



Hybrid Capture<sup>®</sup> 2

CT-ID DNA Test

Návod k použití

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

Stanovení nukleové kyseliny *in vitro* hybridizačním testem s amplifikací signálu na mikrodestičce s použitím chemiluminiscence pro kvalitativní detekci DNA *Chlamydia trachomatis* (CT) v cervikálních vzorcích.

Pro použití se soupravami:

digene<sup>®</sup> HC2 DNA Collection Device

digene<sup>®</sup> Female Swab Specimen Collection Kit (souprava pro odběr vzorků výtěru u pacientek)

Hologic PreservCyt<sup>®</sup> Solution (PreservCyt<sup>®</sup> roztok pro daný test)

**Pouze vyškolený a kvalifikovaný laboratorní personál. Před použitím testu si pozorně přečtete tyto instrukce.**



QIAGEN  
19300 Germantown Road  
Germantown, MD 20874  
USA

IVD



EC REP

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
GERMANY

REF 5135-1330

©2015-2018 QIAGEN

L2171CS Rev. 5



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

# OBSAH

<b>NÁZEV A ÚČEL POUŽITÍ</b> .....	<b>1</b>
<b>SOUHRN A VYSVĚTLENÍ</b> .....	<b>1</b>
<b>PRINCIP POSTUPU</b> .....	<b>2</b>
<b>ČINIDLA A POSKYTNUTÉ MATERIÁLY</b> .....	<b>3</b>
<b>MATERIÁLY, KTERÉ JSOU VYŽADOVÁNY, ALE NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY</b> .....	<b>4</b>
<b>VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ</b> .....	<b>5</b>
BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ .....	5
INFORMACE O BEZPEČNOSTI A ZDRAVOTNÍM RIZIKU .....	6
OPATŘENÍ PRO ZACHÁZENÍ S TESTEM .....	7
<b>PŘÍPRAVA ČINIDEL A JEJICH USKLADNĚNÍ</b> .....	<b>8</b>
<b>ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY</b> .....	<b>10</b>
CERVIKÁLNÍ VZORKY V <i>digene</i> STM .....	10
CERVIKÁLNÍ VZORKY V ROZTOKU HOLOGIC PRESERVCYT .....	10
<b>POSTUP TESTU</b> .....	<b>11</b>
TESTOVÁNÍ VELKÉHO MNOŽSTVÍ VZORKŮ S POUŽITÍM PŘÍSTROJE RAPID CAPTURE SYSTEM .....	11
MANUÁLNÍ POSTUP .....	12
DENATURACE .....	12
Kontroly, kalibrátory a postup přípravy vzorků STM .....	13
Postup přípravy vzorků roztoku PreservCyt .....	14
Volitelné přerušení testu .....	17
HYBRIDIZACE .....	17
IMOBILIZACE HYBRIDU .....	18
DETEKCE HYBRIDU .....	19
PROMÝVÁNÍ .....	19
AMPLIFIKACE SIGNÁLU .....	21
<b>KRITÉRIA OVĚŘENÍ KALIBRACE SADY TESTŮ</b> .....	<b>21</b>
<b>VÝPOČET LIMITU POZITIVITY</b> .....	<b>23</b>
<b>KONTROLA KVALITY</b> .....	<b>23</b>
<b>INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ KLINICKÝCH VZORKŮ</b> .....	<b>24</b>
<b>OMEZENÍ POSTUPU</b> .....	<b>24</b>
<b>OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY</b> .....	<b>25</b>
ČETNOST VÝSKYTU .....	25
PREDIKTIVNÍ HODNOTA POZITIVNÍCH A NEGATIVNÍCH VÝSLEDKŮ .....	25
FREKVENČNÍ DISTRIBUCE: VÝSLEDKY RLU/CO PRO TEST DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID .....	26
<b>CHARAKTERISTIKA VÝKONU</b> .....	<b>27</b>
VÝSLEDKY KLINICKÝCH TESTŮ PODLE VZORKŮ .....	27
REPRODUKOVATELNOST .....	30
PŘESNOST .....	32
Přesnost u vzorků roztoku PreservCyt .....	33
ANALYTICKÁ CITLIVOST .....	35
Další okolnosti s ohledem na vzorky roztoku PreservCyt .....	35
ANALYTICKÁ SPECIFICITA .....	36
VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY STM .....	38
VLIV KRVE A DALŠÍCH LÁTEK NA VZORKY ROZTOKU PRESERVCYT .....	38
PŘESNOST LIMITU POZITIVITY TESTU DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID U KLINICKÝCH VZORKŮ ODEBRANÝCH V STM .....	38
HISTORICKÉ INFORMACE .....	39
EKVIVALENCE MEZI VZORKY STM A VZORKY ROZTOKU PRESERVCYT .....	40
<b>ODKAZY</b> .....	<b>41</b>
<b>ZÁVADY A JEJICH ODSTRAŇOVÁNÍ</b> .....	<b>43</b>
TESTOVÁNÍ NA KONTAMINACI .....	48
<b>QIAGEN KONTAKTNÍ INFORMACE</b> .....	<b>49</b>
<b>SOUHRN TESTU DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID</b> .....	<b>50</b>

## NÁZEV A ÚČEL POUŽITÍ

Testovací souprava *digene*<sup>®</sup> Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (HC2) CT-ID DNA je určena k analýze nukleové kyseliny *in vitro* pomocí hybridizačního testu se zesíleným signálem a s použitím chemiluminiscence pro kvalitativní detekci DNA *Chlamydia trachomatis* (CT) u cervikálních vzorků odebraných pomocí soupravy pro odběr cervikálních vzorků *digene* HC2 DNA Collection Device [sestavují z cervikálního kartáčku a média pro přenos vzorků *digene* Specimen Transport Medium (STM)] a rovněž u cervikálních vzorků odebraných pomocí soupravy pro odběr vzorků *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (tampón a médium STM) nebo u vzorků, kde je použito odběrové zařízení typu košťátka, a které jsou umístěny v roztoku Hologic PreservCyt<sup>®</sup>. Test DNA *digene* HC2 CT-ID je počáteční test k identifikaci žen s příznaky či bez nich jako důkaz infekce *Chlamydia trachomatis*.

Pro velké množství testů se pro test DNA *digene* HC2 CT-ID může použít systém Rapid Capture<sup>®</sup> System (RCS).

Pro použití v diagnostice *in vitro*. IVD

## SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Chlamydiae jsou gramnegativní organismy s dvoufázovým životním cyklem, které zahrnují dvě morfologicky odlišné infekční a reprodukční formy.<sup>1</sup> Genom *Chlamydia trachomatis* je relativně malý, s přibližně  $1 \times 10^6$  párů bází.<sup>2</sup> Infekční forma je elementární tělísko, které se nemůže dělit a slouží pouze k přenosu infekce z jedné buňky na druhou. Když se elementární tělíška dostanou do hostitelské buňky, spojí se do vakuol spojených membránou a produkuje metabolicky aktivní chlamydiální reprodukční formy nebo retikulovaná tělíška. Replikace je zcela závislá na hostiteli ATP<sup>3</sup> a probíhá pomocí binárního štěpení uvnitř refraktilních cytoplasmatických inkluzí. Vzniká tak nová generace elementárních tělíšek, které se poté uvolňují a infikují další buňky. Chlamydiae mají membránou spojený, genově specifický lipopolysacharid, který slouží jako zdroj antigenu při vzniku diagnostických protilátek.

