla peitetyjen putkien päälle ja lukitse paikalleen kahdella reunapidikkeellä. Leikkaa kalvo leikkurilla, kun kansi on kiinnitetty hyvin paikalleen.
  5. Käännä punakahvainen vipu ylös vaakasuoraan asentoon.
  6. Aseta konversioteline ja telineen kansi MST Vortexer 2:n päälle siten, että sekoitustelineen suurin diagonaalinen kulma on oikeassa etureunassa. Aseta teline ja kansi MST Vortexer 2:n alustalle tiiviisti ohjainten sisään. Kiinnitä teline paikalleen siirtämällä punakahvainen vipu kohtisuoraan asentoon. Näin teline lukittuu paikalleen.
  7. Tarkista, että nopeudeksi on säädetty 100 (maksiminopeus) ja aseta pulssinvaihtokytkin OFF-asentoon.
  8. Käännä vortexin virtakytkin ON-asentoon. **Vorteksoi putkia 30 sekunnin ajan.**
  9. Käännä vortexin virtakytkin OFF-asentoon.
  10. Ota konversioteline ja telineen kansi pois MST Vortexer 2:sta nostamalla punakahvainen vipu ylös.
  11. Aseta teline 65±2 °C:n vesihauteeseen 15±2 minuutiksi. Varmista, että jokaisessa putkessa oleva neste on kokonaan vedenpinnan alapuolella.
  12. Ota näytteet sisältävä teline pois vesihauteesta 15 minuutin inkuboinnin jälkeen.
  13. Roiskeiden välttämiseksi kuivaa liika vesi telineestä ennen sen asettamista MST Vortexer 2:een.
  14. Kiinnitä konversioteline ja telineen kansi MST Vortexer 2:een *vaiheessa 6* kuvatulla tavalla.
  15. Tarkista, että nopeudeksi on säädetty 100 ja aseta vortexin virtakytkin ON-asentoon. **Vorteksoi putkia 1 minuutin ajan.**
  16. Käännä vortexin virtakytkin OFF-asentoon.  
**Huom.:** MST Vortexer 2 -menetelmä vakioittaa sekoitusnopeuden, -ajat ja -prosessin eikä manuaalisessa vorteksointimenetelmässä välttämätön solupellettien visuaalinen tarkistus ole tarpeellista.
  17. Aseta teline uudelleen 65±2 °C:n vesihauteeseen ja jatka denaturointia 30±3 minuuttia.
  18. Poista teline vesihauteesta, kuivaa ja kiinnitä vortexiin.
  19. Käännä vortexin virtakytkin ON-asentoon. **Vorteksoi 10 sekunnin ajan maksiminopeudella.**
  20. Käännä vortexin virtakytkin OFF-asentoon. Poista teline.
  21. Poista telineen kansi ja DuraSeal-putkentiivistekalvo näytteistä välittömästi.

22. Siirry seuraavaan vaiheeseen *Hybridisaatio* tai ks. denaturoitujen näytteiden säilytystä ja käsittelyä koskevia tietoja kohdasta *Vaihtoehtoinen pysähtymiskohta*.

#### VAIHTOEHTOINEN PYSÄHTYMISKOHTA

Denaturoinnin jälkeen STM-näytteitä ja konvertoituja PreservCyt-näytteitä voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa yön yli tai –20 °C:n lämpötilassa enintään kolme kuukautta. Kun näytteitä säilytetään jääkaapissa yön yli, ne voidaan jättää konversiotelineeseen DuraSeal-kalvolla ja telineen kannella peitettyinä. Telineen kansi ja DuraSeal-kalvo on poistettava näytteistä ja näyteputket on suljettava korkeilla ennen niiden säilyttämistä –20 °C:ssa. Näytteet on kummassakin tapauksessa saatettava 20 – 25 °C:n tasaiseen lämpötilaan ja vorteksoitava perusteellisesti ennen hybridisaatiovaiheeseen siirtymistä.

**Huom.:** Hiilihappojäätä ei saa käyttää denaturoitujen näytteiden säilyttämiseen eikä kuljettamiseen.

Jäädytys- ja/tai sulatusjaksoja saa olla korkeintaan kolme, jolloin kunkin sulatusjakson aikana pisin sallittu huoneenlämmössä säilytysaika on kaksi tuntia.

#### HYBRIDISAATIO

**Huom.:**

- GC-koetinseos on tahmeaa ainetta. Varmista, että sekoittuminen on perusteellinen ja että vaadittu määrä kokonaisuudessaan jakautuu kuhunkin hybridisaatiokuoppalevykaivoon. Ks. kohta *Reagenssien valmistus ja säilytys*.
- Jos denaturoitua näytettä on säilytetty –20 °C:n lämpötilassa, anna näytteen sulaa 20–25 °C:n lämpötilassa ja vorteksoi näyte sen jälkeen perusteellisesti ennen kuin siirryt hybridisaatioon.
- Esikuumenna kuoppalevyn lämmitin I:tä ennen käyttöä 65±2 °C:n lämpötilaan vähintään 60 minuutin ajan. Ks. lisätietoja kuoppalevyn lämmitin I:n käyttöoppaasta.

1. Varusta hybridisaatiokuoppalevy tunnisteella.
2. Inkubaation jälkeen poista kalibraattorit, laatukontrollit ja näytteet vesihautteesta. MST Vortexer 2:ta käytettäessä vorteksoi koko STM-näytteiden teline vähintään 5 sekunnin ajan maksiminopeudella. PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä vorteksoikoko konversiotelinettä vähintään 10 sekunnin ajan maksiminopeudella. Vaihtoehtoisesti vorteksoi kukin putki erikseen vähintään viiden sekunnin ajan.
3. Pipetoi kutakin kalibraattoria, laatukontrollia tai näytettä 75 µl tyhjän hybridisaatiokuoppalevyn kaivon **pohjaan** niin kuin kohdassa *Asetus* kuoppalevystä laaditussa layout-esimerkissä esitetään. Vältä koskettamasta kaivojen sivuja ja yritä rajoittaa ilmakuplien syntymistä. Kalibraattoreiden, laatukontrollien tai näytteiden ristikontaminaation estämiseksi käytä kuhunkin siirtoon puhdasta, erikoispitkää pipetinkärkeä. STM-näytteitä käytettäessä näytteenottovälinettä ei saa poistaa näytteenkuljetusputkesta. Denaturoidut näytteet voidaan sulkea näytteenottoputkien kierrekorkeilla ja säilyttää yhdessä putkiin jäävien näytteenottovälineiden kanssa. Denaturoidut PreservCyt-näytteet voidaan sulkea putkien alkuperäisillä korkeilla.

**Huom.:**

- **Näytteen alikvoottien varomaton siirtäminen voi aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia. Näytteen siirron aikana pipetin kärki ei saa koskettaa putken sisäpintaa 75 µl alikvoottia siirrettäessä.**

4. Kun viimeinen näyte on siirretty, peitä levy kannella ja inkuboi **hybridisaatiokuoppalevyä 20–25 °C:n lämpötilassa 10 minuutin ajan**.
5. Ota preparoidusta ja perusteellisesti vorteksoidusta koetinseoksesta alikvootit kertakäyttöiseen reagenssialtaaseen. Käytä 8-kanavaista pipettiä ja annostellaan huolellisesti 25 µl koetinseosta kuhunkin kalibraattoreita, laatukontrolleja ja näytteitä sisältävään kaivoon käyttäen jokaisella rivillä uusia kärkiä. Annostele koetinseosmäärä kuhunkin hybridisaatiokaivoon takaisinroiskeita välttämällä. Kaivojen seinämiin koskettamista on vältettävä.

**Huom.:** Edellä mainitussa vaiheessa käytä 8-kanavaista pipettiä, jossa on 25–200 µl kärjet ja joka pystyy annostelemaan 25–75 µl. Jos kaivojen lukumäärä on pieni, käytä yksikanavaista pipettiä (jossa on 25–200 µl kärjet) 8-kanavaisen pipetin sijasta.

- Aseta kuoppalevyn kansi hybridisaatiokuoppalevyn päälle. Ravista hybridisaatiokuoppalevyä  $3\pm 2$  minuutin ajan nopeudella  $1100\pm 100$  kierr./min hybridinsieppausjärjestelmän tasoravistin I:ssä. *Kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden väri tulee ravistelun päätyttyä muuttua keltaiseksi.* Violetin väriseksi jäävissä kaivoissa ei ehkä ole ollut tarpeeksi koetinseosta. Annostele  $25\ \mu\text{l}$  lisää koetinseosta niihin näytteisiin, joiden väri on jäänyt violetiksi ja ravista uudelleen. Jos kaivot ovat edelleen violetteja tämän toimenpiteen jälkeen, testaa näytteet uudestaan.
- Inkuboi esikuumentetussa ja  $65\pm 2\ ^\circ\text{C}$ :n lämpötilaan tasapainotetussa kuoppalevynlämmitin I:ssä  $60\pm 5$  minuuttia.

**Huom.:**

- Kun hybridisaatiokuoppalevy asetetaan kuoppalevynlämmitin I:een, pidä huoli siitä, ettei roiskeita synny.
- Ravistelun päätyttyä PreservCyt-liuosnäytteiden väriin pitäisi muuttua keltaisen sijasta vaaleanpunaiseksi.

**HYBRIDINSIEPPAUS**

- Poista ylimääräiset sieppauskuoppalevykaivot levyn rungolta. Laita käyttämättömät kuoppalevykaivot niiden alkuperäiseen pussiin takaisin ja sulje pussi. Merkitse jokaiseen sarakkeeseen numero 1, 2, 3... ja varusta kuoppalevy sopivalla tunnisteella. Lisää näytteet kaivoihin kohdassa *Asetus* valmistetun layout-esimerkin mukaisesti.
- Poista kalibraattoreita, laatukontrolleja ja näytteitä sisältävä hybridisaatiokuoppalevy varovasti kuoppalevyn lämmittimestä I. Ota kuoppalevyn kansi välittömästi pois ja aseta puhtaalle pinnalle.
- Siirrä kalibraattoreiden, laatukontrollien ja näytteiden koko määrä (n.  $100\ \mu\text{l}$ ) hybridisaatiokuoppalevyn kaivoista vastaavan sieppausmikrokaivon pohjalle 8-kanavaisella pipetillä. Käytä jokaisessa sarakesiirrossa 8-kanavaisessa pipetissä uusia pipetinkärkiä ja anna kunkin pipetinkärjen valua kunnolla täydellisen näytteen siirron varmistamiseksi. Pipettiä voidaan haluttaessa vakauttaa tukemalla pipetinkärkien **keskivälin** kohtaa sieppausmikrokaivojen yläreunaa vasten (ks. kuva 1).

**KUVA 1: OIKEA PIPETOINTITAPA**



- Peitä kuoppalevy kannella ja ravista tasoravistin I:ssä nopeudella  $1100\pm 100$  kierrosta/min ja  $20-25\ ^\circ\text{C}$ :n lämpötilassa  $60\pm 5$  minuutin ajan.
- Valmista pesupuskuri ja tarvittaessa tarkasta automaattisen kuoppalevypesurin huuhtelu- ja jätesäiliöt tämän inkubaation aikana. Ks. kohta *Reagenssien valmistus ja säilytys*.
- Kun sieppausvaihe on valmis, ota sieppauskuoppalevy pois tasoravistin I:stä ja poista kuoppalevyn kansi varovasti. Kaada kaivoissa oleva neste viemärialtaaseen. Käännä kuoppalevy ylösalaisin viemärialtaan päällä ja ravista voimakkain, alaspäin suuntautuvien liikkein samalla varoen aiheuttamasta takaisinroiskeita, jos dekantoit liian lähellä viemärialtaan pohjaa. **Kuoppalevyä ei saa kääntää takaisin.** Kuivaa kuoppalevy kopauttamalla sitä napakasti kaksi tai kolme kertaa puhtaille Kimtowels®-pyyhkeille tai vastaaville vähänukkaisille paperipyyhkeille. Varmista, että kaikki neste on poistettu kaivoista ja että kuoppalevy on päältä kuiva.

## HYBRIDIEN DETEKOINTI

### Huom.:

- Annostele kuljettamalla 8-kanavaista pipettiä kuoppalevyn poikki vasemmalta oikealle.
- Tehokkaan ja yhtenäisen reagenssiannostelun aikaansaamiseksi suositellaan käytettäväksi käänteispipetointimenetelmää. Tällöin pipetinkärjet ensin ylitäytetään käyttämällä pipetin annosteluvivun (männän) 2. pidäkettä. Katso toimenpidettä jäljempänä. Pyyhi kärjet kertakäyttöisen reagenssialtaan päällä tai vähänukkaiseen paperipyyhkeeseen ylimääräisen reagenssin poistamiseksi ennen kuoppalevylle annostelua.
- Pipettiä voidaan haluttaessa vakauttaa tukemalla pipetinkärkien keskivälin kohtaa sieppausmikrokaivojen yläreunaa vasten. Putken sivuihin on varottava koskemasta, ettei tapahtuisi näytteiden ristikontaminaatiota. Ks. kuva 1 edellä.

1. Detekointireagenssi 1:stä otetaan tarvittavan suuruinen alikvootti reagenssialtaaseen (ks. ohjeet kohdasta *Reagenssien valmistus ja säilytys*). Käytetään 8-kanavaista pipettiä ja annostellaan huolellisesti 75 µl detekointireagenssi 1:tä kuhunkin kuoppalevyn kaivoon jäljempänä kuvattua käänteistä pipetointimenetelmää noudattaen.

Käänteinen pipetointimenetelmä:

- a) Kiinnitä kärjet 8-kanavaiseen pipetissäin; varmista, että kaikki kärjet ovat tiiviisti paikoillaan.
- b) Paina pipetin mäntä ensimmäisen pidäkkeen ohitse toiseen pidäkkeeseen.
- c) Upota kärjet detekointireagenssi 1:n liuokseen.
- d) Vapauta mäntä hitaasti ja anna kärkien täytyä liuoksella.
- e) Annostele liuos mikrokaivoihin (75 µl) painamalla mäntä ensimmäiseen pidäkkeeseen. Mäntää ei saa vapauttaa ennen kuin pipetinkärjet on upotettu takaisin detekointireagenssi 1:n liuokseen.
- f) Täytä kärjet uudelleen ja jatka, kunnes kaikki kaivot on täytetty. Kuoppalevyn kaivojen täyttäminen tehdään vasemmalta oikealle. Varmista *kaivojen täytyminen varmistetaan tarkkailemalla vaaleanpunaisen värin voimakkuutta. Värin voimakkuuden tulee olla sama kaikissa kaivoissa.*

2. Peitä kuoppalevyt kuoppalevyn kannella ja inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 30-45 minuutin ajan.

## PESEMINEN

Pese sieppauskuoppalevy jommallakummalla seuraavista menetelmistä.

### AUTOMAATTINEN KUOPPALEVYPESURI -MENETELMÄ

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

### ENNEN JOKAISTA KÄYTTÖÄ:

- Varmista, että pesuallas on täytetty vähintään 1 litran merkkiin asti pesupuskuriliuoksella. Ellei näin ole, valmistu pesupuskuriliuos. Ks. kohta *Reagenssien valmistus ja säilytys*.
- Varmista, että huuhteluallas on täynnä deionisoitua tai tislattua vettä.
- Varmista, että jätesäiliö on tyhjä ja että korkki on varmasti kiinni.
- Automaattinen kuoppalevypesuri esitäyttää itsensä automaattisesti aina ennen pesua ja huuhtelee jokaisen pesun jälkeen.

1. Poista levyn kansi ja aseta kuoppalevy automaattisen kuoppalevypesurin alustalle.
2. Varmista, että virta on päällä ja että näytössä lukee ”Digene Wash Ready” tai ”P1”.

**Huom.:** Jos sieppauskaivoista käytetään vain osittainen liuska, tyhjät kuoppalevyn kaivot pitää sarakkeen täydentämiseksi asettaa sieppauskuoppalevyn ennen pesemistä. Ks. tilaustiedot kohdasta *Lisävarusteet*.