Konvenční metody přímé detekce *Chlamydia trachomatis* v klinických vzorcích zahrnují barvení jodem nebo Giemsovo barvení organismu, poté následuje ohodnocení pod mikroskopem<sup>4</sup> nebo citlivější užití přímého fluorescentního obarvení protilátky (DFA)<sup>5</sup>. Tyto metody však dosahují pouze 70 - 85 % citlivosti ve srovnání s technikami optimálních tkáňových kultur.<sup>6</sup> Nejčastěji přijímaným postupem sloužícím k detekci Chlamydia je infekce McCoyových buněk v buněčné kultuře. Protilátky konjugované s fluoresceinem se poté používají k detekci intracytoplasmatických inkluzí tělíšek, která byla vytvořena chlamydiálními reprodukčními prvky v infikovaných buňkách.<sup>7</sup> Optimální buněčná kultura má výbornou citlivost a specifitu pro detekci Chlamydiae, ale je to komplexní, drahý a časově náročný postup. Obvykle výsledky nejsou dostupné během 48-72 hodin po inokulaci.<sup>8</sup> K detekci chlamydiálních antigenů se používají enzymatické imunologické metody<sup>9</sup> a zdá se, že jsou trochu citlivější a mírně méně specifické než přímé fluorescenční přístupy k protilátkám<sup>9</sup>. Existují testy nukleové kyseliny určené k detekci různých cílových typů Chlamydia, včetně chromozomální DNA, mRNA a skrytého plasmidu, běžného u velké většiny kmenů *Chlamydia trachomatis*. Tyto metody se různí v citlivosti a specifitě, ale všeobecně se přibližují nebo překračují účinnost kultivačních metod.<sup>10-12</sup>

## PRINCIP POSTUPU

Test DNA *digene* HC2 CT-ID používá techniku imobilizace hybridu [*digene* Hybrid Capture 2]. Jde o hybridizační test využívající nukleovou kyselinu, navázanou na mikrodestičce, s amplifikací signálu a chemiluminiscenční detekcí. Vzorky, obsahující cílovou DNA, hybridizují se specifickou sondou *Chlamydia* RNA. Výsledné hybridy RNA:DNA jsou zachyceny protilátkami, specifickými pro hybridy RNA:DNA, kterými je potažen povrch jamky mikrodestičky. Imobilizované hybridy potom reagují s protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou, specifickými pro hybridy RNA:DNA a jsou detekovány chemiluminiscenčním substrátem. Na každou protilátku je konjugováno několik molekul alkalické fosfatázy. Mnohonásobně konjugované protilátky se váží ke každému zachycenému hybridu, což má za následek podstatnou amplifikaci signálu. Substrát je štěpen konjugovanou alkalickou fosfatázou a dojde k vyzáření světla. Světelné kvantum je měřeno luminometrem a vyjádřeno v relativních světelných jednotkách (RLU). Intenzita vyzářeného světla indikuje přítomnost či nepřítomnost cílové DNA ve vzorku.

Výsledek měření RLU, shodný či větší než specifikovaný poměr ke kladné hodnotě limitu pozitivity (CO), znamená přítomnost DNA *Chlamydia* ve vzorku. Je-li hodnota RLU nižší než specifikovaný poměr ke kladné hodnotě limitu pozitivity znamená to, že DNA *Chlamydia* není přítomna, nebo že testované úrovně DNA *Chlamydia* jsou pod detekčním limitem stanovení.

CT směsná sonda obsahuje speciálně vybranou směs sondy, která eliminuje nebo minimalizuje zkříženou reaktivitu s DNA sekvencemi z lidských buněk, jinými bakteriálními druhy nebo jinými druhy *Chlamydia* než *Chlamydia trachomatis*. CT sonda je dodávána s testem DNA *digene* HC2 CT-ID a je doplňkem k přibližně 39 300 bp nebo 4 % *Chlamydia* genomické DNA ( $1 \times 10^6$  bp).<sup>3</sup> Jedna sonda je doplňkem k 100 % skrytého plasmidu 7 500 bp.

Pro velké množství testů se pro test DNA *digene* HC2 CT-ID může použít obecný automatický pipetovací a ředící systém, který se nazývá Rapid Capture System (RCS) [systém rychlé imobilizace]. Tento přístroj, při aplikaci specificky určené k testu DNA *digene* HC2 CT-ID, dokáže zpracovat až 352 vzorků za osm hodin. Aby bylo možné velké množství testů zvládnout, provádějí se všechny kroky zkoušky s použitím RCS, kromě denaturace vzorku, chemiluminiscenční detekce signálu a vyhodnocení výsledků.

## ČINIDLA A POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

V jedné testovací soupravě testu DNA *digene* HC2 CT-ID je 96 testů (REF 5135-1330). Počet výsledků, získaných od pacientek, se bude lišit v závislosti na tom, kolikrát se každá souprava použije:

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

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

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

## MATERIÁLY, KTERÉ JSOU VYŽADOVÁNY, ALE NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

### System pro imobilizaci hybridu *in vitro*, diagnostické zařízení a příslušenství<sup>A</sup>

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

rotační třepačka I (Hybrid Capture System)  
mikrodestičkový inkubátor I  
automatická promývačka destiček  
vortexovací zařízení MST Vortexer pro více vzorků [Multi-Specimen Tube (MST)] Vortexer 2 (volitelné)<sup>B</sup>  
konverzní stojan a víko na stojan (volitelné pro manuální použití; požadováno v případě použití systému Rapid Capture s testem DNA *digene* HC2 CT-ID a vzorky PreservCyt)  
*digene* stojan na vzorky a víko na stojan (volitelné pro manuální použití; požadováno v případě použití systému Rapid Capture s testem *digene* HC2 CT-ID a vzorků odebraných pomocí soupravy pro odběr vzorků *digene* HC2 DNA Collection Device)  
EXPAND-4 pipetovací zařízení a stojánek (volitelné)<sup>C</sup>  
*digene* HC2 DNA Collection Device (souprava pro odběr vzorků)  
*digene* Female Swab Specimen Collection Kit (souprava pro odběr vzorků, skládá se ze dvou tampónů a média pro přenos vzorků)<sup>D</sup>  
zásobník těsnící fólie pro zkumavky a řezačka (používáno u MST Vortexer 2)

Rapid Capture System (volitelná položka pro velké množství testů)<sup>E</sup>  
promývací aparát  
hybridizační mikrodestičky  
víčka na mikrodestičky  
prázdné stripy mikrodestiček (dodává Costar, Model #2581);  
volitelné pro použití s automatickou promývačkou destiček  
speciální dlouhé pipetové špičky pro pipetování vzorků  
zkumavky pro odběr vzorků  
stojan pro odběrové zkumavky  
šroubovací uzávěry pro odběrové zkumavky  
zásobníky činidel na jedno použití  
těsnící fólie DuraSeal<sup>®</sup> na zkumavky

### Zařízení a příslušenství běžně používaná v laboratoři

vodní lázeň (65 ± 2 °C) dostatečně velká, aby mohla pojmout buď jeden konverzní stojan (36 x 21 x 9 cm) nebo 2 stojany pro zkumavky se vzorky *digene* Specimen Racks (každý 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)  
mikrocentrifuga (volitelná položka pro centrifugaci ampulek se sondami, aby se získal maximální objem sondy)  
vortexová míchačka s kalíškovým nástavcem  
jednokanálová pipeta Micropipettor; měnitelné nastavení pro objemy 20-200 µl a objemy 200-1000 µl  
opakovací vytlačovací pipetovací zařízení jako je Eppendorf Repeater<sup>®</sup> Pipette či ekvivalentní  
osmikanálová pipeta Pipettor; měnitelné nastavení pro objemy 25-200 µl  
minutkový laboratorní budík  
roztok chlornanu sodného, 0,5 % finální koncentrace (nebo domácí bělicí prostředek)  
Parafilm<sup>®</sup> nebo ekvivalent  
pipetovací špičky (na jedno použití) s aerosolovým filtrem pro jednokanálové pipety (20 do 200 µl a 200-1000 µl)  
špičky (na jedno použití) pro pipetovací zařízení pro opakovanou akci Eppendorf (25 a 500 µl)  
špičky (na jedno použití) pro 8-kanálovou pipetu (25 do 200 µl)  
Kímtowels<sup>®</sup> Wipers - tampóny na blotování nebo ekvivalentní papírové ubrousky bez volných vláken  
ochranný povlak laboratorního stolu (na jedno použití)  
rukavice bez mastku  
5 ml nebo 15 ml polypropylenové zkumavky s kulatým dnem a víčkem (pro ředění sondy)  
2,0 ml polypropylenové mikrocentrifugační zkumavky s víčky

### Přídavné zařízení a příslušenství pro zpracování vzorků roztoku PreservCyt

centrifuga s výkyvnými pouzdry schopná dosáhnout 2900 ± 150 x g a vhodná pro 10 ml či 15 ml kónické polypropylenové centrifugační zkumavky  
5 ml sérologické pipety nebo přenosné pipety *digene* HC2 souprava pro konverzi vzorku (hc2 Sample Conversion Kit)<sup>A</sup>  
špičky (na jedno použití) pro pipetovací zařízení pro opakovanou akci Eppendorf Repeater<sup>®</sup> Pipette (50 a 100 µL))

#### Pro manuální postup vortexování:

*digene* HC2 zkumavky pro konverzi vzorku (15 ml kónické)<sup>F</sup>, Sarstedt 10 ml kónické zkumavky s víčky či VWR či značky Corning<sup>®</sup> 15 ml polypropylenové centrifugační zkumavky s kónickým dnem a s víčky  
stojan na zkumavky, který pojme 10 ml nebo 15 ml kónické zkumavky

#### Pro postupy používající zařízení Vortexer 2 pro více zkumavek:

*digene* HC2 konverzní zkumavky pro vzorky (15 ml kónické)<sup>F</sup>  
Vortexer 2 pro více zkumavek (Multi-Specimen Tube [MST] Vortexer 2)  
konverzní stojan a víko na stojan (specificky určené pro 15 ml kónické zkumavky)  
zásobník těsnící fólie pro zkumavky a řezačka  
těsnící fólie DuraSeal<sup>®</sup> na zkumavky (pro použití u MTS Vortexeru 2)

<sup>A</sup> Pouze zařízení a příslušenství potvrzené jako vhodné pro DNA test *digene* HC2 CT-ID jsou k dispozici u firmy QIAGEN.

<sup>B</sup> Je nutné použít i při poloautomatické RCS aplikaci.

<sup>C</sup> Podle přání zákazníka. Jiné multikanálové pipetovací zařízení s nastavitelnou vzdáleností mezi špičkami může být použito podle potřeby: Předpoklad je, že může být dosaženo vzdálenosti špiček 3,2 cm v expandovaném stavu. Jako alternativa může být použita jednokanálová pipeta, kterou lze pipetovat 75 µl.

<sup>D</sup> Charakteristiky účinnosti testů DNA *digene* HC2 CT-ID byly stanoveny pouze u zmíněných testovacích souprav.

<sup>E</sup> Nahlédněte do uživatelské příručky Rapid Capture System (RCS), kde se dozvíte specifické informace pro použití tohoto systému pro testování velkého množství vzorků za použití tohoto stanovení.

<sup>F</sup> *digene* HC2 konverzní zkumavky pro vzorky (VWR či značky Corning®) jsou k dispozici u firmy QIAGEN a musí být použity, aby bylo zajištěno řádné provedení stanovení, je-li použit postup s Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

## **VAROVÁNÍ A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ**

**PŘEČTĚTE SI POZORNĚ VŠECHNY INSTRUKCE PŘEDTÍM, NEŽ TEST POUŽIJETE.**

### **BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**

VŠECHNY VZORKY by měly být považovány za potenciálně infekční. Žádná známá metoda neposkytuje úplnou jistotu, že vzorky nemohou přenést infekci. Doporučujeme, aby se s lidskými vzorky zacházelo v souladu s patřičnou praxí platnou pro biologickou bezpečnost v daném státě či místě.<sup>13,14,15,16</sup> Aplikujte tuto praxi pro biologickou bezpečnost u materiálů, které obsahují (nebo je podezření že obsahují) infekční materiál. Tato preventivní opatření zahrnují (ale nejsou omezena na) následující body:

1. Nepipetujte ústy.
2. Nekuřte, nejzte nebo nepijte v prostorách, kde se zachází s činidly nebo se vzorky.
3. Pokud zacházíte s činidly nebo se vzorky, používejte jednorázové gumové rukavice bez mastku. Po provedení testu si důkladně umyjte ruce.
4. Očistěte a desinfikujte všechna místa, kde došlo k rozlití vzorků: použijte tuberculocidní desinfekční činidlo jako je 0,5 % chlornan sodný či jiné vhodné desinfekční činidlo.<sup>17,18</sup>
5. Asanujte a zlikvidujte všechny vzorky, činidla a jiné potenciálně kontaminované materiály podle místních předpisů.<sup>19,20</sup>

Některá činidla obsahují azid sodný. Bylo pozorováno, že azid sodný tvoří v laboratorním potrubí azid olovnatý nebo měďnatý. Tyto azidy mohou při nárazu explodovat, např. při úderu kladivem. Aby se předešlo tvorbě olovnatého nebo měďnatého azidu, důkladně propláchněte odpad vodou, poté co jste tam vylili roztoky obsahující azid sodný. Podle Státního ústavu pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci jsou doporučena následující opatření k odstranění kontaminace ze starých výlevků kde je podezření, že se akumulovaly azidy: (1) odsajte kapalinu ze sifonu výlevky za použití gumové nebo plastické hadice, (2) naplňte sifon roztokem 10 % hydroxidu sodného, (3) ponechte po dobu 16 hodin a (4) dobře propláchněte vodou.

## INFORMACE O BEZPEČNOSTI A ZDRAVOTNÍM RIZIKU

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

Nahlédněte do *Uživatelské příručky pro Rapid Capture System (RCS)*, kde najdete další varování a preventivní opatření, specifické pro tento systém určený k testování velkého množství vzorků.

### **Prohlášení ohledně bezpečnosti a rizik komponent**

Pro komponenty sady *digene* HC2 CT-ID DNA Test platí následující R-věty a S-věty:

#### **CT Quality Control**

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

#### **CT-ID Positive Calibrator**

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

#### **Denaturation Reagent**



Obsahuje: hydroxid sodný. Nebezpečí! Může být korozivní pro kovy. Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

#### **GC Quality Control**

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

#### **Negative Calibrator**

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

#### **Probe Diluent**



Obsahuje: octová kyselina; kyseliny polyakrylové. Nebezpečí! Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

#### **Wash Buffer Concentrate**




Obsahuje: azid sodný. Varování! Zdraví škodlivý při požití.. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Používejte ochranné rukavice/ ochranný oděv/ ochranné brýle/ obličejový štít.