3. Valitse pestävien liuskojen määrä painamalla ”Rows”-näppäintä, jonka jälkeen voidaan tehdä säätöjä painamalla ”+” tai ”-”. Paina ”Rows”-näppäintä, kun haluat palata ”Digene Wash Ready” tai ”P1” -tilaan.

4. Toiminnon aloittamiseksi paina "Start/Stop".
5. Pesuri suorittaa kuusi täyttö- ja aspirointijaksoa, joihin kuluu noin 10 minuuttia. Koska ohjelmaan sisältyy lyhyt tauko, on varottava ottamasta kuoppalevyä pois liian aikaisin. Kun automaattinen kuoppalevypesuri on päättänyt pesun, näyttöön tulee teksti "Digene Wash Ready" tai "P1".
6. Ohjelman päätyttyä poista kuoppalevy pesulaitteesta. Kuoppalevyn tulee näyttää valkoiselta, eikä kaivoissa tule olla vaaleanpunaisia nestejämiä.

#### MANUAALINEN PESUMENETELMÄ

**Huom.:** Riittämätön pesu voi aiheuttaa lisääntyneitä taustaa ja väriä positiivisia tuloksia (johtuen alkalisesta fosfataasin jäämistä). Tehokkaan pesun varmistamiseksi pesulaitetta käytettäessä aseta laite vähintään 61 cm ja enintään 91 cm pesualueen yläpuolelle siten, että kuoppalevy on 61–91 cm pesulaitteen alapuolella pesun aikana. Pesulaitteen sulkuhanan tulee olla täysin "open" (auki) -asennossa, kun sitä käytetään, ja "off" (pois päältä) -asennossa, kun sitä ei käytetä. Käytettäessä pesulaitteen tulee sisältää vähintään 1,0 litra pesupuskuriainetta riittävän paineen varmistamiseksi.

1. Detekointireagenssi 1 poistetaan kaivoista asettamalla puhtaita Kimtowels-pyyhkeitä tai vastaavia vähänukkaisia paperipyyhkeitä kuoppalevyn päälle ja kääntämällä kuoppalevy varovasti ylösalaisin. Ennen ylösalaisin kääntämistä on varmistettava, että paperi on kosketuksessa koko kuoppalevyn pintaan. Anna kuoppalevyn valua 1-2 minuutin ajan. Kuivaa hyvin puhtailla Kimtowels-pyyhkeillä tai vastaavilla vähänukkaisilla paperipyyhkeillä. Hävitä käytetyt vähänukkaiset paperipyyhkeet huolellisesti myöhempien vaiheiden alkalisesta fosfataasikontaminaation välttämiseksi.
2. Pesulaitetta käytettäessä pese kuoppalevy käsin kuusi kertaa. Pese jokainen kaivo niin että se tulvii yli, jotta konjugaatti saadaan poistetuksi kaivojen huipuista. Aloita peseminen kaivosta A1 ja jatka sitä serpentiinimäisesti oikealle ja alaspäin. Kun kaikki kaivot ovat täynnä, dekantoi neste viemärialtaaseen voimakkaalla alaspäin suuntautuvalla liikkeellä. Aloita toinen pesu kaivosta H12 ja siirry siinä serpentiinimäisesti vasemmalle ja ylöspäin. Toista tämä kahden pesun sekvenssi vielä kaksi kertaa, jolloin saat yhteensä kuusi pesua kaivoa kohti.
3. Kuivaa kuoppalevy pesun jälkeen kääntämällä se nurin päin puhtaille Kimtowels-pyyhkeille tai vastaaville vähänukkaisille paperipyyhkeille ja kopauttamalla sitä napakasti kolme tai neljä kertaa. Vaihda vähänukkaiset paperipyyhkeet ja suorita kuivaus uudelleen. Jätä kuoppalevy valumaan nurin päin 5 minuutiksi. Kuivaa kuoppalevy vielä kerran.
4. Kuoppalevyn tulee näyttää valkoiselta, eikä kaivoissa saa olla vaaleanpunaisia nestejämiä.

## SIGNAALIN VAHVISTUS

### Huom.:

- Ota käyttöön uusi pari puuterittomia suojakäsineitä detekointireagenssi 2:ta käsitellessäsi.
  - Detekointireagenssi 2:n kontaminaation välttämiseksi ota kertakäyttöiseen reagenssialtaaseen reagenssista **vain** analyysin suorittamiseen tarvittava määrä alikvoottia. Ks. kohta *Reagenssien valmistus ja säilytys*. **Detekointireagenssi 2:ta EI SAA palauttaa alkuperäiseen pulloon. Käyttämättömät aineet on hävitettävä.**
  - Detekointireagenssi 2:n lisäämisen tulee tapahtua keskeytyksettä. Kaikkien kaivojen inkubaatioajankohtien tulee olla mahdollisimman lähekkäin.
  - Varo koskemasta mikrokaivon seinämiin tai roiskimasta reagenssia takaisin kärjille, jotta näytteet eivät ristiinkontaminoituisi (ks. kuva 1).
1. Käytä 8-kanavaista pipettiä ja annostele huolellisesti 75 µl detekointireagenssi 2:ta kuhunkin kuoppalevyn kaivoon edellä kuvattua käänteistä pipetointimenetelmää noudattaen. *Kaivojen värin tulee muuttua keltaiseksi*. Varmista kaivojen tarkka täyttyminen tarkkailemalla värin voimakkuutta. Värin voimakkuuden tulee olla sama kaikissa kaivoissa.
  2. Peitäkuoppalevyt kuoppalevyn kannella tai puhtaalla parafilmillä (tai vastaavalla) ja inkuboi 20–25 °C:ssa 15 minuutin ajan. Vältä suoraa auringonvaloa.
  3. Lue kuoppalevy QIAGENin hyväksymällä luminometrillä 15 minuutin inkuboinnin jälkeen (ja viimeistään 30 minuutin inkuboinnin jälkeen).
  4. *digene*-analyysimääritysohjelmisto sallii analyysille relevantin informaation suoran syötön ohjelmistoon.
  5. Jos et ole käyttänyt koko kuoppalevyä, poista käytetyt mikrokaivot kuoppalevyn pidikkeestä, huuhtelee pidike perusteellisesti tislattulla tai deionisoidulla vedellä, kuivaa ja laita talteen seuraavaa analyysiä varten.

## ANALYYSIN KALIBROINNIN VERIFIOINTIKRITEERIT

Analyyysin kalibroinnin verifiomisella on tarkoitus varmistaa, että reagenssit ja toimitetut kalibraattorit ja laatukontrolliaineet toimivat oikein ja mahdollistavat analyysin raja-arvon (Cutoff, CO) tarkan määrittämisen. Verifiointikriteerit lasketaan automaattisesti ja ne verifioidaan valideiksi tai ei-valideiksi *digene*-analyysimääritysohjelmistolla. *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe vaatii kalibroinnin jokaisen analyysin yhteydessä. Siksi on välttämätöntä verifioida kukin analyysi käyttämällä seuraavia kriteerejä. Tämän verifiointimenettelyn tarkoituksena ei ole korvata sisäistä laaduntarkkailukoekäytäntöä.

1. Negatiivinen kalibraattori  
Negatiivinen kalibraattori tulee testata kussakin analyysissä kolme rinnakkain. Jotta voidaan edetä, negatiivisen kalibraattorin RLU-keskiarvon pitää olla  $\geq 10$  RLU ja  $\leq 150$  RLU. Negatiivisen kalibraattorin tulosten osoittaman variaatiokertoimen (%CV) pitäisi olla  $\leq 25$  %. Jos %CV on  $>25$ , ohjelmisto hylkää poikkeavana tuloksena sen replikaatin, jolla on keskiarvosta kauimpana oleva RLU-arvo, ja keskiarvo ja %CV lasketaan uudelleen kahden jäljellä olevan replikaatin arvoilla. Uudelleen lasketun %CV-arvon tulee olla  $\leq 25$  %. **Muussa tapauksessa analyysin kalibroinnin verifiointi on epäpätevä ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.**
2. Positiivinen kalibraattori  
Positiivinen kalibraattori tulee testata kussakin analyysissä kolme rinnakkain. Positiivisen kalibraattorin replikaattien %CV-arvon tulee olla  $\leq 20$  %. Jos %CV on  $>20$  %, ohjelmisto hylkää poikkeavana tuloksena sen replikaatin, jolla on keskiarvosta kauimpana oleva RLU-arvo, ja keskiarvo ja %CV lasketaan uudelleen kahden jäljellä olevan replikaatin arvoilla. Uudelleen lasketun %CV-arvon tulee olla  $\leq 20$  %. **Muussa tapauksessa analyysin kalibroinnin verifiointi on epäpätevä ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.**
3. Keskimääräinen PC/keskimääräinen NC -suhdeluku  
Positiivisen kalibraattorin replikaattien (keskimääräinen PC) keskiarvoa and negatiivisen kalibraattorin replikaattien (keskimääräinen NC) keskiarvoa käytetään määritettäessä keskimääräinen

PC/keskimääräinen NC -suhdeluku. Ohjelmisto laskee keskimääräisen PC/keskimääräisen NC -suhdeluvun. Tämän suhdeluvun on täytettävä seuraavat kriteerit analyysikalibroinnin verifiointiseksi **ennen kuin tuloksia voidaan tulkita**. Jos suhdeluku on  $\geq 2,0$  ja  $\leq 20$ , ohjelmisto siirtyy raja-arvon (Cutoff, CO) laskentaan. Jos suhdeluku on  $< 2,0$  tai  $> 20$ , **analyysikalibrointi on epäpätevä ja analyysi on tehtävä uudestaan kaikkien potilasnäytteiden osalta. Näin ollen potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.**

**Huom.:** Jotta voitiin määrittää kalibraattorien toistettavuus *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeissa koottiin *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) -laitteella sisäisissä tutkimuksissa saadut tulokset, jotka käsittivät 62 Rapid Capture -järjestelmällä ja 43 manuaalisella menetelmällä tehtyä analyysia (ks. taulukko 3). Saadut tulokset osoittivat, että positiivisen kalibraattorin osalta näiden 105 analyysin keskimääräinen %CV-luku oli yhtä suuri tai pienempi kuin 6,5 % ja että negatiivisen kalibraattorin keskimääräinen %CV-luku oli yhtä suuri tai pienempi kuin 14,6 %. Kuten manuaalisille analyyseille saatu keskimääräisen negatiivisen kalibraattorin keskimääräinen RLU-arvo 43 osoittaa, verrattuna RCS-sovelluksen keskimääräiseen arvoon 54, RCS-sovelluksen on näytetty antavan NC RLU -arvoja, jotka ovat hiukan manuaalista menetelmää korkeampia. On osoitettu, ettei tällä erolla ole mitään vaikutusta kummalla menetelmällä tahansa saatuihin koetuloksiin. Negatiivisen kalibraattorin keskimääräiseksi RLU-kynnysarvoksi on määritetty 250 RLU:ta, joka tulos perustuu negatiivisen kalibraattorin keskimääräisen RLU-arvon  $\pm 3SD$ -poikkeaman tilastotieteelliseen laskentaan. Tämä arvo havaittiin *digene* HC2 CT/GC DNA -koejärjestelmällä laajassa testauksessa RCS-sovelluksen kehittämisen aikana. Tämän  $\pm 3SD$ -poikkeaman ylärajaa laajennettiin 20 %, jotta voitiin varmistaa, että NC:n RLU-kynnysarvo voitaisiin saavuttaa kliinisessä rutiinotoiminnassa.

NC:n keskimääräisen RLU-arvon tulee käytännössä olla todettavissa arvoilla  $\leq 150$  ja CV:n arvoilla  $\leq 25$  %. Jokaisen laboratorion tulee seurata laaduntarkkailun ja kalibroinnin toteutumista National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) -komitean asiakirjan C24-2A mukaan. RCS-sovelluksen antama keskimääräinen RLU-arvo voi joskus ylittää arvon 150, jolloin tapahtuu mahdollisesti myös vastaavaa laskua PC/NC-arvossa, joka taulukon 3 mukaan on todettu kalibroinnin jälkeen johtavan 8,29 keskiarvoon. Tässä tapauksessa tulokset voidaan hyväksyä, mikäli NC:n RLU-arvo on  $\leq 250$  ja PC/NC-suhde on  $\geq 2,0$ . Jos NC:n RLU-arvo ylittää 250 tai PC/NC-suhde alittaa arvon 2,0 tai ylittää arvon 20, analyysi on epäpätevä.

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

Mene- telmä	Kuoppa- levyjen lkm	PC/NC-suhdeluvun laskennalliset keskiarvot				Koesarjan laatukontrollit (keskim. RLU/CO)	
		Keskiarvo	Mediaani	Min.	Maks.	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Manuaal.	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Mene- telmä	Kalibraattori	RLU, laskennalliset keskiarvot				Keskim. laskennallinen %CV
		Keskiarvo	Mediaani	Min.	Maks.	
RCS	Negatiivinen	54	46	24	127	14,4
	Positiivinen	399	405	179	606	6,5
Manuaal.	Negatiivinen	43	36	16	120	14,6
	Positiivinen	295	309	167	415	4,7



## RAJA-ARVON LASKENTA

Kun analyysi on validoitu yllä esitettyjen kriteerien mukaisesti, valideja positiivisen kalibraattorin replikaatteja käytetään määrittäessä positiivisten näytteiden RLU-raja-arvot. RLU-raja-arvot lasketaan seuraavalla tavalla:

RLU-raja-arvo = keskimääräinen positiivinen kalibraattorin RLU

Esimerkki raja-arvon (CO) laskennasta:

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

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

*digene* analyysimäärittämissuoritusohjelmisto konvertoi kaikkien näytteiden RLU-arvot suhdeluvuiksi ao. RLU-raja-arvoon nähden. Esim. kaikki analyysit tulee ilmaista näytteen RLU-/raja-arvona.

**Huom.:** Kaikkien testattujen näytteiden RLU-/raja-arvot ja positiiviset/negatiiviset tulokset raportoidaan *digene*-analyysimäärittämissuoritusohjelmiston data-analysikertomuksessa.

## LAADUNTARKKAILU

Laaduntarkkailunäytteet sisältyvät *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeeseen. Ks. lisätietoja liittyen laaduntarkkailukontrollien eränumeroiden ja viimeisten käyttöpäivämäärien syöttöön kyseisen *digene*-analyysimäärittämissuoritusohjelmiston käyttöoppaasta. Näiden kontrollien tulee sisältyä jokaiseen analyysiin, ja jotta analyysiä voitaisiin pitää validina, kunkin laaduntarkkailukontrollin RLU/CO-arvon pitää jäädä oheisten hyväksyttävien vaihteluväliden sisälle. **Jos laaduntarkkailukontrollit eivät ole näiden vaihteluväliden sisällä, analyysi on epäpätevä ja se on toistettava.** Näin ollen epäpätevien analyysien potilasnäytteiden tuloksia ei tule raportoida.