### **Další informace**


Bezpečnostní listy: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)



## OPATŘENÍ PRO ZACHÁZENÍ S TESTEM

1. Pro použití v diagnostice *in vitro*.
2. Cervikální kartáček se používá pouze u žen, které nejsou těhotné.
3. Nepoužívejte reakční činidla po uplynutí záruční lhůty, vyznačené vedle symbolu  na vnějším štítku krabičky.
4. Provedení testu mimo uvedená časová a teplotní omezení a limity může poskytnout neplatné výsledky. Stanovení, která nespádají do určených rozsahů času a teploty, musí být opakována.
5. Testovací postup pro test DNA *digene* HC2 CT-ID, ověřovací kritéria kalibrace stanovení, kontrola kvality a interpretace výsledků ze vzorků musí být přesně dodrženy, aby bylo možné získat spolehlivé výsledky testu.
6. Je důležité odpipetovat přesný objem požadovaného činidla a vše dobře promísit po každém přidavku činidla. Nedodržení tohoto postupu by mohlo způsobit chybné výsledky testu. Zjištění, že nastala požadovaná barevná změna potvrdí, že tyto podmínky byly splněny.
7. Součásti soupravy byly přezkoušeny jako ucelená jednotka. **Nezaměňujte** jednotlivé součásti za součásti z jiných zdrojů nebo z jiných šarží.
8. Nukleové kyseliny jsou velmi citlivé na degradaci nukleázou z okolního prostředí. Nukleázy se vyskytují na lidské kůži a na povrchu věcí či na materiálech, kterých se dotýkali lidé. Očistěte povrchy a pokryjte povrch pracovních stolů ochranným krytem na jedno použití **a při provedení všech kroků testu používejte gumové rukavice bez mastku**.
9. Dávejte pozor, aby se zabránilo kontaminaci imobilizační mikrodestičky a detekčního činidla 2 exogenní alkalickou fosfatázou v průběhu provedení testu. Látky, které mohou obsahovat alkalickou fosfatázu zahrnují detekční činidlo 1, bakterie, sliny, vlasy a oleje kožního původu. **Zakrytí imobilizační mikrodestičky po promývacím stupni a během inkubace s detekčním činidlem 2 je zvláště důležité, protože exogenní alkalická fosfatáza může reagovat s detekčním činidlem 2, a to může vést k falešně pozitivním výsledkům.**
10. Chraňte detekční činidlo 2 před vystavením přímému světlu po delší dobu. Použijte činidlo bezprostředně po odebrání alikvotního podílu a zabraňte vystavení přímému slunečnímu světlu.
11. Opakovací pipeta by měla být předem několikrát naplněna činidlem, než se začne s dávkováním. Pozornost musí být periodicky věnována větším vzduchovým bublinám. Nadměrný obsah velkých vzduchových bublin může způsobit nepřesné dávkování a lze se mu vyhnout tím, že se pipeta zcela naplní, pak se veškerá kapalina vypustí a znovu se naplní. Konkrétní pokyny pro použití najdete v instrukční příručce.
12. Pipetování multikanálovou pipetou při dávkování detekčních činidel 1 a 2 by mělo být provedeno za použití reverzní pipetovací techniky (*viz Hybrid Detection* [Detekce hybridu]). Zkontrolujte špičku každé pipety na multikanálové pipetě, zda je dobře nasazena a zda je v pořádku plnění.
13. Ujistěte se o tom, že během promývání je každá jamka mikrodestičky důkladně promyta, jak je uvedeno v instrukcích pro manuální promývání. Nedostatečné promytí se projeví jako zvýšené pozadí a může způsobit falešně pozitivní výsledky. Zbytky promývacího pufru v jamkách mohou mít za následek redukci signálu a špatnou reprodukovatelnost.
14. Začínáte-li pracovat ponechte mikrodestičkový inkubátor I temperovat po dobu 60 minut, aby bylo dosaženo rovnováhy při  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Není-li ponechána dostatečná doba pro tento ohřev, může dojít k roztavení hybridizační mikrodestičky. Pro další informace nahlédněte do Návodu k použití mikrodestičkového inkubátoru I.

## PŘÍPRAVA ČINIDEL A JEJICH USKLADNĚNÍ

- Po dodání soupravy uskladněte při 2 - 8 °C. Koncentrovaný promývací pufr, denaturační činidlo a indikační barvivo mohou být skladovány při 2 - 30 °C, podle potřeby.
- Nepoužívejte po uplynutí záruční doby vyznačené vedle symbolu  na štítku krabičky, nebo připravená činidla po záruční lhůtě (viz níže).
- Všechna činidla jsou připravena pro okamžité použití, s výjimkou denaturačního činidla, směsi CT sondy a promývacího pufru.

**Nahlédněte do Uživatelské příručky Rapid Capture System (RCS) kde se dozvíte jak připravit směs CT sondy, promývací pufr, detekční činidlo 1 a detekční činidlo 2, poněvadž tyto instrukce jsou specifické pro použití tohoto systému pro testování velkého množství vzorků.**

### Metoda přípravy činidel

<b>Denaturační činidlo</b>	<p><b>NEJDŘÍVE PŘIPRAVTE:</b> Přidejte 5 kapek indikačního barviva do láhve denaturačního činidla a důkladně promíchejte. Denaturační činidlo má mít homogenní tmavě fialovou barvu.</p> <p>Takto připravené denaturační činidlo je stabilní po dobu tří měsíců je-li uskladněno při 2 - 8 °C. Označte štítkem s novou expirační dobou. Jestliže činidlo ztrácí barvu, přidejte další 3 kapky indikačního barviva a před použitím důkladně promíchejte.</p> <p><b>Varování:</b> Denaturační činidlo je korozivní. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní prostředky pro oči a obličej. Postupujte opatrně.</p>																		
<b>Směs CT sondy (připravená z CT sondy a činidel k naředění sondy)</b>	<p><b>PŘIPRAVTE BĚHEM DENATURAČNÍ INKUBACE VZORKU:</b></p> <p><b>DŮLEŽITÉ: NĚKDY DOJDE K ZACHYCENÍ SONDY VE VÍČKU ZKUMAVKY.</b></p> <p><b>Poznámka:</b> Nejvyšší opatrnost věnujte v této fázi postupu věnována zabránění kontaminaci sondy a směsi v sondě RNázou. Použijte pipetové špičky s aerosolovým filtrem pro pipetování sondy. Roztok k naředění sondy je viskózní. <b>Postupujte opatrně, abyste při přípravě směsi CT sondy zajistili důkladné promíslení. Během mísení musí být na kapalině vidět vznik víru (vortexu). Nedostatečné smíslení může mít za výsledek redukcí signálu.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Krátce centrifugujte zkumavku se CT sondou, aby se dostala kapalina ke dnu ampulky. Jemným poklepem promíchejte.</li> <li>Stanovte požadované množství směsi sondy (25 µl/test). Doporučuje se připravit více směsi sondy, aby se vykompenzoval objem ztrát ve špičkách nebo na stěnách ampulky. Konzultujte navržené objemy v níže uvedeném seznamu. Doporučený nejnižší počet jamek pro každé použití je 24. Je-li vyžadováno použití menšího počtu jamek než 24 v jednom provedení, celkový počet testů na jednu soupravu by se pak měl zredukovat s ohledem k omezenému objemu sondy a roztoku k naředění sondy.</li> <li>Převedte požadované množství roztoku k naředění sondy do nové nádoby na jedno použití. V závislosti na počtu testů se doporučuje použít buď 5 ml nebo 15 ml polypropylenové zkumavky s kulatým dnem a zaklapovacím víčkem. K přípravě směsi sondy zředte CT sondu v poměru 1:25 roztokem ke zředění sondy.</li> </ul> <table border="1" data-bbox="511 1543 1295 1711"> <thead> <tr> <th>počet testů/stripů</th> <th>roztok k naředění sondy*</th> <th>objem sondy*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>na jamku</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Tyto hodnoty již v sobě zahrnují doporučený přídavný objem.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Napipetujte sondu do roztoku pro ředění sondy tak, že opřete špičku pipety proti vnitřní stěně zkumavky právě nad meniskem a vytlačíte obsah pipety. <b>Zabraňte ponoření špičky pipety do roztoku ke zředění sondy.</b></li> <li>Vortexujte nejméně 5 vteřin při maximální rychlosti pro dokonalé promíslení. <b>Musí se vytvořit viditelný vír.</b> Označte štítkem jako směs CT sondy a vložte do utěsněné nádoby až do doby, než bude třeba použít. <b>Nepoužitá směs sondy by měla být zlikvidována.</b></li> </ul>	počet testů/stripů	roztok k naředění sondy*	objem sondy*	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	na jamku	0,045 ml	1,8 µl
počet testů/stripů	roztok k naředění sondy*	objem sondy*																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
na jamku	0,045 ml	1,8 µl																	