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

1. Pakkaukseen kuuluvat laaduntarkkailukontrollit ovat kloonattuja CT ja GC DNA -kohteita ja ne koostuvat samasta plasmidirakenteesta kunkin yksittäisen organismin osalta (yksi CT:lle ja yksi GC:lle) kuin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeeseen kuuluvassa positiivisessa kalibraattorissa.
2. Tämä laatukontrolliaine ei ole sama kuin GC-organismi näytematriisissa eikä se sovellu laatukontrolliksi *digene*-näytteenkuljetusaineelle tai PreservCyt-liuokselle.
3. Positiivista kalibraattoria käytetään näytetulosten normalisointiin määrittämällä RLU-raja-arvo. Tähän pakkaukseen kuuluvat laatukontrollit tulee käyttää sisäiseen laaduntarkkailuun. Lisälaatukontroleja voidaan testata paikallisten, alueellisten ja/tai kansallisten tai akkreditoitujen organisaatioiden määräyksissä annettujen ohjeiden tai vaatimusten mukaisella tavalla.
4. Näytteiden liukenemisen ja denaturoinnin tehokkuuden testaamisessa laboratorioden tulee säännöllisin välein tehdä näytteiden preparointikontrollit lisäämällä >5.000 CFU/ml *Neisseria gonorrhoeae* (suosittelemme aukesotyyppiä 1, 5 tai Type-kantaa, jotka ovat saatavilla ATCC:sta) tuoretta näytteenkuljetusainetta sisältävään putkeen. Näytettä inkuboidaan huoneenlämpötilassa vähintään 1 tunti ennen testausta, joka suoritetaan samalla tavalla kuin muutkin kliinisten näytteiden testit. Tuloksena saadaan RLU/CO  $\geq 2,50$  edellyttäen, että näyte on asianmukaisesti prosessoitu. Tähän tarkoitukseen voidaan vaihtoehtoisesti käyttää myös yleisesti hyväksyttäviä näytteiden koepaneeleja, jotka sisältävät GC-organismita.

5. Hyväksyttävät kalibraattorien ja laatukontrollien vaihteluvälit on määritetty ainoastaan QIAGENin hyväksymille luminometreille. Negatiiviset kalibraattorit ja laatukontrollit tarkkailevat merkittävien reagenssien epäonnistumisten varalta eivätkä takaa analyysin tarkkuutta.

## NÄYTETULOSTEN TULKINTA

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

1. Näytteitä, joiden RLU-/CO:n suhde on  $\geq 2,50$  pidetään "positiivisina *Neisseria gonorrhoeae* DNA:n osalta". Organismien elinkykyisyyttä ja/tai tartuntavaarallisuutta ei voi päätellä, koska kohde-DNA:ta voi olla elinkykyisten organismien puuttuessa.
2. Näytteet, joiden RLU-/CO:n suhde on  $<1,00$  eivät sisällä *Neisseria gonorrhoeae* DNA:ta tai niiden sisältämät DNA-määrät jäävät analyysin detekointirajan alapuolelle. Nämä tulee tulkita ja raportoida "Neisseria gonorrhoeae DNA:ta ei havaittu" -tapauksina. Negatiivinen tulos ei sulje pois *Neisseria gonorrhoeae* -infektiota, koska tulokset ovat riippuvaisia riittävästä näytteiden keräämisestä ja riittävästä tutkittavan DNA:n määrästä.
3. Näytteitä, joiden RLU/CO-suhdeluvut ovat  $\geq 1,00$  ja  $< 2,50$ , pidetään epämääräisinä. Tuloksia voidaan pitää presumptiivisesti positiivisina *Neisseria gonorrhoeae* DNA:lle. Uusintatestausta potilaan uudella näytteellä tai lisätestausta vaihtoehtoisella koemenetelmällä kuitenkin suositellaan, koska positiivisen tuloksen prediktioarvo on pienempi näillä RLU/raja-arvoilla.\*
4. On suositeltavaa, että positiiviset tulokset vahvistetaan jollakin toisella menetelmällä, jos *Neisseria gonorrhoeae* -infektion todennäköisyys on epävarmaa tai kyseenalaista, kun otetaan huomioon kliiniset tai muut laboratoriolöydökset. Analyytiset selvitykset liittyen tähän kokeeseen ovat osoittaneet rajallista ristiinreagointia tiettyjen toisten DNA-sekvenssien kanssa, mistä voi olla seurauksena väärä positiivinen tulos. Ks. lisätietoja kohdasta *Analyytinen spesifisyys*.

\* *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kliinisessä arvioinnissa 3/17 tuloksesta tässä epämääräisten näytteiden sarjassa vahvistettiin positiivisiksi GC-viljelykokeella; loput 14 olivat nähtävästi väriä positiivisia tuloksia. Tätä seuranneessa arvioinnissa 5 näytteellä havaittiin alkuarvo RLU/CO välillä 1,00 ja 2,50, ja näistä kolme olivat positiivisia GC-viljelyssä. Näiden kolmen näytteen uusintakoe duplikaatteina *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella tuotti tuloksiksi  $\geq 1,00$  RLU/CO. Loput 2 näytettä olivat negatiivisia viljelyssä ja molemmat olivat negatiivisia myös kahdessa *digene* HC2 GC-ID DNA Test -uusintakokeessa.

## MENETELMÄN RAJOITUKSET

**Ks. menetelmän muita rajoituksia koskevia tietoja *Rapid Capture System* -järjestelmän käyttöoppaasta nimenomaan, kun järjestelmää käytetään lukuisien näytteiden tehotestaamiseen.**

- Vain *in vitro* diagnostiseen käyttöön.
- Luotettavien testitulosten saamiseksi tulee *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koemenetelmää, laaduntarkkailua ja näytetulosten tulkintaa seurata tarkasti.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koetta voidaan käyttää vain kohdunkaulanäytteille, jotka on otettu *digene* HC2 DNA -näytteenottimella ja asetettu STM-näytteenkuljetusaineeseen, tai kohdunkaulanäytteille, jotka on otettu *digene* Female Swab Specimen Collection -pakkauksen välineillä ja asetettu STM-näytteenkuljetusaineeseen, tai näytteille, jotka on otettu harjamaisella keräysvälineellä ja asetettu Hologic PreservCyt -liuokseen.
- Tämän kokeen tulokset tulee tulkita vain yhdessä käytettävissä olevien potilaan kliinisestä arvioinnista saatavien ja muiden menetelmien tulosten kanssa.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe tuottaa kvalitatiivisia tuloksia. Potilaan näytteestä saadun raja-arvon yläpuolelle sijoittuvan numeerisen arvon (suhdeluvun) ei ole osoitettu korreloivan potilaan näytteessä olevan GC DNA:n määrän kanssa.
- Negatiivinen tulos ei sulje pois *Neisseria gonorrhoeae* -infektion mahdollisuutta, koska detekointi on riippuvainen näytteessä olevien organismien lukumäärästä ja siihen voivat myös vaikuttaa näytteenottomenetelmät, potilaan ominaisuudet, infektiotaihe ja/tai infektoiva *Neisseria gonorrhoeae* -kanta.

- *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koetta ei ole tarkoitettu hoidon onnistumisen mittaamiseen.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe on validoitu vain käyttöön automaattisen kuoppalevypesuri I:n kanssa ja soveltaen analyysiohjeissa spesifioituja asetuksia. Kyseinen validointitutkimus tehtiin sisäisesti QIAGEN -yhtiössä ja yhtiö on arkistoinut sitä tukevan aineiston. Muita kuoppalevypesureita ja muita kuoppalevypesuriasetuksia ei hyväksytä *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeeseen.
- *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tulosten vaihtelevuuden minimoimiseksi on välttämätöntä, että analyysiä suorittava laboratoriohenkilöstö saavuttaa teknisesti riittävän pätevyyden. Laboratorioiden tulee lisäksi seurata niissä suoritettujen analyysien teknistä pätevyyttä. Tämän toteuttamiseksi suosittelemme, että laboratoriot säännöllisin välein suorittavat testejä, joissa käytetään kaupallisesti saatavia GC-organismeja tai GC DNA:ta sisältäviä näytesarjoja ja että nämä testit toteutetaan noudattaen ao. laitoksen laaduntarkkailumenetelmiä.

## ODOTETTAVISSA OLEVAT TULOKSET

### YLEISYYS

*Neisseria gonorrhoeae* -positiivisten näytteiden yleisyyteen vaikuttavat populaation ominaisuudet, esim. ikä, sukupuoli ja riskitekijät. *Neisseria gonorrhoeae* -näytteiden yleisyys tarkasteltuna kliinisessä tutkimuspopulaatioissa käyttäen *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koetta vaihteli välillä 1,1–13,0 %. Yleisyys laskettiin olettaen, että tutkimuksen 17 epämääräistä näytettä olivat GC DNA -positiivisia (taulukko 4). Kahdeksan näistä 17 näytteestä vahvistettiin positiivisiksi GC-viljelyllä tai Polymerase Chain Reaction (PCR) -ketjureaktiossa.

**Taulukko 4.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen positiivisten tulosten yleisyys testikohteen mukaan.

Tutk.laitos	Positiiv. lkm / testatt. lkm	Yleisyys-%
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
Yhteensä	131/1825	7,2

### POSITIIVISET JA NEGATIIVISET PREDIKTIIVISET ARVOT

Eri yleisyysarvojen hypoteettiset positiiviset ja negatiiviset arvot (PPV ja NPV) *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa laskettiin käyttämällä kokonaisherkkyyttä ja -spesifisyyttä, jotka määritettiin yksittäin näytteille, jotka kerättiin *digene* HC2 DNA -näytteenottimella (kohdunkaulaharjalla) ja näytteille, jotka kerättiin *digene* HC Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkauksella (vanutuppo). Taulukossa 5 esitetään hypoteettiset PPV- ja NPV-arvot harjanäytteille (kokonaisherkkyyys 92,6 % ja -spesifisyys 98,5 %), ja taulukossa 6 esitetään hypoteettiset PPV- ja NPV-arvot tupponäytteille (kokonaisherkkyyys 93,0 % ja -spesifisyys 98,8 %).

**Taulukko 5.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen hypoteettiset prediktiviiset arvot eri yleisyysarvoilla (harja).

Yleisyysarvo (%)	Herkkyys (%)	Spesifisyys (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,6

**Taulukko 6.** *digene* HC2 GC-ID DNA -kokeen hypoteettiset prediktiviiset arvot eri yleisyysarvoilla (tuppo).

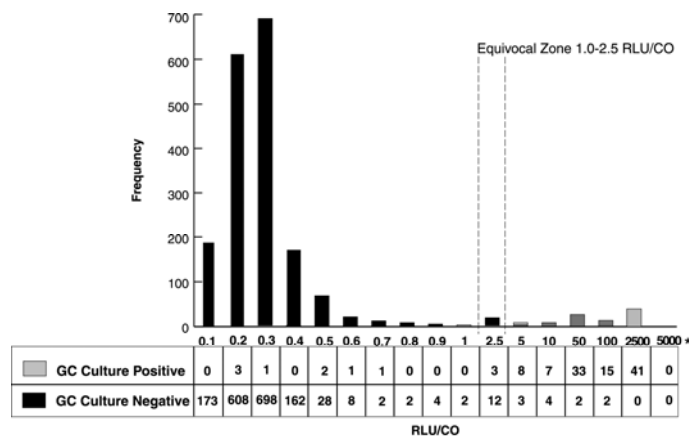
Yleisyysarvo (%)	Herkkyys (%)	Spesifisyys (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

## FREKVENSSIJAKAUMA: *digene* HC2 GC-ID DNA TEST -KOEEN RLU/CO-TULOKSET

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen RLU/CO-suhdelukujen jakauma kliinisessä monikeskustutkimuksessa on esitetty jäljempänä (kuva 1). Näihin tietoihin sisältyvät kaikki ne näytteet, joille tehtiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe ja joille oli saatavissa GC-viljelyn tulokset (n=1826). Tulokset tulkittiin seuraavien kriteereiden mukaan. Näytteet, joiden RLU/CO-arvot olivat < 1,00, tulkittiin negatiivisiksi. Näytteet, joiden RLU/CO-arvot olivat ≥ 2,50, tulkittiin positiivisiksi. Näytteet, joiden RLU/CO-arvot olivat ≥ 1,00 ja < 2,50, tulkittiin epämääräisiksi.

RLU/CO-suhdeluvuissa havaittiin selkeä ero *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen positiivisten ja negatiivisten tulosten välillä. Yhdeksälläkymmenellä yhdeksällä prosentilla (1676/1690) *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen negatiivisia näytteitä RLU/CO-arvo oli välillä 0,0 ja 0,5. Viisi (5/1690) *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen negatiivista tuloksista tuotti RLU/CO-arvon välillä 0,6 ja 0,8. Kaikkiaan alle yksi prosentti (< 0,9 %, 17/1825) näytetuloksista jäi analyysin epämääräiselle alueelle, ja näistä 47 % (8/17) oli positiivisia GC-viljelyssä tai PCR:ssä. Kahdeksälläkymmenellä yhdeksällä prosentilla (93/104) *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen positiivisia näytteitä RLU/CO-arvo oli 10–2500.

**Kuva 1.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen RLU/CO-tulosten frekvenssijakauma.



\*Osoittaa alueen yläpäättä, mukaan lukien mainittu arvo.

## SUORITUSARVOT

### KLIINISEN TUTKIMUKSEN TULOKSET NÄYTTEEN MUKAAN

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suoritusarvot määritettiin vertaamalla analyysin antamia tuloksia Gonorrhoea-viljelyn antamiin tuloksiin. Potilailta testattiin 1825 näytettä, ja myöhemmin nämä näytteet testattiin 5 eri kohteessa, mukaan lukien sukupuolitauti (STD)-, perhesuunnittelu- ja naistenklinikoissa. PCR-testaus tehtiin näytteille, jotka olivat positiivisia *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa ja negatiivisia viljelyssä. *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tuloksia EI ratkaistu PCR-testituloksilla, ja siksi PCR:illä ei ollut lainkaan vaikutusta *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suoritusarvojen laskemiseen. Kliinisen tutkimuksen tulokset *digene* HC2 DNA -näytteenottimella (kohdunkaulaharjalla) kerätyille näytteille on esitetty taulukossa 7 ja *digene* Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkauksella (Dacron-tupolla) kerätyille näytteille taulukossa 8.

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suoritusarvot laskettiin käyttämällä sekä raja-arvoa 1,0 että 2,5 ottamatta huomioon presumptiivisia positiivisia näytteitä, jotka jäivät epämääräiselle alueelle, kuten on kuvattu näiden käyttöohjeiden kohdassa *Näytetulosten tulkinta*. Siksi *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suorituskyky voi vaihdella laboratorioissa riippuen epämääräiselle alueelle jäävien arvojen hajonnasta sekä uusintatuloksista, jotka saadaan testattaessa uudelleen presumptiivisia positiivisia (epämääräisen alueen) näytteitä. Viitteeksi mainittakoon, että alle 0,9 % (17/1825) näytteistä, jotka testattiin kliinisessä monikeskustutkimuksessa ja joita käytettiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suorituskyvyn määrittämiseen, jäivät tälle alueelle. Katso lisätietoja näiden käyttöohjeiden kohdasta *Odotettavissa olevat tulokset, RLU/CO-tulosten frekvenssijakauma*.

Ei ole tuotettu riittävästi tietoja, jotta voitaisiin määrittää tarkasti, vastaako HC Female Swab Specimen Collection Kit -välinepakkauksella kerättyjen näytteiden *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen herkkyys- ja prediktiivinen positiivinen arvo *digene* HC2 DNA -näytteenottimella kerättyjen näytteiden vastaavia arvoja. Koska *digene* HC2 DNA -näytteenottimen käytölle on kontraindikaatioita kerätessä kohdunkaulanäytteitä raskaana olevilta naisilta, kokeen kyky havaita GC DNA:ta voi alentua tähän populaation ryhmään kuuluvien potilaiden keskuudessa tai käytettäessä Dacron-tuppoa.

Tutkimuksen suorituskykyarvot perustuvat näytteisiin, joita säilytettiin 2–8 °C:n lämpötilassa tai pakastettuina ja jotka testattiin 1-2 viikon kuluessa näytteenottohetkestä.

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kliinistä herkkyyttä ja spesifisyyttä detektoitaessa näillä potilailla esiintyvää kliinisesti aktiivista infektiota, joka voi siirtyä kumppaneille tai aiheuttaa GC:hen liittyviä jälkiseurauksia, ei ole määritetty verrattuna kaikkiin yleisesti hyväksyttäviin nukleinihapon vahvistusmenetelmiin (NAA) GC DNA:n detekoinnissa. Kliinisissä tutkimuksissa, joissa näytteitä testattiin muunnellulla, yleisesti hyväksyttävällä nukleinihapon vahvistusanalyysillä, havaittiin positiivisuutta joissakin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen positiivisissa näytteissä, jotka oli saatu potilailta, joiden viljelytulos oli negatiivinen. Arvioitu herkkyys perustuu niihin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen positiivisiin tuloksiin, jotka saatiin potilailta, joiden viljelytulos oli *Neisseria gonorrhoeae* -positiivinen. Siksi *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen herkkyys voidaan päätellä vain suhteessa viljelypositiivisuuteen, jonka herkkyys saattaa olla 60-85 %.