<b>Promývací pufr</b>	<p><b>PŘIPRAVTE BĚHEM IMOBILIZAČNÍHO KROKU:</b></p> <p><b>Pro automatickou promývačku destiček,</b> je promývací pufr připraven jak popsáno níže a uskladněn v uzavřené nádobě, nebo může být připraven pokaždé objem 1 l a umístěn v zásobníku automatické promývačky destiček I. Viz tabulku (níže) pro objemy při mísení:</p> <p>Viz Návod k použití automatické promývačky destiček pro další instrukce ohledně péče o zařízení a jeho údržby.</p> <p><b>Varování: koncentrovaný promývací pufr je při požití toxický. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní prostředky pro oči a obličej. Pro minimalizaci vystavení se koncentrovanému promývacímu pufru přidejte při přípravě vodu.</b></p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>množství koncentrovaného promývacího pufru</u></th> <th style="text-align: center;"><u>množství destilované nebo deionizované vody</u></th> <th style="text-align: center;"><u>konečné množství promývacího pufru</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;">1933,4 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;">2900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Poznámka: Je velice důležité ponechat automatickou promývačku destiček I stále zapnutou. Tím je zajištěno proplachování jako údržba; to je provedeno každých 8 hodin, kdy není jednotka v provozu.</b></p> <p><b>Před provedením každého stanovení se ujistěte, že odpadní zásobník na automatické promývačce destiček I je prázdný a že je proplachovací zásobník naplněn destilovanou či deionizovanou vodou.</b></p> <p>Viz Návod k použití automatické promývačky destiček pro další instrukce ohledně péče o zařízení a jeho údržby.</p> <p><b>Pro metodu manuálního promývání destiček:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentrovaný promývací pufr dobře promíchejte.</li> <li>• K 100 ml koncentrovaného promývacího pufru přidejte 2,9 l destilované či deionizované vody a dobře promíchejte (konečný objem by měl být 3 l).</li> <li>• Utěsněte nádobu, aby bylo zabráněno kontaminaci nebo vypařování.</li> </ul> <p>Takto připravený promývací pufr je stabilní po dobu tří měsíců při 2 - 30 °C. Označte štítkem s novou expirační dobou. Jestliže byl promývací pufr v lednici, před použitím jej ponechte stát při 20 - 25 °C. Tím bude dosaženo vyrovnání teploty.</p> <p>Doporučuje se, aby promývací přístroj a hadice byly vymyty 0,5 % roztokem chlornanu sodného a důkladně vypláchnuty destilovanou nebo deionizovanou vodou jednou za tři měsíce, aby se zabránilo možné kontaminaci alkalickou fosfatázou, přítomnou v baktériích a plísniích.</p>	<u>množství koncentrovaného promývacího pufru</u>	<u>množství destilované nebo deionizované vody</u>	<u>konečné množství promývacího pufru</u>	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1933,4 ml	2 l	100,0 ml	2900,0 ml	3 l
<u>množství koncentrovaného promývacího pufru</u>	<u>množství destilované nebo deionizované vody</u>	<u>konečné množství promývacího pufru</u>											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1933,4 ml	2 l											
100,0 ml	2900,0 ml	3 l											

#### Objemy předem připravených činidel

<b>Detekční činidlo 1 a detekční činidlo 2</b>	<p><b>BEZPROSTŘEDNĚ PŘED POUŽITÍM:</b></p> <p>Činidla důkladně promíchejte, pak opatrně odměřte příslušný objem detekčního činidla 1 nebo detekčního činidla 2 do čistého zásobníku činidel, podle pokynů uvedených níže. Aby se zabránilo kontaminaci, tato činidla <b>NESMÍ BYT NIKDY</b> nalita zpět do původních láhví: <b>Nepoužitý materiál později zlikvidujte.</b> Jestliže není použita 8-kanálová pipeta, je možné ji nahradit příslušným pipetovacím přístrojem s opakovanou akcí. V tomto případě by měly být alikvotní podíly činidla nadávkovány do polypropylenové zkumavky dostatečné velikosti, aby byl k dispozici požadovaný objem, jak je uvedeno níže.</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>počet testů/stripů</u></th> <th style="text-align: center;"><u>objem detekčního činidla 1 nebo 2</u> obsah láhve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 test</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	<u>počet testů/stripů</u>	<u>objem detekčního činidla 1 nebo 2</u> obsah láhve	96/12	7,0 ml	72/9	5,0 ml	48/6	3,0 ml	24/3	0,125 ml	1 test	
<u>počet testů/stripů</u>	<u>objem detekčního činidla 1 nebo 2</u> obsah láhve												
96/12	7,0 ml												
72/9	5,0 ml												
48/6	3,0 ml												
24/3	0,125 ml												
1 test													

## ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY

Jediné vzorky, pro které je doporučeno testování testem DNA *digene* HC2 CT-ID, jsou cervikální vzorky odebrané a přenesené soupravou *digene* HC2 DNA Collection Device ( sestávající z cervikálního kartáčku a média pro přenos vzorků (*digene* Specimen Transport Medium) a rovněž cervikální vzorky odebrané pomocí *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (tampón a médium pro přenos vzorků [*digene* STM]) nebo vzorky, kde je použito odběrové zařízení typu košťátka, a které jsou umístěny v roztoku Hologic PreservCyt. Vzorky, které byly odebrány s použitím jiného systému pro odběr vzorků, nebo které byly přenášeny v jiných transportních médiích, nejsou způsobilé pro použití s tímto testem. Charakteristiky účinnosti testů této soupravy byly stanoveny pouze u zmíněných testovacích souprav. Je-li provedeno kolposkopické vyšetření, cervikální vzorky musí být odebrány před aplikací kyseliny octové nebo jódu. Pro další instrukce o odběru a postupy zacházení se vzorky nahlédněte do Návodu k použití k zařízení *digene* HC2 DNA Collection Device.

### CERVIKÁLNÍ VZORKY V *digene* STM

Vzorky v STM mohou být skladovány do dvou týdnů při pokojové teplotě a odeslány bez zmrazení do testovací laboratoře. Vzorky by měly být odeslány v izolované nádobě použitím poštovní kurýrní služby pro zajištěnou dodávku do 2 dnů nebo přes noc. Pokud se analýza v testovací laboratoři bude provádět do jednoho týdne, vzorky je třeba skladovat při teplotě 2 - 8 °C. Jestliže bude zkouška provedena déle než v jednom týdnu, uskladněte vzorky při -20 °C po dobu do 3 měsíců. Do přenosného média pro vzorky *digene* STM byl přidán konzervační prostředek, aby se zpomalilo množení bakterií a aby se zachovala neporušená DNA. **Není záměrem** zachování životaschopnosti organismů nebo buněk. Vzorky odebrané v transportním médiu *digene* STM nemohou být použity pro kultivaci u jiných testovacích metod.