**Taulukko 7.** *digene* HC2 GC-ID DNA -kokeen vs. GC-viljelyn tulokset harjanäytteille. Suoritusarvot, jotka laskettiin käyttämällä RLU/-raja-arvoja 1,0 ja 2,5, on esitetty seuraavassa; suluissa esitetyt arvot edustavat suorituskykyä, kun otetaan huomioon 2,5 RLU/-raja-arvo. 95 %:n luotettavuusvälit sisältävät molemmat sarjat, kun pisteiden arviot erosivat kussakin arvioidussa RLU/raja-arvossa.

	T <sup>1</sup> paikka <sup>2</sup>	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Viljely: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Herkkyys	PPV	Spesifisyys	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID viljely PCR <sup>1</sup> +
<b>Symptomaattiset</b>											
95% luotett.v.	1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00) 83,1–99,9	84,78 (92,68) 80,1–98,5	97,75 (99,04) 97,2–99,8	99,67 (99,35) 98,2–100	5/7 (2/3)
95% luotett.v.	2	188	13	2	4	169	76,47 50,1–93,2	86,67 59,5–98,3	98,83 95,8–99,9	97,69 94,2–99,4	1/2
95% luotett.v.	3	233	14	6 (3)	1	212 (215)	93,33 68,1–99,8	70,00 (82,35) 56,6–96,2	97,25 (98,62) 96,0–99,7	99,54 97,4–100	0 <sup>3</sup> /6
95% luotett.v.	4	163	4	0	0	159	100,00 39,8–100	100,00 39,8–100	100,00 97,7–100	100,00 97,7–100	Ei koske
	<b>Kaikki</b>	<b>935</b>	<b>70 (69)</b>	<b>15 (8)</b>	<b>6 (7)</b>	<b>844 (851)</b>	<b>92,11 (90,79)</b> <b>83,6–97,1</b>	<b>82,35 (89,61)</b> <b>80,1–95,4</b>	<b>98,25 (99,07)</b> <b>98,2–99,6</b>	<b>99,29 (99,18)</b> <b>98,5–99,7</b>	<b>6<sup>3</sup>/15</b>
<b>95 %:n luotett.v. Asymptomaattiset</b>											
95% luotett.v.	1	101	10 (9)	2	0 (1)	89	100,00 (90,00) 69,2–100	83,33 (81,82) 51,6–97,9	97,80 92,3–99,7	100,00 (98,89) 95,9–100	2/2
95% luotett.v.	2	12	2	0	0	10	100,00 15,8–100	100,00 15,8–100	100,00 69,2–100	100,00 69,2–100	Ei koske
95% luotett.v.	3	84	1 (0)	0	0 (1)	83	100,00 (0,00) 2,5–100	100,00 2,5–100	100,00 95,7–100	100,00 (98,81) 95,7–100	Ei koske
95% luotett.v.	4	226	4	2 (0)	1	219 (221)	80,00 28,4–99,5	66,67 (100,00) 39,8–100	99,10 (100,00) 98,3–100	99,55 97,5–100	1/2 Ei koske
95% luotett.v.	5	1	0	0	0	1	Ei koske	Ei koske	100,00 2,5–100	100,00 2,5–100	Ei koske
	<b>Kaikki</b>	<b>424</b>	<b>17 (15)</b>	<b>4 (2)</b>	<b>1 (3)</b>	<b>402 (404)</b>	<b>94,44 (83,33)</b> <b>72,7–99,9</b>	<b>80,95 (88,24)</b> <b>63,6–98,5</b>	<b>99,01 (99,51)</b> <b>98,2–99,9</b>	<b>99,75 (99,26)</b> <b>98,6–100</b>	<b>3/4 (2/2)</b>
<b>95% luotett.v. KAIKKI</b>											
95% luotett.v.	1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	98,00 (94,00) 89,4–100	84,48 (90,38) 79,0–96,8	97,76 (98,76) 97,1–99,6	99,75 (99,25) 98,6–100	7/9 (4/5)
95% luotett.v.	2	200	15	2	4	179	78,95 54,4–94,0	88,24 63,6–98,5	98,90 96,1–99,9	97,81 94,5–99,4	1/2
95% luotett.v.	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50) 69,8–99,8	71,43 (82,35) 56,6–96,2	98,01 (99,00) 97,1–99,8	99,66 (99,33) 98,1–100	0 <sup>3</sup> /6
95% luotett.v.	4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89 51,8–99,7	80,00 (100,00) 63,1–100	99,47 (100,00) 99,0–100	99,74 98,5–100	1/2 (N/A)
95% luotett.v.	5	1	0	0	0	1	Ei koske	Ei koske	100,00 2,5–100	100,00 2,5–100	Ei koske
	<b>Kaikki</b>	<b>1359</b>	<b>87 (84)</b>	<b>19 (10)</b>	<b>7 (10)</b>	<b>1246 (1255)</b>	<b>92,55 (89,36)</b> <b>85,3–97,0</b>	<b>82,08 (89,36)</b> <b>81,3–94,8</b>	<b>98,50 (99,21)</b> <b>98,6–99,6</b>	<b>99,44 (99,21)</b> <b>98,9–99,8</b>	<b>9<sup>3</sup>/19</b>

<sup>1</sup> Nämä tiedot on annettu vain tiedoksi; näytteiden tuloksia ei ratkaistu PCR:llä.

<sup>2</sup> Kohteessa 5 ei ollut yhtään symptomaattisten potilaiden harjanäytettä.

<sup>3</sup> Kahdessa tapauksessa PCR-testiä ei tehty.

N/A = Ei koske

**Taulukko 8.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen vs. GC-viljelyn tulokset tupponäytteille. Suoritusarvot laskettuina käyttäen RLU/raja-arvoja 1,0 ja 2,5 on esitetty seuraavassa. Suluissa esitetyt arvot edustavat suorituskykyä, kun otetaan huomioon 2,5 RLU/raja-arvo. 95 %:n luotettavuusvälit sisältävät molemmat sarjat, kun kohtien arviot erosivat kussakin arvioidussa RLU/raja-arvossa.

		<i>digene</i> HC2 GC-ID: Viljely: n=										<i>digene</i> HC2 GC-ID viljely PCR <sup>1+</sup>
	T <sup>1</sup> paikka <sup>2</sup>	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Herkkyys	PPV	Spesifisyys	NPV			
<b>Symptomaattiset</b>												
95% luotett.v.	1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18) 81,34–99,32	94,44 (91,18) 81,34–99,32	99,37 (99,06) 97,75–99,92	99,37 (98,44) 97,75–99,92	Ei koske	
95% luotett.v.	2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86 66,1–99,8	86,67 (100) 75,3–100	97,44 (100) 95,4–100	98,70 (98,73) 93,2–100	0/2	
95% luotett.v.	3	5	2	0	0	3	100 15,8–100	100 15,8–100	100 29,2–100	100 29,2–100	Ei koske	
95% luotett.v.	5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	Ei koske	0,00 2,5–100	98,15 (99,38) 96,6–100	100 97,7–100	1 <sup>3</sup> /3	
<b>95% luotett.v. Asymptomaattiset</b>	<b>Kaikki</b>	<b>613</b>	<b>49 (46)</b>	<b>7 (4)</b>	<b>3 (6)</b>	<b>554 (557)</b>	<b>94,23 (88,46) 84,05–98,79</b>	<b>87,50 (92,00) 75,93–94,82</b>	<b>98,75 (99,29) 97,45–99,50</b>	<b>99,46 (98,93) 98,43–99,89</b>	<b>1<sup>3</sup>/5</b>	
95% luotett.v.	1	61	1	0	1	59	50,00 1,26–98,74	100 2,50–100	100 93,94–100	98,33 91,06–99,96	Ei koske	
95% luotett.v.	2	10	2	0	0	8	100 15,8–100	100 15,8–100	100 63,1–100	100 63,1–100	Ei koske	
95% luotett.v.	3	2	0	0	0	2	Ei koske	Ei koske	100 15,8–100	100 15,8–100	Ei koske	
95% luotett.v.	4	1	0	0	0	1	Ei koske	Ei koske	100 2,5–100	100 2,5–100	Ei koske	
95% luotett.v.	5	186	1	0	0	185	100 2,5–100	100 2,5–100	100 98,0–100	100 98,0–100	Ei koske	
<b>95 %:n luotett.v. KAIKKI</b>	<b>Kaikki</b>	<b>260</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>255</b>	<b>80,00 28,36–99,49</b>	<b>100 39,76–100</b>	<b>100 98,56–100</b>	<b>99,61 97,84–99,99</b>	<b>Ei koske</b>	
95% luotett.v.	1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21) 78,62–98,34	87,50 (91,43) 73,20–95,81	98,67 (99,20) 96,93–99,57	99,20 (98,42) 97,68–99,83	Ei koske	
95% luotett.v.	2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75 69,8–99,8	88,24 (100) 63,6–100	97,67 (100) 91,9–100	98,82 (98,85) 93,6–100	0/2	
95% luotett.v.	3	7	2	0	0	5	100 15,8–100	100 15,8–100	100 47,8–100	100 47,8–100	Ei koske	
95% luotett.v.	4	1	0	0	0	1	Ei koske	Ei koske	100 2,5–100	100 2,5–100	Ei koske	
95% luotett.v.	5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100 2,5–100	25,00 (50,00) 1,3–98,7	99,14 (99,71) 98,4–100	100 98,9–100	1 <sup>3</sup> /3	
<b>95% luotett.v.</b>	<b>Kaikki</b>	<b>873</b>	<b>53 (50)</b>	<b>10 (4)</b>	<b>4 (7)</b>	<b>806 (812)</b>	<b>92,98 (87,72) 83,00–98,05</b>	<b>84,13 (92,59) 72,74–92,12</b>	<b>98,77 (99,51) 97,76–99,41</b>	<b>99,51 (92,59) 98,74–99,87</b>	<b>1<sup>3</sup>/5</b>	

<sup>1</sup> Nämä tiedot on annettu vain tiedoksi; näytteiden tuloksia ei ratkaistu PCR:llä.

<sup>2</sup> Kohteessa 4 ei ollut yhtään symptomaattisten potilaiden tupponäytettä.

<sup>3</sup> Kahdessa tapauksessa PCR-testiä ei tehty.

N/A = Ei koske

## TOISTETTAVUUS

Toistettavuustutkimus tehtiin osana kliinistä monikeskustutkimusta, jonka tavoitteena oli selvittää analyysikohtainen, päiväkohtainen, kohdekohtainen ja kokonaistoistettavuus *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen osalta. Käytettiin paneelia, joka koostui *Neisseria gonorrhoeae* DNA-kohteista (engl. target) ja *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa positiivisiksi todetuista kliinisistä näytteistä ja *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa negatiivisiksi todetuista kliinisistä näytteistä.

Testattiin 10-jäseninen paneeli naamioituja, denaturoituja kliinisiä ja ei-kliinisiä (DNA) näytteitä. Paneeli koostui 8 positiivisesta näytteestä ja 2 negatiivisesta näytteestä, ja se testattiin kuuden replikaatteina kahdesti päivässä kolmen päivän ajan kussakin 4 kohteessa (3 ulkoista kohdetta ja QIAGEN:n laboratoriossa). Kukin tutkimuspaikka tuotti 36 datapistettä jokaista testattua kohdetta (engl. target) kohti. Kaikki näytteet oli denaturoitu ja säilytetty pakastettuina ennen testaamista. 100 %:nen yhtäpitävyys todettiin 1152:n odotettavissa olevan positiivisen tuloksen suhteen (1152/1152) ja 100 %:nen yhtäpitävyys todettiin 288:n odotettavissa olevan negatiivisen tuloksen suhteen (288/288). Kokonaisyhtäpitävyys oli 100 % (1440/1440), kun 95 %:n luotettavuusväli oli 99,7–100 ja Kappa = 1,00. Mitään merkittävää analyysikohtaista, päiväkohtaista tai kohdekohtaista vaihtelua ei havaittu, ja siksi kaikkien analyysien data kussakin kohteessa yhdistettiin ja ne on esitetty alla olevassa taulukossa (taulukko 9).

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

Kohteen numero	T'paikka 1		T'paikka 2		T'paikka 3		T'paikka 4		Yhteensä	
	$\bar{X}$ RLU /CO	% yhtäp	$\bar{X}$ RLU /CO	% yhtäp	$\bar{X}$ RLU /CO	% yhtäp	$\bar{X}$ RLU /CO	% yhtäp	$\bar{X}$ RLU /CO	Havaittu/Odotettu % yhtäp
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
YHT.										1440/1440 100

Toinen pätevyys-/toistettavuustutkimus, jossa käytettiin kokonaisia *Neisseria gonorrhoeae* (GC) -organismeja lisättyinä epiteelisoluista muodostettuun valekliiniseen näytematriisiin, toteutettiin kolmessa ulkopuolisessa kohteessa. Testatut 25 näytettä sisälsivät seuraaviin ryhmiin kuuluvia näytteitä: negatiivisia, alhaisia (detekointirajalla tai sen lähellä olevia) ja keskitason positiivisia joissa oli 2 GC-kantaa, sekainfektioita joissa oli *Chlamydia trachomatis* (CT) -näytteitä sekä verta sisältäviä näytteitä. Kahdentoista näytteen odotettiin olevan positiivisia ja kolmentoista näytteen odotettiin olevan negatiivisia. Prosentuaalinen yhtäpitävyys *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen havaittujen ja odotettujen tulosten osalta kolmessa eri kohteessa ja kaikki kohteet yhdistettyinä on esitetty taulukossa 10. Kunkin kohteen herkkyys-, spesifisyys-, yhtäpitävyys- ja kappa-arvot on esitetty taulukossa 11.

**Taulukko 10.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen prosentuaalinen yhtäpitävyys kohteittain.

T'paikka	Havaitut vs. Odotetut	Pros. yhtäpitävyys*
1	25/25	100 % (86,28–100 %)
2	25/25	100 % (86,28–100 %)
3	25/25	100 % (86,28–100 %)
Yhdist. kohteet	75/75	100 % (95,20–100 %)

\* Suluissa olevat luvut tarkoittavat 95 %:n luotettavuusväliä.

**Taulukko 11.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tulosten yhteenvetotilasto (raja-arvo 1,0).

Tilastoll. mitta	T'paikka 1	T'paikka 2	T'paikka 3	Yhteensä
Herkkyys	100 % (73,54–100 %)*	100 % (73,54–100 %)	100 % (73,54–100 %)	100 % (90,26–100 %)
Spesifisyys	100 % (75,29–100 %)	100 % (75,29–100 %)	100 % (75,29–100 %)	100 % (90,97–100 %)
Yhtäpitävyys	100 % (86,28–100 %)	100 % (86,28–100 %)	100 % (86,28–100 %)	100 % (95,20–100 %)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

\*Suluissa olevat luvut tarkoittavat 95 %:n luotettavuusväliä.



Rutiinimaisessa testaustoiminnassa taulukossa 10 esitetyt 12 epämääräistä näytettä, joista jokainen sisälsi alhaisia GC-organismien pitoisuuksia (~5x10<sup>4</sup> organismeja/ml), ja ne tulkittaisiin positiivisiksi näiden käyttöohjeiden kohdan *Näytetulosten tulkinta* mukaan. Näin ollen voitiin osoittaa, että analyysi kykenee detektoimaan GC DNA:n näytteistä, joiden pitoisuudet ko. organismien osalta ovat analyysin detekointirajalla tai sen lähellä. Lisänäyttöä tästä saatiin testattaessa paneeli, jonka näytteet sisälsivät vähäisiä määriä organismeja välillä, jossa detekointi oli tarkoitus suorittaa nukleehapon vahvistukseen perustuvilla analyyseilla. Kolmessa ulkopuolisessa kohteessa ja QIAGEN laboratoriossa suoritettut testit tuottivat 100 %:sti positiiviset (tai presumptiivisesti positiiviset) tulokset niille paneelin näytteille, jotka sisälsivät GC-organismeja. Kahdessa tapauksessa RLU/CO-arvot jäivät analyysin epämääräiselle alueelle (ks. Taulukko 12).

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

<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tulos			
T'paikka	RLU/CO	Tulkinta	Odotettu tulos
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

**TARKKUUS**

Kolmessa kohteessa toteutettiin tarkkuustutkimus, jonka tavoitteena oli määrittää analyysin sisäinen ja kokonaistarkkuus käytettäessä *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koetta positiivisista ja negatiivisista naamioiduista simuloiduista kliinisistä näytteistä koostuvan paneelin testaamiseen. Lisäksi samalla paneelilla testattiin kahden erillisen luminometrin avulla seurattua laitteiden välistä ja sisäistä tarkkuutta. Ko. kaksi luminometrimallia olivat DML 2000 -laitteisto, joka on yksi *digene* HC2 CT/GC DNA -kokeen yhteydessä suositeltavista luminometreistä, ja MLX-luminometri, joka on eräs käytöstä poistunut kliinisessä arvioinnissa aikaisemmin käytetty malli. Muiden *digene* HC2 DNA -kokeiden suorittaminen osana tätä tutkimusta aiheutti yhdessä näistä kolmesta tutkimuslaitoksesta vaikeuksia, joiden voidaan katsoa liittyneen analyysitekniikkaan ja todennäköisimmin johtuneen vääranlaisesta tai riittämättömästä koulutuksesta. Vaikka tämä ei vaikuttanut *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tarkkuustestituloksiin, testauksen tehnyt teknikko sai uudelleen koulutusta asianmukaisessa analyysitekniikassa.

Taulukossa 13 esitetään *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suorituskyky kaikille kohteille yhdistettyinä (mukaan lukien kohde, jossa esiintyi teknisiä ongelmia ennen teknikon uudelleen kouluttamista asianmukaisessa analyysitekniikassa). Teknikon uudelleen kouluttamisen jälkeen analyysissä saatiin kuitenkin vastaavaa tarkkuutta myös paneelijäsenelle 3 (joka sisälsi alhaisia GC-organismien pitoisuuksia), havaitut RLU/CO-arvot olivat analyysin epämääräisen alueen 1,0-2,5 rajoissa tai niiden lähellä. Näiden data-analyyseiden tarkoituksia varten kaikki RLU/CO-arvot, jotka jäivät epämääräisen alueen rajoihin tai ylittivät arvon 2,5, tulkittiin positiivisiksi. Vaikka se ei olekaan ilmeistä taulukosta, kvalitatiiviset tulokset olivat 100 %:sen (54/54) (93,4–100 % 95 %:n luotettavuusväli) yhtäpitäviä odotettujen tulosten kanssa kaikissa kolmessa kohteessa.

**Taulukko 13.** Laitteen sisäinen, laitteiden välinen, analyysikohtainen ja kokonaistarkkuusarvio RLU/CO-suhdeluvulle testin ja tavoitteen mukaan.

Paneeli-jäsen	n	K'arvo RLU/CO	Laitteen sisäinen		Laitteiden välinen		Analyysikohtainen		Yhteensä	
			Keski-hajonta (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	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

Näiden data-analysien tarkoituksia varten kaikki RLU/CO-arvot, jotka jäivät epämääräisen alueen rajoihin tai ylittivät arvon 2,5, tulkittiin positiivisiksi. QIAGEN -yhtiö suoritti lisätutkimuksen tavoitteena selvittää *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kokonaistarkkuus DML 2000 -laitteistoa käytettäessä. Kuusijäseninen tarkkuuspaneeli valmisteltiin simuloituista kliinisistä näytteistä koostuvalle paneelille, jossa oli viljeltyjä epiteelisoluja *digene* STM-näytteenkuljetusaineeseen suspendoituina. Itse näytteet koostuivat kahdesta negatiivisesta näytteestä, kahdesta alhaisen positiivisuuden näytteestä ja kahdesta keskitason positiivisesta näytteestä, ja kaikki sisälsivät harjan näytteenottovälineenä. Kunkin paneelin testasi kaksi laboratorioteknikkoa kolmena toistona, kaksi paneelia per levy, 5 päivän kuluessa. Tuore denaturoitu paneeli otettiin käyttöön kullekin levyille. *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kokonaistarkkuustulokset kaikilta viideltä päivältä on esitetty taulukossa 14. Vaikka se ei näistä taulukoista käykään ilmi, tuloksien kvalitatiivinen tulkinta oli 100 %:sesti yhtäpitävä odotettujen tulosten kanssa (120/120; 96,97–100 % 95 %:n luotett.väli), kun RLU/CO = 1,0.

**Taulukko 14.** Kokonaistarkkuus *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen osalta.

Paneeli-jäsen	n	Kesk. RLU/CO	SD	CV%	Kesk -2xSD	Kesk +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

#### PRESERVCYT-NÄYTTEIDEN TARKKUUS

PreservCyt-liuosnäytteitä testattaessa suoritettiin monikeskustutkimus karakterisoimaan analyysin laboriokohtainen ja päiväkohtainen tarkkuus. Kaksi QIAGEN n ulkopuolista kohdetta testasi kaksitoistajäsenisen PreservCyt-liuokseen kerättyjen simuloitujen potilasnäytteiden paneelin. Kukin laboratorio testasi paneelin kolmena toistona kahdesti päivässä kolmen päivän ajan käyttäen saman valmistajan samaa reagenssierää. Simuloitujen PreservCyt-liuosnäytteiden kaksitoistajäseninen paneeli preparoitiin eri GC (auksotyypit 22; ATCC 27631) -määrillä, ja niillä saatiin taulukossa 15 esitettävä paneeli:

**Taulukko 15.** Simuloitujen PreservCyt-liuosnäytteiden tarkkuuspaneeli *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeelle.

Kokonais-näyte	Paneeli-jäsenet*	Odotetun <i>digene</i> HC2 GC ID DNA Test -kokeen tulos	Keskimäär. RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Alh. GC-positiivinen	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Keskiv. GC-positiivinen	~10
C	5N, 11N	Negatiivinen	~0,20
D	6N, 12N	Negatiivinen	~0,20

\*Näytteen tunnistus osoittaa tunnetun *Neisseria gonorrhoeae* -statuksen [positiivinen (P) tai negatiivinen (N)].

Data-analysiä varten samasta kokonaisnäytteestä peräisin olevat paneelijäsenet yhdistettiin.

**Taulukko 16.** Kvalitatiiviset tulokset kokonaisnäytteen mukaan – *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koemenetelmä.

Kokonaisnäytekokoe lma	GC-posit. n (%)	Epämäär. n (%)	Negat. n (%)	Yhteensä
Negatiivinen (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negatiivinen (6N, 12N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
<b>Negatiivisia yhteensä</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Alh. posit. (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Keskiv. posit. (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
<b>Yhteensä positiivisia</b>	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Taulukko 17.** Tarkkuuden keskihajonta (SD) ja variaatiokerroin (CV) laboratorion ja päivän mukaan: *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe PreservCyt-liuoksessa

Näyte	N	Keskim. RLU/CO	Ajokoht. keskihaj.	Ajojen väl. keskihaj.	Päivä- koht. keskihaj.	Koht. väl. keskihaj.	Keskihaj. yhteensä	%CV
Negatiivinen (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negatiivinen (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
GC keskiv. positiiv. (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
GC alh. positiiv. (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

\*Negatiiviset variaatioluvut oli asetettu nolaksi.

## ANALYYTTINEN HERKKYYS

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen analyyttinen herkkyys (detekointirajat) määritettiin testaamalla suoraan laimennussarja näytepaneelille, joka käsitti *Neisseria gonorrhoeae*n 114 erillistä isolaattia. Mainitut 114 isolaattia edustivat 13 auksotyyppiä, 5 serovaria, 10 antibiooteille resistenttiä kantaa, 6 plasmiditonta kantaa ja 2 ominaisuuksiltaan tunnistamatonta isolaattia, jotka oli todettu diskordanteiksi monikeskustutkimuksessa. Kunkin isolaatin 4 pisteen laimennussarjat testattiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella, jotta voitiin määrittää testin detekointirajat. Kunkin *Neisseria auksotyypin* detekointiraja on esitetty yhteenvetona taulukossa 18. Annettu detekointirajan alue oli kunkin sellaisen auksotyypin laimennus, joka havaittiin analyysin epämääräisen alueen 1,0-2,5 RLU/CO rajoissa tai hyvin lähellä sitä.

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen analyyttinen herkkyys vaihteli välillä 25–50.000 pesäkeyksikköä/analyysi testatuille 114 *Neisseria*-isolaatille, mukaan lukien auksotyypit, serovarit, plasmidittomat ja antibiooteille resistentit kannat. Vain yhdelle kuudesta testatusta plasmidittomasta kannasta ja yhdelle viidestä *Neisseria gonorrhoeae* IA-5 -serovarista havaittiin arvoksi 50.000 pesäkeyksikköä/analyysi; yhtään muista 112 isolaatista ei havaittu yli 5000 pesäkeyksikköä/analyysi pitoisuuksilla. Keskimääräinen detekointiraja kaikille 114 isolaatille vaihteli välillä 974–2887 pesäkeyksikköä/analyysi, kun otetaan huomioon isolaattilaimennokset, jotka jäivät sekä analyysin epämääräisen alueen rajoihin ja yli 2,5 RLU/CO. Kaiken kaikkiaan keskimääräinen detekointiraja oli 1931 pesäkeyksikköä/analyysi ( $3,8 \times 10^4$  pesäkeyksikköä/ml). Kliiniset näytteet, joiden sisältämät organismit ovat detekointirajalla tai sen lähellä, voidaan joutua testaamaan uudelleen vaihtoehtoisella koemenetelmällä potilaan uudella näytteellä, kuten näiden käyttöohjeiden kohdassa *Näytetulosten tulkinta* on esitetty.

**Taulukko 18.** Yhteenveto GC-auksotyypin, serovarien, plasmidittomien ja antibiooteille resistenttien kantojen herkkyden detekointirajoista.

Auksotyyppi	Havaittava pitoisuus	
	pesäkeyks./ml	pesäkeyks./analyysi
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 12	500–5000	25–250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 16	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	50–500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 22	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 5	500–5000	25–250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 9	5 x 10 <sup>4</sup>	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Arg (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AU (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	50–500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype PAU (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Pro (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Proto (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	50–500
<i>N. gonorrhoeae</i> Siprofloxasiinille intermediaatti (Cipl) (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Siprofloxasiinille resistentti (Cip R) (neljä isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	50–500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Muu-5423	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Muu-5658	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	50–500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>6</sup>	50–50,000
<i>N. gonorrhoeae</i> Plasmidittomat kannat (kuusi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (neljä isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-1 tai IA-2 (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>6</sup>	500–50000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-5 (neljä isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup>	50–500
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-1 (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-4 tai IB-15 (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Spektinomysiinille resistentti (SpecR)	10 <sup>5</sup>	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (viisi isolaattia)	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup>	50–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG amerikkal. (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Holl. (viisi isolaattia)	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	500–5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Tyyppi Kanta	500–5000	25–250

#### PRESERVICYT-NÄYTTEIDEN MUITA TIETOJA

Edellisessä luvussa esitettyjä STM:n detekointirajatutkimuksia ei toistettu PreservCyt-liuosnäytteillä, koska kokeen analyttisen herkkyden odotetaan olevan riippumaton joko STM- tai PreservCyt-liuosnäytteen tyypistä, etenkin koska PreservCyt-liuosnäytteet käyvät läpi konversiomenetelmän (ks. lisätietoja *digene* HC2 näytteensekoitusarjan käyttöohjeista), joka tekee PreservCyt-liuosnäytteistä STM-näytteiden koostumusta vastaavan ennen niiden käyttöä *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa.

Koska PreservCyt-liuosnäytteet kuitenkin sentrifugoidaan konversiovaiheessa, oli välttämätöntä arvioida sentrifugoinnin mahdollinen vaikutus *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen analyttiseen herkkyteen. Sentrifugoinnin mahdollista vaikutusta analyttiseen herkkyteen arvioitiin preparoimalla kahdeksankymmentä kahdeksan (88) paria *Neisseria gonorrhoeae* DNA -negatiivisia STM- ja PreservCyt-liuosnäytteitä vastaavilla *Neisseria gonorrhoeae* (plasmiditon kanta NRL 33151) -organismimäärillä. Näyteparit testattiin ja analyttinen herkkyys arvioitiin vertaamalla saatuja keskimääräisiä RLU/CO-arvoja [(PreservCyt:STM) x 100].

**Taulukko 19.** Analyyttisen herkkyuden vertailu – *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe – PreservCyt-liuos- (PC) ja STM-näyteparit.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test -koe		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
<b>Näytteiden lkm.</b>	88	88	-
<b>Kesk. RLU/CO</b>	3,97	4,91	1,24
<b>Mediaani RLU/CO</b>	4,01	4,93	1,23
<b>Keskihajonta</b>	0,34	1,00	-
<b>Min. RLU/CO</b>	3,06	2,30	-
<b>Maks. RLU/CO</b>	4,77	7,10	-

Lisätutkimus antoi samanlaisen vertailun simuloituista potilasnäytepareista. PreservCyt-liuokseen kerätyt potilasnäytteet saatiin QIAGEN ulkopuolisesta kohteesta ja seulottiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa positiivisten näytteiden identifioimiseksi. Nämä positiiviset potilasnäytteet yhdistettiin sitten tuottamaan yhteensä kymmenen konsentroitua PreservCyt-näytekokoelmaa. Näistä kokoelmista preparoitiin ja prosessoitiin kaksi alikvoottia muodostamaan solupellettejä. Solupelletit resuspendoitiin fosfaattipuskurisuolaliuoksessa (PBS). Alikvootti A preparoitiin lisäämällä resuspendoitu pelletti STM-näytteenkuljetusaineeseen ja alikvootti B preparoitiin lisäämällä resuspendoitu pelletti PreservCyt:iin. Molemmat alikvoottit testattiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella. Tulokset olivat seuraavat:

**Taulukko 20.** Analyyttisen herkkyuden vertailu – *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe – Potilaiden simuloitunut (kootut) PreservCyt-liuos- (PC) ja STM-näyteparit.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test -koe		PC: STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
<b>Näytteiden lkm</b>	10	10	-
<b>Kesk. RLU/CO</b>	4,80	4,32	0,90
<b>Mediaani RLU/CO</b>	2,66	2,47	0,93
<b>Keskihajonta</b>	5,44	5,08	-
<b>Min. RLU/CO</b>	1,16	1,02	-
<b>Maks. RLU/CO</b>	18,97	17,26	-

## ANALYYTTINEN SPESIFISYYS

Joukko bakteereita, viruksia, plasmideja ja ihmisen soluainesta ja verituotteita, joita on mahdollista tavata naisen anogenitaaliossa kanavassa, testattiin tavoitteena selvittää tapahtuuko ristiinreaktiivisuutta *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kanssa. Kaikki mikro-organismit testattiin  $10^5$  ja  $10^7$  konsentraatioissa tai pesäkeyksikköinä/ml sekä mahdollisuuksien mukaan myös konsentraatioissa  $10^9$  organismia tai pesäkeyksikköinä/ml, ellei oheisessa asetelmassa toisin mainita. Virusten ja plasmidien puhdistettua DNA:ta testattiin eri konsentraatioissa oheisen asetelman mukaisesti.

Seuraavassa on luettelo testatuista bakteereista.