Dvoutýdenní stabilita vzorků STM při pokojové teplotě, plus jeden týden při teplotě 2 - 8 °C, je založena na interních testech 90 simulovaných klinických vzorků. Těchto 90 vzorků zahrnovalo 40 vzorků, které obsahovaly nízké koncentrace CT organismů (na nebo blízko limitní hodnotě detekce [LOD]), 35 bylo mírně pozitivních (přibližně 2 - 5 násobek limitu detekce) a 5 vysoce pozitivních vzorků, které 10 krát převyšovaly limit LOD. Zbývajících 10 vzorků bylo CT negativních, 5 z nich ale obsahovalo vysoké množství GC organismů. Odhady účinnosti testu jsou založeny na vzorcích skladovaných při 2 - 8 °C nebo zmrazených a testovaných za 1 - 2 týdny po odebrání.

#### Poznámky:

1. Nedenaturovaný alikvotní podíl každého z 90 vzorků byl podroben extrémním teplotám, se záměrem simulovat podmínky během přepravy (uskladnění při -20 °C po dobu 3 dnů, poté při 50 °C po dobu 5 dnů a další 2 týdny při teplotě místnosti). Ačkoli byla pozorována ztráta signálu (RLU/CO) po 8 dnech za těchto podmínek, kvalitativní interpretace výsledků nebyla ovlivněna. Po další inkubaci (po dobu 2 týdnů při teplotě místnosti) byly pozorovány kvalitativní rozdíly u vzorků, které obsahovaly nízké úrovně organizmů.
2. Aby se zabránilo uvolňování víček na zkumavkách se vzorky, které jsou posílány nebo uskladněny zmrazené:
  - Před odesláním dříve zmrazených vzorků pokryjte víčka zkumavek fólií Parafilm®. Vzorky mohou být odeslány buď zmrazené nebo při 20 - 25 °C.
  - Když vyjmete vzorky z mrazicího zařízení pro testování, okamžitě vyměňte víčka za šroubovací uzávěry zkumavek pro odběr vzorků.
3. Zařízení *digene* HC2 DNA Collection Device by nemělo být použito pro odběr vzorků u těhotných žen. V případě odběru vzorků u těhotných žen použijte pouze *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (souprava pro odběr vzorků výtěru u pacientek)

### CERVIKÁLNÍ VZORKY V ROZTOKU HOLOGIC PRESERVCYT

Vzorky odebrané s použitím zařízení typu košťátka a umístěné v roztoku Hologic PreservCyt, které jsou určeny pro nanášení na testovací sklíčka v Hologic ThinPrep® Pap testu, mohou být použity pro test DNA *digene* HC2 CT-ID. Vzorky by měly být odebrány obvyklým způsobem a sklíčka ThinPrep Pap testu by měla být připravena podle Hologic instrukcí.

Vzorky roztoku PreservCyt poté, co byly odebrány a předtím, než jsou zpracovány pro test DNA *digene* HC2 CT-ID, mohou být skladovány po dobu do jednoho měsíce při teplotě místnosti (20 - 25 °C). Vzorky roztoku PreservCyt nemohou být zmrazeny. Pro postup zpracování těchto vzorků nahlédněte do *Postupu zpracování PreservCyt vzorků*.

## POSTUP TESTU

**Vzorky mohou obsahovat infekční materiál a podle toho se s nimi musí zacházet.** Test DNA *digene* HC2 CT-ID se může provádět ručně (podle tohoto návodu k použití) nebo se může použít zařízení Rapid Capture System pro testování velkého množství vzorků.

### TESTOVÁNÍ VELKÉHO MNOŽSTVÍ VZORKŮ S POUŽITÍM ZAŘÍZENÍ RAPID CAPTURE SYSTEM

Zařízení Rapid Capture System (RCS) (systém rychlé imobilizace) je univerzální přístroj pro automatické pipetování a ředění, které je možné použít při provádění testu *digene* HC2 CT-ID DNA na velkém počtu vzorků. Tento systém dokáže zpracovat 352 vzorků za osm hodin, včetně doby, kdy po 3,5 h není nutný zásah uživatele; až 704 výsledků může být vygenerováno za 13 hodin. Při přípravě na test se denaturace vzorků provádí nezávisle na RCS v primární odběrové zkumavce tak, jak je popsáno níže u manuální metody testu DNA *digene* HC2 CT-ID, ještě před tím, než jsou vzorky umístěny na plošinu RCS. Jak u manuální metody, tak i metody RCS se navíc pomocí mikroděstičkového luminometrického přístroje schváleného společností QIAGEN provede detekce chemiluminiscenčního signálu a vyhodnotí se výsledky. Každý z kroků testu DNA *digene* HC2 CT-ID se provádí v přesném pořadí jako v případě manuálního postupu. Pomocí zařízení RCS je možné postupně zpracovávat až 4 mikroděstičky, kde každá z těchto mikroděstiček obsahuje vzorky, kontroly kalibrátoru a kvality potřebné k dané analýze.

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

## MANUÁLNÍ POSTUP

### Uspořádání pokusu

1. Pokud test začínáte za studena, ponechte HCS Mikrodestičkový inkubátor I temperovat po dobu 60ti minut, aby bylo dosaženo teplotní rovnováhy  $65 \pm 2$  °C. Podrobnější informace naleznete v Návodu k použití mikrodestičkového inkubátoru I.
2. Ujistěte se, že teplota vodní lázně je 65 °C a že ve vodní lázni je dostatek vody na to, aby mohl být ponořen celý objem vzorku ve zkumavkách.
3. **Předtím, než začnete provádět analýzu**, vydejte z lednice vzorky a **všechna** požadovaná činidla. Po dobu 15 až 30 minut je nechte temperovat, aby dosáhly rovnovážné teploty 20 - 25 °C.
4. Vytvořte rozmístění destiček za použití softwaru *digene* pro analýzu s pomocí protokolů testu *digene* pro CT. Podrobné informace naleznete v příslušném návodu k použití softwaru.
5. Pro každý test je třeba **nově** připravit negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a kontroly kvality (QC). Kontroly kalibrátorů a kvality důkladně promíchejte. Pokud budete používat zařízení Vortexer 2 určené pro zkumavky s více vzorky, odeberte z každé z nich 500 µl do prázdných a náležitě označených odběrových zkumavek. Případně můžete z každé odebrat 200 µl do náležitě označených 2 ml polypropylenových mikrocentrifugačních zkumavek.
6. **NEJPRVE je třeba provést test na negativním kalibrátoru a pozitivním kalibrátoru**, a to třikrát u každé dávky testovaných vzorků. Testy kontrol kalibrátoru a kvality a vzorků je třeba provádět samostatně. Kontroly kalibrátoru a kvality a vzorky je třeba testovat v konfiguraci osmi jamkového sloupce a to tak, aby replikáty negativního kalibrátoru (NC) byly umístěny v jamkách A1, B1 a C1, pozitivní kalibrátor (PC) v jamkách D1, E1 a F1, kontrola kvality QC CT v jamce G1; QC GC v jamce H1 a od jamky A2 budou následovat vzorky. Viz příklad uspořádání uvedený níže. Pro správné nastavení software pro kontroly/kalibrátoru/kvality/vzorek konzultujte návod k použití k příslušnému luminometru schválenému společností QIAGEN a návod k použití příslušného softwaru k analýze *digene*.