---

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (kaksi isolaattia) <sup>e</sup>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (kolme isolaattia) <sup>f</sup>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (kuusi isolaattia)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (neljä isolaattia)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria</i> -laji <sup>g</sup> *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (kuusi isolaattia) <sup>d</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (Group A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (kuusi isolaattia) <sup>d</sup>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (kuusi isolaattia)	<i>Neisseria sicca</i> (kuusi isolaattia)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>flava</i> (viisi isolaattia)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> <sup>b</sup>	<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>perflava</i> (neljä isolaattia) <sup>h</sup>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>a</sup> (2 kantaa)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> <sup>b</sup> (serovarit B, Ba, E, J, L3) <sup>c</sup>	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (kliininen isolaatti) <sup>†</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> (HB101) <sup>†</sup>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Gemella heamolysans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (ryhmä B)
<i>Kingella denitrificans</i> <sup>d</sup>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ryhmä 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> <sup>i</sup>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	

---

### Testatut konsentraatiot (organismeja/ml tai pesäkeyksikköjä/ml *Neisseria*-lajeille):

<sup>a</sup>  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^8$

<sup>b</sup>  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  ja  $2 \times 10^8$

<sup>c</sup>  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  ja  $1 \times 10^8$

<sup>d</sup>  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$

<sup>e</sup>  $1,1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^7$ ,  $1,1 \times 10^8$

<sup>f</sup>  $9,7 \times 10^6$ ,  $9,7 \times 10^8$ ,  $9,7 \times 10^8$

<sup>g</sup>  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  ja  $2 \times 10^9$

<sup>h</sup>  $4,8 \times 10^4$ ,  $4,8 \times 10^6$ ,  $4,8 \times 10^8$

<sup>i</sup>  $1 \times 10^5$  ja  $1 \times 10^6$

<sup>†</sup> Sekä *E. coli* -kanta, jota käytettiin plasmidien kasvattamiseen (HB101) ja *E. coli* klininen isolaatti testattiin.

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

Kaikki muut urogenitaalisen kanavan bakteerit kuin *Neisseria gonorrhoeae* ja kolme kommensaalista *Neisseria*-kanta ja *Chlamydia psittaci*, olivat negatiivisia *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa. *Chlamydia psittaci*- ja *Neisseria lactamica* -bakteereilla havaittiin vain kohtalaista ristiinreaktiivisuutta, joka voitaisiin tulkita presumptiivisesti positiiviseksi. Tällaisen ristiinreaktiivisuuden ei tulisi vaikuttaa urogenitaalisilla näytteillä tehtävän *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tuloksiin. Jonkin verran ristiinreaktiivisuutta osoittaneet organismit:

	Tulkinta	Konsentraatiot, joilla ristiinreaktiivisuutta havaittiin
<i>Chlamydia psittaci</i> (yksi isolaatti kahdesta)	Presumptiivisesti positiivinen*	$1 \times 10^7$ organismia/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (yksi isolaatti kuudesta)	Presumptiivisesti positiivinen*	$1 \times 10^9$ pesäkeyksikköä/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (ryhmä Y, yksi isolaatti kahdesta)	Positiivinen	$1 \times 10^7$ pesäkeyksikköä/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (yksi isolaatti kuudesta)	Positiivinen	$5 \times 10^5$ pesäkeyksikköä/ml

\* RLU/CO jäi analyysin epämääräisen alueen rajoihin 1,00–2,50.

*Neisserian* kolme kommensaalista kantaa, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis* ja *Neisseria mucosa*, ovat pääasiallisesti löydettävissä nenänielusta ja ylähengitysteistä. Ne ovat vain harvoin isoitavissa urogenitaali järjestelmästä.<sup>13,14</sup> Ristiin reagoivan ryhmän Y *Neisseria meningitidis* -isolaatin todettiin olevan lipopolysakkaridisesti ei-tyypiteltävissä, ja sitä tavataan vain harvoin yleispopulaatioissa. *Chlamydia psittaci* on todettavissa joidenkin henkilöiden iholta, jotka työssään käsittelevät siipikarjaa, mutta tätä organismia ei ole detekoitu anogenitaalisessa kanavassa.<sup>15</sup>

Lisäksi tietyn kannan kaikki isolaatit eivät olleet ristiinreaktiivisia *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa, mikä vähentää todennäköisyyttä, että kliinisellä näytteellä saadaan väärä positiivinen tulos, jos ko. kantaa on näytteessä. Esim. viisi testatuista kuudesta *Neisseria lactamica* tai *Neisseria mucosa* -isolaatista osoittautui *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa negatiiviseksi, ja samoin kävi yhdelle kahdesta *Chlamydia psittaci* -kannasta. Siten ei ole odotettua, että *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa kolmella kommensaalilla *Neisseria*-kannalla ja *Chlamydia psittaci* -kannalla havaittu ristiinreaktiivisuus aiheuttaisi väärän kliinisen tulkinnan positiivisesta tuloksesta testattaessa anogenitaalisia näytteitä.

Testatut virusperäiset DNA:t, plasmidiperäiset DNA:t ja ihmisen soluaines tai verituotteet sekä testatut konsentraatiot:

Sytomegalovirus <sup>a</sup>	Ihmisen papilloomavirus, tyyppi 6 <sup>f</sup>
Epstein Barr -virus <sup>b</sup>	Ihmisen papilloomavirus, tyyppi 11 <sup>f</sup>
HBs-hepatiittiantigeeni, positiivinen seerumi <sup>c</sup>	Ihmisen papilloomavirus, tyyppi 16 <sup>f</sup>
Herpes Simplex I <sup>d</sup>	Ihmisen papilloomavirus, tyyppi 18 <sup>f</sup>
Herpes Simplex II <sup>d</sup>	pBR322 <sup>i</sup>
Immuunikatovirus (HIV) <sup>b,g</sup>	SV40 <sup>j</sup>
Ihmisen genomisen DNA <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Z <sup>i</sup>
Ihmisen istukan DNA <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Zf(-) <sup>j</sup>
Ihmisen kokoveri <sup>h</sup>	Ihmisen epiteelisolut <sup>k</sup>

Testatut konsentraatiot:

<sup>a</sup>  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^9$  virusperäisiä kappaleita/ml

<sup>b</sup>  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  virusperäisiä kappaleita/ml

<sup>c</sup>  $2,9 \times 10^8$ ,  $1,1 \times 10^9$  virusperäisiä kappaleita/ml

<sup>d</sup>  $6,1 \times 10^6$ ,  $2,4 \times 10^7$  virusperäisiä kappaleita/ml

<sup>e</sup>  $2,7 \times 10^2$ ,  $1,1 \times 10^3$  kopioita/ml

<sup>f</sup>  $1,1 \times 10^8$ ,  $4,6 \times 10^8$  virusperäisiä kappaleita/ml

<sup>g</sup>  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  virusperäisiä kappaleita/ml

<sup>h</sup> 5 %, 10 %, 50 %

<sup>i</sup>  $2,1 \times 10^8$ ,  $8,3 \times 10^8$  kopioita/ml

<sup>j</sup> 1 ng/ml, 4 ng/ml

<sup>k</sup>  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  soluja/ml

Tutkituista viruksista mikään ei demonstroinut ristiinreaktiivisuutta *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa. Ristiinreaktiivisuutta havaittiin kuitenkin plasmideilla pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Z ja pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). Kaikki muut testatut DNA-preparoinnit, myös ihmisen DNA, osoittautuivat negatiivisiksi. Ihmisen verestä ja epiteelisolusta koostuvat näytteet eivät osoittautuneet ristiinreaktiivisiksi *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa. Ristiinreaktiivisuus pBR322:n ja *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen välillä ei ole odottamatonta GC-koettimen kehittämistavasta johtuen. Homologisten pBR322-sekvenssien olemassaolo on todettu ihmisen sukupuolielimistä otetuissa näytteissä ja väärä positiivisia tuloksia voi ilmetä tilanteissa, joissa mukana on suuria määriä bakteeriperäistä plasmidiainesta. Yhdysvalloissa suoritettussa monikeskustutkimuksessa 103 testatusta näytteestä, jotka havaittiin *Neisseria gonorrhoeae* -positiivisiksi *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa, ei kuitenkaan identifioitu yhtään väärää positiivista näytettä ristiinreaktiivisten pBR322-sekvenssien tähden. Siten ristiinreaktiivisuuden aiheuttamien väärin positiivisten tulosten todennäköisyys *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen kliinisissä näytteissä homologisten pBR322-sekvenssien tähden näyttäisi alhaiselta. Vaikka *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella on kyky reagoida ristiin *Chlamydia psittaci*-, pBR322-, pGEM ja useiden kommensaalisten *Neisseria*-lajien kanssa, todennäköisyys sille, että nämä organismit vaikuttaisivat kokeen tulkintaan, on vähäinen, kuten monikeskustutkimuksen tulokset osoittavat.

## KOETTIMIEN VASTAAVUUS KOKONAIPLASMIDI- JA GENOMIPERÄISEN DNA:N KANSSA

Genomiset koettimet ovat homologisia noin 0,5 %:n kanssa *Neisseria gonorrhoeae* -genomista. Seuraavassa on kunkin koettimen *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen erittely:

Koetin	Tyyppi	Sisäkapp. koko suunnilleen (bp)	% genomista
pGC1	Genominen	6400	0,34 %
pGC2		3300	0,17 %
		9700 (yhteensä)	0,51%
pGC3	Kryptinen plasmidi	4200	Ei koske*

\*Tämä edustaa koettimen koko sekvenssiä.

## VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS STM-NÄYTTEISIIN

Veren ja muiden potentiaalisesti häiriötä aiheuttaviksi määritettyjen aineiden vaikutukset evaluoitiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella. Kokoverta ja erästä kaupallista merkkiä edustavaa alapesuainetta, siententorjuntavoidetta ja ehkäisyhyttelöä (joita kaikkia tyypillisesti tavataan kohdunkaulanäytteistä) lisättiin positiivisiin näytteisiin (kliinisiin näytekokoelmiin) konsentraatioina, joita voidaan tavata kohdunkaulanäytteistä (ks. taulukko 21). Vääriä positiivisia tuloksia ei havaittu yhdenkään em. aineen yhteydessä missään konsentraatiossa. Tutkimus, joka kohdistettiin määrittelemättömiin aineisiin, joita tavattiin 100 negatiivisen kliinisen näytteen populaatiossa, osoitti, että määrittelemättömät aineet eivät estäneet positiivista signaalia kehittymästä *digene* HC2 CT/GC DNA Test -kokeessa verrattuna signaaliin, joka kehittyi testattaessa GC-organismeja STM-näytteenkuljetusaineessa.

### Taulukko 21. Häiritsevien aineiden vaikutus koetuloksiin.

#### *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tulos

Häiritsevä aine	Kons.	Kootut kliiniset näytteet				Näytteenkuljetusaine	
		Negatiivinen		Positiivinen*		Positiivinen*	
		RLU/CO	Havaittu	RLU/CO	Havaittu	RLU/CO	Havaittu
Ei ole (kontrolli)		0,15	Ei koske	3,41	Ei koske	2,70	Ei koske
Veri	1 %	0,21	+37 %	3,17	-7 %	3,21	+19 %
	5 %	0,19	+22 %	3,11	-9 %	3,05	+13 %
Alapesuaine	1 %	0,21	+37 %	3,48	+2 %	2,80	+4 %
	5 %	0,18	+20 %	3,47	+2 %	3,20	+18 %
Siententorjuntavoide	1 %	0,19	+20 %	3,60	+5 %	2,95	+9 %
	5 %	0,20	+30 %	3,52	+3 %	3,09	+14 %
Ehkäisyhyttelö	1 %	0,08	-54 %	3,18	-7 %	2,98	+10 %
	5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15 %

\*Terästetty auksotyypin 1 *Neisseria gonorrhoeae* -organismeilla (10<sup>3</sup> pesäyksikköä/ml).



## VEREN JA MUIDEN AINEIDEN VAIKUTUS PRESERVICYT-NÄYTTEISIIN

Edellisessä luvussa STM-näytteille esitettyjä, tiettyjen häiritsevien aineiden arvioita ei tehty PreservCyt-liuosnäytteillä. PreservCyt-liuosnäytteiden häiriintymisprofiilien ei kuitenkaan odoteta eroavan STM-näytteiden profiileista, koska endoservikaalinen näytteenotto on anatomisesti täsmälleen sama sekä PreservCyt-liuosnäytteille että STM-näytteille ja koska PreservCyt-liuosnäyte käy läpi konversiovaiheen (kuten *digene* HC2 -näytteenottosarjan käyttöohjeissa on esitetty), mikä tekee sen koostumuksesta verrannollisen STM-näytteen kanssa.

PreservCyt-liuosnäytteisiin on voinut jäädä erittäin pieniä määriä näytteen konversiopuskuria (SCB)<sup>1</sup>. Siksi *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen analyttisen suorituskyvyn verifiomisiksi tehtiin analyttinen tutkimus eri SCB-määrillä. Eri konsentraatioita plasmidiperäistä GC DNA:ta preparoitiin näytteenkuljetusaineeseen. Näytteisiin lisättiin sitten ylimääräisiä tilavuuksia SCB:tä, ja kustakin näytteestä testattiin kolme alikvoottia keskimääräisen RLU/CO-arvon määrittämiseksi kullekin näytteelle käytettäessä joko PreservCyt-liuosta tai SCB:tä. Vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia ei saatu vertailtaessa näitä kunkin näytteen keskimääräisiä RLU/CO-arvoja kunkin STM-kontrollinäytteen keskimääräisiin RLU/CO-arvoihin.

### ***digene* HC2 GC-ID DNA TEST -KOKEEN RAJA-ARVON TARKKUUS STM-NÄYTTEENKULJETUSAINEESEEN KERÄTYILLÄ KLIINISILLÄ NÄYTTEILLÄ**

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen toistettavuus STM-näytteenkuljetusaineeseen kerätyillä näytteillä määritettiin tutkimuksessa, joka käsitti 30 kliinistä kokoelmaa (15 positiivista ja 15 negatiivista näytettä). Kokoelmat preparoitiin yhdistämällä aiemmin denaturoituja ja testattuja, kohdunkaulaharjalla otettuja ja STM-näytteenkuljetusaineeseen kerättyjä näytteitä. Näytteet testattiin neljän replikaattina kunakin viitenä päivänä, jolloin saatiin 20 replikaattia näytettä kohti. Näytteet testattiin *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella. Keskim. RLU/CO-arvo, 95 %:n luotettavuusväli (95% CI) sekä positiivisten tulosten prosentuaalinen osuus laskettiin kullekin näytteelle viiden päivän ajalta. Tulokset on esitetty taulukossa 23.

**Taulukko 22.** Keskim. RLU/CO, luotettavuusvälit sekä *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen positiivisten tulosten prosentuaalinen osuus (laskeva järjestys keskim. RLU/CO-tulosten mukaan).

Nro	RLU/CO	95 %:n luotett.v.	% Positiivinen
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)

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

Näytteet, joiden keskimääräinen RLU/CO oli vähintään 20 % raja-arvon yläpuolella, olivat positiivisia tai presumptiivisesti positiivisia 97 % ajasta ja näytteet, joiden keskimääräinen RLU/CO oli vähintään 20 % raja-arvon alapuolella, olivat negatiivisia 100 % ajasta. Nämä tulokset osoittavat, että näytteiden, joiden suhdeluku oli vähintään 20 % raja-arvon ulkopuolella, voidaan odottaa antavat yhtenäisiä tuloksia *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeessa.

Näytteet, joiden arvot olivat lähellä analyysin raja-arvoa, olivat enimmäkseen positiivisia tai negatiivisia. Näytteet, joiden arvot olivat enintään 20 % raja-arvon yläpuolella, olivat positiivisia tai presumptiivisesti positiivisia 69,4 % ajasta. Näytteet, joiden arvo oli enintään 20 % raja-arvon alapuolella, olivat negatiivisia 91,4 % ajasta.

Nämä tulokset osoittavat, että *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koe tuottaa toistettavia tuloksia STM-näytteenkuljetusaineeseen kerätyillä kliinisillä näytteillä, joiden RLU/CO-arvot ovat enintään 20 % analyysin raja-arvojen ulkopuolella.

## HISTORIATIETOA

Historiassa Dynex Model MLX -luminometriä käytettiin DML 2000 -laitteen rinnalla tuottamaan dataa ja määrittämään *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen suoritusarvot. MLX-luminometri ei enää ole markkinoilla ja vain DML 2000:aa käytetään edelleen tulosten tuottamisessa. Seuraavassa esitettävät tiedot kerättiin kliinisestä monikeskustutkimuksesta, jossa haluttiin määrittää positiivisen kalibraattorin ja negatiivisen kalibraattorin toistettavuus. Mainitut tiedot esitetään ohessa historiatietoina.

Positiivisen kalibraattorin ja negatiivisen kalibraattorin toistettavuuden määrittämiseksi ja sen taajuuden arvioimiseksi, jolla manuaalisia uudelleenlaskentoja voidaan tarvita, 79 analyysiä käsittävien kliinisten arviointien tulokset käytettäessä *digene* HC2 GC-ID DNA Test -koetta koottiin yhteen (ks. taulukko 23). Saadut tulokset osoittivat, että näiden 79 analyysin keskimääräinen %CV oli 5,79%, ja mihinkään analyysiin ei liittynyt yli 150 RLU-yksikön menevää keskimääräistä negatiivista kalibraattoriarvoa. Kun otetaan huomioon positiivisen kalibraattorin kaikki 3 replikaattia analyysiä kohti, Yli 20 % CV menevää positiivisen kalibraattorin toistettavuutta todettiin vain yhdessä analyysissä kaikkiaan suoritetuista 79 analyysistä

(1,3 %) ja lasketusta %CV:stä. Uudelleenlaskennan jälkeen analyysin % CV oli edelleen alle 15 % osoittaen, että kaikki analyysit olivat valideja.

**Taulukko 23.** Positiivisen kalibraattorin ja negatiivisen kalibraattorin suorituskyky. Yhdistetyt tiedot monikeskustutkimuksesta ja tarkkuustutkimuksesta. (n = 79 analyysiä)

Laitte	Anal. lkm	S/N-suhdeluk. keskiarvo	Kalibraattorin tyyppi	Laskennall. k.arvon k.arvo (RLU)		Keskim. Laskennalliset %CV:t	
				Kolme replikaattia	Korjattu poikkeavat huomioiden	Kolme replikaattia	Korjattu poikkeavat huomioiden
DML2000	9	7,71	Negatiivinen	40,300	34,470	18,960	12,240
			Positiivinen	292,370	292,370	6,670	6,670
MLX*	70	4,52	Negatiivinen	0,076	0,070	13,830	12,360
			Positiivinen	0,292	0,292	5,674	5,674

\*Laitte ei ole enää markkinoilla.

## STM- JA PRESERVCYT-LIUOSNÄYTTEIDEN VASTAAVUUSTIEDOT

STM- ja PreservCyt-liuosnäytteiden vastaavuutta tutkittiin 1252:n kohdunkaulanäyteparin kliinisessä evaluoinnissa. Preservcyt-liuosnäyte prosessoitiin *digene* HC2-näytteenkonversiosarjan käyttöohjeiden mukaisesti ja testattiin STM-näyteparin kanssa *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeella. Tämän evaluoinnin tulokset on esitetty taulukossa 24. Kliininen suorituskyky testattiin käyttämällä jäännöstilavuudeltaan yli 6,5 ml PreservCyt-liuosnäytteitä. Jäännöstilavuudeltaan 4,0–6,5 ml näytteiden testaus on validoitava laboratoriossa.

**Taulukko 24.** Yhteenveto *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen yhtäpitävyyden tilastotiedoista kohdunkaulanäytepareille, jotka on kerätty STM- ja PreservCyt-liuokseen.

Kohortti	Kappa 95 %:n luotett.v.	Positiivinen yhtäpitävyys (n/N) 95 %:n luotett.v.	Negatiivinen yhtäpitävyys (n/N) 95 %:n luotett.v.	Kokonais- yhtäpitävyys (n/N) 95 %:n luotett.v.
Epämäär. al. tiedot poissuljettu	0,96 0,92; 0,99	98,00 (49/50) 89,35; 99,95	99,75 (1181/1184) 99,26; 99,95	99,68 (1230/1234) 99,17; 99,91
Epämäär. alueen uusintatest. algoritmi*	0,93 0,88; 0,98	91,80 (56/61) 81,90; 97,28	99,75 (1188/1191) 99,27; 99,95	99,36 (1244/1252) 98,74; 99,72

\*Näytteet, joiden RLU/CO-arvo oli 1,0–2,5, testattiin uudelleen duplikaatteina. Näytteiden luokittelu määritettiin sitten käyttäen kahden tai kolmen sääntöä.

*digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen toistettavuutta arvioitiin osana kliinistä arviointia tarkoituksena esittää, että saatiin vastaavat *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen tulokset, kun testattiin 20 PreservCyt-liuosnäytteen paneelia kolmen päivän ajan kolmessa laboratoriossa. Tämän toistettavuustutkimuksen tulokset on esitetty taulukossa 25.

**Taulukko 25.** *digene* HC2 GC-ID DNA Test -kokeen prosentuaalinen yhtäpitävyys kohteittain.

Tutkimuspaikka	Havaitut vs. Odotetut*	% yhtäpitävyys (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)
<b>Kaikki kohteet yhdistettyinä</b>	179/180	99,44 (96,94; 99,99)

\*20 jäsentä x 3 päivää x 3 kohdetta.

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

# VIANETSINTÄOPAS

## digene HC2 GC-ID DNA TEST -KOE

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
<b>Väärä väri tai ei värinmuutosta denaturoinnin aikana.</b>	Denaturointireagenssia ei lisätty tai denaturointireagenssi valmistettu virheellisesti.	1. Verifioi, että denaturointireagenssi sisältää osoitinväriä ja että se on väriltään tummanvioleetti. 2. Verifioi, että denaturointireagenssia on lisätty näytteeseen mittaamalla näytteen tilavuus (1,5 ml on oletustilavuus). Jos tilavuusmittaus osoittaa, että denaturointireagenssia ei ole lisätty, lisää tarvittava määrä, sekoita ja jatka analyysiä, jos toteat asianmukaisen värinmuutoksen.
	Verinen näyte saattaa peittää värinmuutoksen.	Kuvattua tarkkaa värinmuutosta ei ole odotettavissa näillä näytteillä, mutta sen ei välttämättä pitäisi vaikuttaa analyysin tuloksiin.
	Näytteen pH saattaa olla epätavallisen hapan.	Näyte saattaa olla epätavallisen hapan, ja siksi odotettua värinmuutosta ei tapahdu. Kerää uusi näyte <u>ennen</u> etikkahapon lisäämistä kohdunkaulaan, koska näytteen virheellisellä pH-arvolla on haitallinen vaikutus testituloksiin.
<b>Laaduntarkkailukontrollit antavat väärä tuloksia</b>	Testiä varten on valittu väärä ohjelmistoprotokolla	Jos testiä varten käytetty ohjelmistoprotokolla on väärä, kuoppalevy on luettava uudelleen oikealla protokollalla 30 minuutin kuluttua detekointireagenssi 2:n lisäämisen jälkeen.
	QC CT:n ja QC GC:n käänteinen sijainti	Testaa näytteet uudestaan.
<b>Väärä värinmuutos havaittu hybridisaation aikana.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Riittämätön koetinseoksen sekoittaminen denaturoituihin kalibraattoreihin, laatukontroleihin ja/tai näytteisiin.</li> <li>Koetinseosta ei lisätty.</li> <li>Virheellinen määrä reagenssia lisätty.</li> </ul>	Ravista hybridisaatiokuoppalevyä vielä 2 minuuttia. Jos violetteja tai harmaita kaivoja esiintyy edelleen, lisää vielä 25 µl koetinseosta ja sekoita hyvin. Jos asianmukaista värinmuutosta ei tapahdu koettimen lisäämisen ja uudelleen sekoittamisen jälkeen eikä näytteessä ollut verta tai muita materiaaleja, testaa näyte uudelleen.
	Verinen näyte saattaa peittää värinmuutoksen.	Kuvattua tarkkaa värinmuutosta ei ole odotettavissa näillä näytteillä, mutta siitä ei välttämättä ole haittaa analyysin tuloksille.
	Näytteessä oli < 1000 µl <i>digene</i> STM-näytteenkuljetusainetta.	Tarkista alkuperäisen näytteen tilavuus. Sen tulee olla 1425 µl±20 µl (kun on poistettu 75 µl). Jos tilavuus < 1405 µl, alkuperäinen näyte sisälsi < 1000 µl STM-näytteenkuljetusainetta. Hanki uusi näyte.
<b>Analyysin kalibroinnin verifointikriteereitä ei täytetty. Signaalia ei havaittu positiiv. kalibraattorissa, laatukontroleissa eikä näytteissä.</b>	Koetinlaimentimeen ei lisätty koetinta.	Valmista GC-koetinseos noudattaen näiden käyttöohjeiden sisältämiä ohjeita kohdassa Reagenssin valmistus ja säilytys. Sekoita perusteellisesti. Varusta putki asianmukaisella tunnistimella. Toista analyysi käyttämällä tuotetta koetinseosta.
	Koetin kontaminoitunut RNase:lla valmistuksen yhteydessä.	Käytä aerosolin estäviä pipetinkärkiä koettimen pipetointiin ja puuterittomia käsineitä. Laimenna koetin steriiliin astiaan. Käytä vain puhtaita uusia kertakäyttöisiä reagenssialtaita.
	Koetinseos ja koetinlaimennin riittämättömästi sekoittuneet.	Kun koetin on lisätty koetinlaimentimeen, sekoita perusteellisesti vorteksoimalla suurella nopeudella vähintään 5 sekuntia. Tuloksena täytyy olla näkyvä pyörre.
	Laimennettu koetin ja denaturoitu näyte riittämättömästi sekoittuneet.	Kun olet lisännyt koetinseoksen denaturoituun näytteeseen, peitä hybridisaatiokuoppalevy ja ravista tasoravistin I:llä nopeudella 1100±100 kierr./min 3±2 minuuttia, ks. kuvaus näiden käyttöohjeiden kohdasta Testimenetelmä, Hybridisaatio, vaihe 6. Seuraa värinmuutoksen tapahtumista jokaisessa kaivossa violetista keltaiseksi.
	Väärä aika tai lämpötila hybridisaatiovaiheessa.	Hybridisoi 60±5 minuuttia lämpötilassa 65±2 °C, kuten kuvattu näiden käyttöohjeiden kohdassa Testimenetelmä, Hybridisaatio, vaihe 7. Tarkista kuoppalevyn lämmitin I:n lämpötila. Varmista, että lämmitin on asetettu lämmittämään näytteet oikeaan lämpötilaan ja että se oli esikuumennettu 1 tunnin ajan ennen käyttöä.

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

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
	Riittämätön sekoittuminen sieppausvaiheessa.	Ravista 60±5 minuuttia tasoravistin 1:ssä nopeudella 1100±100 kierr./min lämpötilassa 20–25 °C, kuten kuvattu näiden käyttöohjeiden kohdassa Testimenetelmä, Hybridisieppaus, vaihe 7. Verifioi tasoravistin 1:n nopeus kalibroimalla se siten kuin toimenpide on kuvattu Tasoravistin 1:n käyttöoppaan kohdassa Tasoravistimen nopeuden kalibrointi.
	Ei ole lisätty oikeaa määrää detekointireagenssi 1:ta. • Ei ole inkuboitu määrättyä aikaa.	Pipetoi 75 µl detekointireagenssi 1:tä jokaiseen kaivoon käyttäen 8-kanavaista pipettiä. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 30–45 minuuttia.
	• Ei ole lisätty oikeaa määrää detekointireagenssi 2:ta. • Ei ole inkuboitu määrättyä aikaa.	Pipetoi 75 µl detekointireagenssi 2:tä jokaiseen kaivoon käyttäen 8-kanavaista pipettiä. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15–30 minuuttia.
	Luminometrin toimintavirhe tai virheellinen ohjelmointi.	Ks. lisätietoja käytetyn <i>digene</i> analyysimääritysohjelmiston käyttöohjeiden kunnostusta ja huoltoa sekä vianetsintää koskevista osista, tai ota yhteys QIAGENin paikalliseen edustajaan.
<b>Kohonneet RLU-arvot kalibraattoreissa, laatuvalvonnassa ja/tai näytteissä (≥150 RLU:ta monissa tai kaikissa kaivoissa). Analyysi saattaa olla täyttämättä validointikriteereitä.</b>	• Denaturointireagenssia ei lisätty; tai lisätty virheellinen tilavuus; tai riittämätön denaturointireagenssin sekoittuminen kalibraattoreihin, laatuvalvonnassa ja/tai näytteisiin.  • Riittämätön vesihauteen lämpötila ja vedenpinnan korkeus.	• Verifioi, että sarja-annostelija annostelee tarkasti ennen denaturointireagenssin lisäämistä. Kalibroidut pipetit ovat välttämättömiä. Lisää puoli tilavuutta denaturointireagenssia jokaiseen putkeen ja sekoitetaan hyvin. Vältä vääriä positiivisia tuloksia varmistamalla, että neste pesee putken koko sisäpinnan (käännetään putkea kerran ylösalaisin, jos teet sekoituksen manuaalisesti). Kalibraattorien, laatuvalvonnan ja näytteiden tulee muuttua violeeteiksi, kun denaturointireagenssi lisätään. Tarkista moninäyteputkivortexin 2:n nopeuden kalibrointi.  • Tarkista vesihauteen lämpötila ja vedenpinnan korkeus.
	• Valovuoto luminometrissä. • Tiiviste on rikkoutunut • Laitteen luukku ei ole tiivis.	Tarkista luminometrin taustalukema (raakatiemittaus) lukemalla tyhjä mikrokuoppalevy. Yli 50 RLU:n lukema on osoitus valvuodosta. Ks. lisätietoja käytetyn <i>digene</i> analyysimääritysohjelmiston käyttöohjeiden kunnostusta ja huoltoa sekä vianetsintää koskevista osista, tai ota yhteys QIAGENin paikalliseen edustajaan..
	Detekointireagenssi 2 tai sieppauskuoppalevykaivot ovat detekointireagenssi 1:n tai eksogeenisen alkalisin fosfaatin kontaminoimia.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
	Kontaminoitunut pesupuskuri.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
	Kontaminoitunut automaattinen kuoppalevyvesuri.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
	Riittämätön sieppauskuoppalevykaivojen pesu detekointireagenssi 1:n inkuboinnin jälkeen.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevyvesuria. Kaivoissa ei saa näkyä vaaleanpunaisen nesteen jäämiä pesun jälkeen. Ks. <i>Automaattisen kuoppalevyvesurin käyttöoppaassa</i> annettuja ohjeita kontaminaatio- ja virhetilanteisiin liittyvistä testeistä.
	Detekointireagenssi 1:n aiheuttama kuoppalevykaivojen kontaminoituminen.	Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaat ja kuivat. Noudata huolellisuutta detekointireagenssi 1:n käsittelyssä. Vältä aerosoleja.
	Hybridisaatioliuosta on kuivattu Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan vähänukkaisen paperipyyhkeen samaan kohtaan.  Vääriä kuivauspyyhkeitä on käytetty.	Älä kuivaa hybridisaatioliuosta Kimtowels-pyyhkeen tai vastaavan vähänukkaisen paperipyyhkeen samaan kohtaan.  Käytä kuivaamiseen Kimtowels-pyyhkeitä tai vastaavia vähänukkaisia paperipyyhkeitä.