### PŘÍKLAD USPOŘÁDÁNÍ PRO POKUS S 24 MIKROJAMKAMI:

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

## DENATURACE

### Poznámky:

- **Upozornění:** Denaturační činidlo je korozivní. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní pomůcky pro oči a obličej. Postupujte opatrně a při práci s činidly používejte ochranné gumové rukavice bez mastku.
- **Důležité:** Některé cervikální vzorky mohou obsahovat krev či jiný biologický materiál, který může překrývat barevné změny po přidavku denaturačního činidla. Vzorky, které vykazují tmavou barvu před přidáním denaturačního činidla, nemohou poskytnout v těchto krocích správnou barevnou změnu. V těchto případech, tedy když nebyla zaznamenána příslušná barevná změna, výsledky analýzy nejsou ovlivněny. Postup správného smísení může být ověřen sledováním barevné změny pro kontroly kalibrátoru a kvality.
- Během denaturační fáze se ujistěte, že ve vodní lázni je dostatečné množství vody, aby mohl být ponořen celý objem vzorku ve zkumavce.

- Vzorky podrobené testu až do stádia denaturačního kroku mohou být pak uskladněny při 2 - 8 °C přes noc, nebo při -20 °C po dobu do 3 měsíců. Maximálně mohou být provedeny 3 cykly zmrazení/rozmrazení, přičemž doba jednotlivého rozmrazení při pokojové teplotě nesmí přesáhnout 2 hodiny. Před použitím důkladně promíchejte.
- Kontroly kalibrátoru a kvality je možné připravit během denurační fáze a následně uskladnit přes noc při teplotě 2 - 8 °C. **Nesmí se však zmrazit.** Pokud byly kontroly kalibrátoru a kvality zmrazeny, musí být zlikvidovány.
- Vzorky nejsou po denuraci a inkubaci již považovány za infekční.<sup>21</sup> Laboratorní personál však musí stále zachovávat opatření platná v daném státě nebo místě.

## KONTROLY KALIBRÁTORU, KVALITY A POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ STM

### Poznámky:

- Nástroj pro odběr vzorků nevyndávejte před denurací.
  - Aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům, je naprosto nezbytné, aby veškerý materiál - kontroly kalibrátoru, kvality a STM vzorky - přišly do styku s denaturačním činidlem. Zásadní je přitom fáze smísení následující po přidání denaturačního činidla: **Ujistěte se, že zařízení Multi-Specimen Tube Vortexer 2 (určené pro více zkumavek se vzorky) je nastaveno na hodnotu 100 (maximální rychlost) a že se během vortexování na hladině vytvořil okem pozorovatelný vír, a to takový, aby kapalina opláchla celý vnitřní povrch zkumavky. Jestliže provádíte postup manuálně, ujistěte se o tom, že každá kontrola kalibrátoru, kvality a vzorek je míchán individuálně vortexováním, každý nejméně po 5 vteřin při nejvyšší rychlosti tak, že vír kapaliny smáčí celý vnitřní povrch zkumavky. Pak zkumavku jednou obraťte dnem vzhůru.**
1. Sejměte víčka ze zkumavek s kontrolami kalibrátoru, kvality a STM vzorky a zlikvidujte je.
 

**Poznámka:** Víčka sejmutá ze zkumavek se vzorky jsou považována za potenciálně infekční. Zlikvidujte je v souladu se státními/místními předpisy.
  2. Do každé kontroly kalibrátoru, kvality nebo vzorku napipetujte pomocí opakovací nebo nastavitelné pipety denaturační činidlo s indikačním barvivem. Dejte pozor, abyste se nedotkli stěn zkumavky - mohlo by dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků. Denaturační činidlo bude potřeba v takovém objemu, který se rovná polovině objemu vzorku. Přesné objemy pro jednotlivé typy kontrol kalibrátoru, kvality a vzorku jsou uvedeny v tabulce níže.
    - **Zředte zbytek denaturačního činidla v lahvičce předtím, než jej zlikvidujete v souladu s platnými státními nebo místními laboratorními postupy.**

kontroly kalibrátoru, kvality nebo vzorek	požadované objemy denaturačního činidla
negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a kontrola kvality, 200 µl	100 µl
negativní kalibrátor, pozitivní kalibrátor a kontrola kvality, 500 µl	250 µl
cervikální vzorek, 1 ml	500 µl

3. Vzorky promíchejte pomocí jedné ze dvou metod popsanych níže.

### Metoda s použitím zařízení pro více zkumavek (Multi-Specimen Tube [MST] Vortexer 2)

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

- a) Zkumavky s kontrolou kalibrátorů, kvality a STM vzorky přikryjte speciální fólií DuraSeal®, a to tak, že tuto fólii přetáhnete přes zkumavky ve stojanu.
- b) Na zkumavky pokryté fólií položte víko stojanu a toto víko zajistěte pomocí dvou postranních spon. Fólii odřízněte pomocí řezacího nástroje.
- c) Umístěte stojan na zařízení MST Vortexer 2 a zajistěte jej svorkou. Zkontrolujte, zda je rychlost nastavena na hodnotu 100 (maximální rychlost), a následně přepněte spínač zařízení do polohy „zapnuto“ („ON“). Nechte vortexovat po dobu 10 vteřin.

### Metoda manuálního vortexování jednotlivých zkumavek

- a) U zkumavek s kontrolou kalibrátorů, kontroly a STM vzorky vyměňte víčka za čisté šroubovací uzávěry určené pro zkumavky pro odběr vzorků.
  - b) Obsah každé zkumavky důkladně promíchejte, a to jednotlivě, vortexováním při vysoké rychlosti po dobu 5ti vteřin.
  - c) Každou zkumavku se vzorkem převraťte dnem vzhůru (jednou), aby se vymyl povrch vnitřní stěn zkumavky, uzávěr a okraj.
  - d) Vraťte zkumavku do stojanu.
4. Během vortexování se na kapalině uvnitř každé zkumavky **musí vytvořit viditelný vír, aby kapalina opláchla celý vnitřní povrch zkumavky**, a to bez ohledu na to, jakou metodu vortexování jste zvolili. Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky by měly změnit barvu na tmavě fialovou.
5. Inkubace obsahu zkumavek probíhá ve stojanu umístěném ve vodní lázni při 65 + 2 °C po dobu 45 + 5 minut (denaturované kontroly kalibrátorů, kvality a vzorky mohou být testovány okamžitě, nebo uskladněny při 2 – 8 °C přes noc, jak je popsáno výše v **Poznámkách**). Pro informace o skladování vzorků nahlédněte do oddílu *Volitelná možnost přerušení testu*. Během této inkubace připravte směs sondy CT. Viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*.

### POSTUP PŘÍPRAVY VZORKŮ ROZTOKU PRESERVICYT

#### **Poznámky:**

- Pro získání podrobných informací konzultujte návod k použití konverzní soupravy *digene HC2* (*digene HC2 Sample Conversion Kit*).
- Zpracování 4 ml alikvotního podílu roztoku PreservCyt poskytne materiál pro 2 testy při manuálním testování. Minimální objem, který může být zpracován, je 4 ml. Podrobnosti k minimálnímu zbytkovému objemu naleznete v části „*Ekvivalence mezi vzorky digene STM a vzorky roztoku preservcyt*“.
- Připravte vzorky roztoku PreservCyt v sériích o počtu 36 nebo nižším; jinak dojde k tomu, že se pelety při dekantaci supernatantu uvolní. Toto je důležité pro zachování celistvosti buněčného peletu během dekantčního kroku. Připravujete-li další ampulky roztoku PreservCyt, nezačínajte s jejich přípravou dříve, než ukončíte přípravu první série.