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

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
	GC-laaduntarkkailukontrolliainetta on käytetty positiivisena kalibraattorina. Analyysi ei täytä validointikriteereitä.	Varmista positiivisten kalibraattorien ja laatuksentrollien oikea sijoitus.
<b>Alhainen PC/NC-suhdeluku tai suuri lukumäärä matala-positiivisia näytteitä (&gt;20 % näytteiden kokonaismäärästä) joiden RLU/CO-suhdeluku &lt;2,0. Analyysi saattaa olla täyttämättä validointikriteereitä.</b>	Riittämätön näytteen valmistus.	Lisää tarvittava tilavuus denaturointireagenssia ja sekoita hyvin vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on varmistettava, että neste huuhtelee putken sisäpinnan kauttaaltaan ja tämä tehdään käyttämällä moninäyteputkivortexi 2:n menetelmää vähintään 5 sekuntia (jos käytetään manuaalista vorteksointimenetelmää, vorteksoi vähintään 5 sekuntia ja käännä putki kerran ylösalaisin). Tällöin värin tulee selkeästi muuttua kirkkaasta tummanvioletiksi. Inkuboidaan 65±2 °C:n lämpötilassa 45±5 minuuttia. PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä näitä hybridejä on todennäköisesti näytteen konversioputken sisäseinämissä. Denaturoimattomien solujen siirtymisen estämiseksi pipetin kärki ei saa koskettaa näytteen konversioputken laitoja denaturoituja näytteitä siirrettäessä mikrokuoppalevyille, jota käytetään CT/GC-koettimen hybridisaatioon. Katso lisäohjeita <i>digene</i> HC2-näytteen konversiopakkauksen käyttöohjeista.
	Koetin riittämättömästi sekoittunut tai analyysieihin ei ole lisätty riittävästi koetinta	Valmista koetinseos kuvatulla tavalla. Sekoita perusteellisesti vorteksoimalla ja varmista, että näkyvä pyörre muodostuu. Koetinseos on lisättävä kaivoihin monikanavaisella tai sarja-annostelijalla täsmällisen annostelun varmistamiseksi.
	Lisätty riittämätön määrä koetinseosta kuhunkin hybridisaatiokuoppalevyn kaivoon.	Verifioi, että 8-kanavainen pipetti annostelee tarkasti ennen kuin lisää koetinseoksen hybridisaatiokuoppalevyille. Lisää 25 µl koetinseosta kunkin kuoppalevykaivon pohjalla olevaan denaturoituun näytteeseen. Verifioi, että 8-kanavainen pipetti annostelee tarkasti ennen kuin lisää koetinseoksen hybridisaatiokaivoihin. Värinmuutos violetista keltaiseen tulee tapahtua sen jälkeen, kun koetinseos on lisätty ja sekoitettu perusteellisesti.
	Detekointireagenssi 1:n toiminnon menetys.	Säilytä detekointireagenssi 1 lämpötilassa 2–8 °C:n. Käytä pakkausmerkinnöissä annettuun viimeiseen käyttöpäivään mennessä.
	Riittämätön RNA: DNA-hybridien sieppaus.	Sieppausvaihe tulee suorittaa siten, että tasoravistin I on asetettu nopeuteen 1100±100 kierrosta minuutissa. Verifioi tasoravistin 1:n nopeus kalibroimalla se siten kuin toimenpide on kuvattu Tasoravistin I:n käyttöoppaan kohdassa Tasoravistimen nopeuden kalibrointi.
	Riittämätön pesu.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunoja joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevyepesuria.
	Kontaminoitunut pesupuskuri.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.
<b>Sarja positiivisia näytteitä, joiden RLU-arvot ovat jokseenkin samat.</b>	Sieppauskuoppalevyn kaivojen kontaminoituminen analyysin yhteydessä.	Peitä sieppauskuoppalevyn kaivot aina inkuboinnin yhteydessä. Vältä altistamista sieppauskuoppalevyn kaivoja aerosoliperäiselle kontaminoitumiselle analyysin aikana. Käytä puuterittomia käsinettä käsittelyissä.
	Detekointireagenssi 2:n kontaminoituminen.	Reagenssin kontaminoitumista on varottava pipetoitaessa sitä kuoppalevyn kaivoihin. Vältä detekointireagenssi 2:n kontaminoitumista detekointireagenssi 1:stä peräisin olevien aerosolien kautta ja laboratoriopölyn, yms. johdosta.
	Automaattisen kuoppalevyepesurin virhetoiminto.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta tai katso <i>Automaattisen kuoppalevyepesurin käyttöoppaassa</i> annettuja ohjeita kontaminaatio- ja virhetoimintotilanteiden identifioimiseen liittyvistä testeistä.
<b>Laajaa vaihtelua replikaattien % CV-</b>	Epätarkkuutta pipetoinnissa (ts. ilmakuplia, pipetti kalibroimaton).	Tarkista, että pipetin annostelumäärät ovat toistettavia. Kalibroi pipetit säännöllisin välein.

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

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
arvoissa.	Riittämätön sekoittuminen.	Sekoita perusteellisesti joka vaiheessa. Vorteksoi ennen denaturointi-inkubointia ja sen jälkeen. Varmista, että muodostuu näkyvä pyörre.
	Epätäydellinen nesteen siirto hybridisaatiokuoppalevyltä sieppauskuoppalevyn kaivoihin.	Noudata huolellisuutta siirtovaiheessa hybridisaatiokuoppalevyltä sieppauskuoppalevylle varmistaaksesi, että siirretyt määrät ovat toistettavissa.
	Puutteelliset pesuolosuhteet.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria ja asianmukaisia automaattisen kuoppalevypesurin protokollia.
	Detekointireagenssi 1:n aiheuttama kuoppalevykaivojen kontaminoituminen.	Varmista, että kaikki työpinnat ovat puhtaat ja kuivat. Noudata huolellisuutta detekointireagenssi 1:n käsittelyssä. Vältä aerosoleja.
	Pipetinkärjen kontaminoituminen denaturoimattomasta aineesta siirrettäessä denaturoitu näyte kuoppalevykaivoon käyttäen GC-koettimen hybridisaatiota.	Näytteenkäsittelymenetelmän denaturointivaihe on suoritettava näiden ohjeiden mukaisesti. Näytteen väärä vorteksointi, putken kääntäminen ylösalaisin ja putken sekoittaminen voivat aiheuttaa kohdunkaulanäytteille endogeenisten ei-spesifisten RNA:DNA-hybridien epätäydellisen denaturoinnin. Erityisesti PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä näitä hybridejä esiintyy todennäköisesti näytteenkonversioputken sisäseinämällä. Jotta tämä denaturoimaton soluaines ei siirtyisi näytteeseen, pipetin kärki ei saa koskettaa näytteenkonversioputken seinämiä kun denaturoitu näyte siirretään mikroputkeen tai kuoppalevykaivoon GC-koettimen hybridisaatiota käyttäen.
	Useita rivejä on kuivattu Kimtowel-pyyhkeen samaan kohtaan.	Älä kuivaa kohteita Kimtowel-pyyhkeen samaan kohtaan.
Saatu väärä positiivisia tuloksia tunnetuista negatiivisista näytteistä.	Denaturointireagenssi 2 kontaminoitunut.	Varo näytteiden ristiinkontaminoitumista detekointireagenssi 2:n lisäyksen yhteydessä. Jos pakkauksesta käytetään vain osa, analyysiin tarvittava määrä on alikvoitava puhtaaseen reagenssialtaaseen ennen pipetin täyttöä.
	Detekointireagenssi 1:n aiheuttama kuoppalevykaivojen kontaminoituminen.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevypesuria. Kaivoissa ei saa näkyä vaaleanpunaisen nesteen jäämiä pesun jälkeen.
	Pipetinkärjen kontaminoituminen denaturoimattomasta aineesta siirrettäessä denaturoitu näyte kuoppalevykaivoon käyttäen GC-koettimen hybridisaatiota.	Näytteenkäsittelymenetelmän denaturointivaihe on suoritettava näiden ohjeiden mukaisesti. Näytteen väärä vorteksointi, putken kääntäminen ylösalaisin ja putken sekoittaminen voivat aiheuttaa kohdunkaulanäytteille endogeenisten ei-spesifisten RNA:DNA-hybridien epätäydellisen denaturoinnin. Erityisesti PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä näitä hybridejä esiintyy todennäköisesti näytteenkonversioputken sisäseinämällä. Jotta tämä denaturoimaton soluaines ei siirtyisi näytteeseen, pipetin kärki ei saa koskettaa näytteenkonversioputken seinämiä kun denaturoitu näyte siirretään mikroputkeen tai kuoppalevykaivoon GC-koettimen hybridisaatiota käyttäen.
	Riittämätön näytteen valmistus.	Lisää tarvittava tilavuus denaturointireagenssia ja sekoita hyvin vorteksoimalla. Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on varmistettava, että neste huuhtelee putken sisäpinnan kauttaaltaan, ja tämä tehdään käyttämällä moninäyteputkivortexi 2:n menetelmää vähintään 5 sekuntia (jos käytetään manuaalista vorteksointimenetelmää, käännetään putki kerran ylösalaisin). Tällöin värin tulee selkeästi muuttua kirkaasta tummanvioletiksi. Inkuboi 65±2 °C:n lämpötilassa 45±5 minuuttia. PreservCyt-liuosnäytteitä käytettäessä näitä hybridejä on todennäköisesti näytteen konversioputken sisäseinämässä. Denaturoimattomien solujen siirtymisen estämiseksi pipetin kärki ei saa koskettaa näytteen konversioputken laitoja denaturoituja näytteitä siirrettäessä mikrokuoppalevylle, jota käytetään CT/GC-koettimen hybridisaatioon. Katso lisäohjeita digene HC2-näytteen konversiopakauksen käyttöohjeista.



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

HAVAINTO	MAHDOLLISET SYYT	RATKAISUT
	Puutteelliset pesuolosuhteet.	Pese kuoppalevykaivot perusteellisesti pesupuskurilla 6 kertaa, täytä kaivot yli reunojensa joka kerta tai käytä automaattista kuoppalevyvesuria ja asianmukaisia automaattisen kuoppalevyvesurin protokollia.
<b>Kohonneet negatiivisen kalibraattorin RLU-arvot (&gt; 150 RLU-yksikköä). Muu osa analysistä toimi odotetulla tavalla.</b>	Detekointireagenssi 2:ta inkuboiitiin yli 20–25 °C:n lämpötilassa.	Koe on epäpätevä korkeiden negatiivisten kalibraattoriarvojen takia. Suorita koe uudelleen ja varmista, että sieppaus- ja detekointivaiheet inkuboidaan 20–25 °C:n lämpötilassa.
	Detekointireagenssi 2:n inkubointi kestänyt yli 30 minuuttia.	Lue levy 15 minuutin inkuboinnin jälkeen (enintään 30 minuutin kuluttua) lämpötilassa 20–25 °C.
	Detekointireagenssi 2 tai pesupuskuri on alkaisen fosfaatin tai detekointireagenssi 1:n kontaminoima.	Katso kontaminaatiotarkistuksia vianetsintäjaksosta.

**KONTAMINAATIOTARKISTUS**

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

## QIAGEN YHTEYSTIEDOT

Tuotteen mukana toimitetut yhteystiedot sisältävät QIAGEN paikallisen edustajan yhteystiedot.

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

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

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

Rekisteröityihin tavaramerkkeihin liittyvät maininnat:

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

## YHTEENVETO *digene* HC2 GC-ID DNA TEST -KOKEESTA

**Tärkeää:** On tärkeää, että tutustut menetelmään yksityiskohtaisesti ennen tämän yhteenvedon soveltamista.

	MENETELMÄ	
<b>Denaturointi</b> (PreservCyt-liuosnäytteet: ks. PreservCyt-liuosnäytteiden valmistusmenetelmä)	<p style="text-align: center;"><b>Manuaalinen vorteksimenetelmä:</b></p> <p style="text-align: center;">Luo kuoppalevyn layout Merkitse hybridisaatiokuoppalevy. Valmista denaturointireagenssi.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontroleihin ja näytteisiin. Vorteksoi kukin näyte, kalibraattori ja laatukontrolli erikseen 5 sekunnin ajan suurella nopeudella ja käännä ylösalaisin (ks. näissä käyttöohjeissa annetut yksityiskohtaiset ohjeet).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Varmista, että kaikki putket ovat violetinvärisiä.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Inkuboi 65±2 °C:n lämpötilassa 45±5 minuuttia.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Valmista GC-koetinseos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;"><b>Moninäyteputkivortexi 2-menetelmä</b></p> <p style="text-align: center;">Luo kuoppalevyn layout. Merkitse hybridisaatiokuoppalevy. Valmista denaturointireagenssi.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetoi denaturointireagenssia (tilavuus vastaa puolta näytteen tilavuudesta) kalibraattoreihin, laatukontroleihin ja näytteisiin.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Varmista, että kaikki putket ovat violetinvärisiä.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Peitä teline kalvolla ja kannella.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Vorteksoi 10 sekunnin ajan enimmäisnopeudella.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Inkuboi 65±2 °C:n lämpötilassa 45±5 minuuttia.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Valmista GC-koetinseos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<b>Hybridisaatio</b>	<p style="text-align: center;">Sekoita denaturoidut näytteet hyvin ja pipetoi 75 µl denaturoitua näytettä, kalibraattoria tai laatukontrollia mikrokuoppalevykaivoihin.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inkuboi 10 minuuttia 20–25 °C:n lämpötilassa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Pipetoi 25 µl GC-koetinseosta kuoppalevykaivoihin.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Peitä kuoppalevy kannella ja ravista tasoravistin I:ssä nopeudella 1100±100 kierrosta/min 3±2 minuutin ajan. Varmista, että kaikki kaivot ovat keltaisia. (PreservCyt-liuosnäytteet muuttuvat vaaleanpunaisiksi.)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inkuboi 65±2 °C:n lämpötilassa 60±5 minuuttia.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Valmista sieppauskuoppalevy.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
<b>Hybridinsieppaus</b>	<p style="text-align: center;">Siirrä kunkin hybridisaatiolevyn kaivon sisältö vastaavaan kaivoon sieppauskuoppalevyllä käyttäen 8-kanavaista pipettiä.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Peitä kuoppalevyn kannella tai tiivistekalvolla.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Ravista nopeudella 1100 ±100 kierrosta/min 20–25 °C:n lämpötilassa 60±5 minuuttia. Valmistele pesupuskuri.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Tyhjennä ja kuivaa sieppauskuoppalevy (lisätietoja näissä käyttöohjeissa).</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
<b>Hybridien detekointi</b>	<p style="text-align: center;">Pipetoi 75 µl detekointireagenssi 1:ta sieppauskuoppalevyn jokaiseen kaivoon. Peitä sieppauskuoppalevy kannella, Parafilm-kalvolla tai vastaavalla. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 30–45 minuuttia. Pese kuoppalevy haluttua menetelmää käyttäen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
<b>Peseminen</b>	<p style="text-align: center;"><b>Manuaalinen pesumenetelmä</b></p> <p style="text-align: center;">Tyhjennä ja kuivaa sieppauskuoppalevy (lisätietoja pakkauselosteessa).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Pese 6 kertaa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Kuivaa vähänukkaisia paperipyhkeillä.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;"><b>Automaattinen kuoppalevypesuri -menetelmä</b></p> <p style="text-align: center;">Pane kuoppalevy pesuriin ja paina "START/STOP".</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<b>Signaalin vahvistus</b>	<p style="text-align: center;">Pipetoi 75 µl detekointireagenssi 2:ta sieppauskuoppalevyn jokaiseen kaivoon. <b>Peitä kuoppalevyn kannella. Inkuboi 20–25 °C:n lämpötilassa 15–30 minuuttia.</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
<b>Lukeminen</b>	<p style="text-align: center;">Lue sieppauskuoppalevy QIAGENin hyväksymällä luminometrillä.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;"><b>Validoi analyysi ja tulkitse näytteen tulokset.</b></p>	