#### Příprava činidla

Použijte buď denaturační činidlo (DNR), které je součástí vybavení testu DNA *digene HC2 CT-ID* (viz *Příprava činidla a jeho uskladnění*), nebo denaturační činidlo DNR dodávané s konverzní soupravou *digene HC2 Sample Conversion Kit*. K přípravě DNR dodávaného s konverzní soupravou *digene HC2 Sample Conversion Kit* přidejte 3 kapky indikačního barviva do láhve s DNR a dobře promíchejte. Roztok by měl mít homogenní tmavě fialovou barvu. Ke stanovení požadovaných objemů použijte Tab. 1.

**Tab. 1.** Požadované objemy: příprava činidla.

počet testů	objem roztoku PreservCyt	objem konverzního pufru
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Označte konverzní zkumavku (*digene HC2 Sample Conversion tube*), 10 ml kónickou zkumavku Sarstedt nebo 15 ml VWR či kónickou zkumavku značky Corning příslušným identifikačním číslem vzorku.
2. Každý vzorek zpracovávejte zvlášť:
  - a. Důkladně protřepete ampulku PreservCyt v ruce, až se buňky jeví homogenně rozptýlené.



- b. Bezprostředně poté (protože se buňky velmi rychle usazují) odpipetujte příslušný objem vzorku PreservCyt do označené zkumavky. Zaveďte pipetu s roztokem PreservCyt až na dno kónické zkumavky, aby byla minimální možnost ulpění buněčného materiálu na vnitřních stěnách zkumavky.
3. Přidejte příslušný objem konverzního pufru do každé zkumavky (viz Tab. 1).
4. Zavíčkujte a důkladně promíchejte obsah každé zkumavky za použití vortexového míchadla s kalíškovým nástavcem.

**Poznámka:** Postup pro MST Vortexer 2 nebyl ověřen pro vortexování vzorků roztoku PreservCyt s konverzním pufrům před centrifugací a nesmí být tedy v tomto kroku použit.

5. Centrifugujte zkumavky v rotoru s výkyvnými pouzdry při  $2\ 900 \pm 150 \times g$  po dobu  $15 \pm 2$  minut.
6. Během centrifugace připravte směs média pro přenos vzorku (*digene* STM)/denaturačního činidla (STM/DNR) v poměru 2:1, podle Tab. 2.

**Poznámka: Směs STM/DNR musí být čerstvě připravena každý den, kdy se provádí test.**

- a. Ke stanovení celkového požadovaného objemu směsi STM/DNR použijte počáteční objem vzorku roztoku PreservCyt jako vodítko a vynásobte objemy STM a DNR „na jednu zkumavku“ počtem vzorků, které mají být zpracovány (viz Tab. 2).

**Tab. 2.** Požadované objemy: STM/DNR.

počet testů	objem roztoku PreservCyt	objem STM na 1 zkumavku pro výslednou směs* STM/DNR	objem DNR na 1 zkumavku pro výslednou směs* STM/DNR	směs STM/DNR přidaná do zkumavky
1-2	4 ml	120 $\mu$ l	60 $\mu$ l	150 $\mu$ l
3	6 ml	170 $\mu$ l	85 $\mu$ l	225 $\mu$ l
4	8 ml	220 $\mu$ l	110 $\mu$ l	300 $\mu$ l
5	10 ml	270 $\mu$ l	135 $\mu$ l	375 $\mu$ l
6	12 ml	320 $\mu$ l	160 $\mu$ l	450 $\mu$ l

\* Objemy uvedené v těchto sloupcích by neměly být přímo přidány do zkumavky se vzorkem.

- b. Důkladně roztok promíchejte vortexováním.
7. Vyjměte zkumavky z centrifugy (jednu po druhé) a umístěte je do stojanu nebo do konverzního stojanu. Na dně každé zkumavky by měl být viditelný růžový/oranžový pelet.

**Poznámka:** Vzorky, u kterých není po centrifugaci viditelný pelet, nejsou pro testování přijatelné a měly by být zlikvidovány.

8. Každý vzorek zpracovávejte zvlášť:
  - a. Odstraňte víčko a odložte je stranou na čistý papírový ubrousek bez volných vláken.
  - b. Opatrně dekantujte supernatant.
  - c. Držte zkumavku dnem vzhůru a jemně vysušte (blotujte) - přibližně 6 krát - na absorpčních papírových ubrouscích bez volných vláken až přestane ze zkumavky odkapávat kapalina. Pokaždé použijte čisté místo na ubrousku. **Zabraňte** tomu, aby buněčné pelety sklouzly během blotování dolů.

**Poznámky:**

- Neblotujte více než jednou na stejném místě absorpčního papírového ubrousku bez volných vláken.
  - Je důležité blotováním odstranit maximální množství roztoku PreservCyt; je však normální pozorovat po blotování ještě zbylý roztok PreservCyt.
- d. Umístěte zkumavku do stojanu nebo konverzního stojanu.

## Vortexování a denaturace

### Postup manuálního vortexování

1. Ke každému peletu přidejte příslušný objem STM/DNR (viz Tab. 2). Zavíčkujte každou zkumavku a proveďte resuspenzi peletů vortexováním každé zkumavky zvlášť po dobu nejméně 30 vteřin při nastavení maximální rychlosti. Je-li resuspenze peletu obtížná, vortexujte po dobu dalších 10-30 vteřin nebo do doby, kdy se pelet uvolní ode dna zkumavky. Zůstane-li pelet ještě stále nerozpuštěn po dalším vortexování (maximálně 2 minuty) poznamenejte si identifikační číslo vzorku a pokračujte k dalšímu kroku.
2. Umístěte zkumavky do stojanu.
3. Umístěte stojan do vodní lázně ( $65 \pm 2$  °C) na dobu  $15 \pm 2$  minut. Ujistěte se, že je úroveň vody v lázni dostatečná k pokrytí kapaliny ve zkumavkách.
4. Vyjměte stojan se vzorky z vodní lázně a vortexujte vzorky jednotlivě po dobu 15 - 30 vteřin.  
**Poznámka:** Ujistěte se o tom, že jsou v této fázi všechny pelety úplně resuspendovány. Vzorky, které ještě vykazují viditelné pelety nejsou pro testování přijatelné a měly by být zlikvidovány.
5. Vraťte stojan do vodní lázně ( $65 \pm 2$  °C) a pokračujte s denaturací po dalších  $30 \pm 3$  minut.
6. Přejděte k *Hybridizačnímu kroku* (níže) nebo viz *Volitelné přerušení testu* pro informace o uskladnění a zpracování denaturovaných vzorků.

### Postup pro více zkumavek - Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

#### **Poznámky:**

- Postup pro více zkumavek - Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 - je ověřen pro zpracování vzorků roztoku PreservCyt po centrifugaci a dekantaci supernatantu.
  - Pouze MST Vortexer 2 je určen pro zpracování vzorků roztoku PreservCyt. Konverzní stojan a víko jsou speciálně navrženy tak, že pojmu konverzní zkumavky *digene* HC2 (VWR či značky Corning 15 ml kónické zkumavky). Uživatel by měl používat na konverzním stojanu pouze jeden typ zkumavek pohromadě. Jiné značky zkumavek nejsou pro použití ověřeny.
  - Je vyžadováno přesné zachování definované doby vortexování konverzního stojanu a víka.
  - Konverzní stojan a víko nemohou být použity k vortexování kontrol, kalibrátorů či kontrol kvality u testu DNA *digene* HC2. Výška STM zkumavek zabraňuje dostatečnému vortexování při použití konverzního stojanu a víka.
1. Po blotování každé označené 15 ml kónické zkumavky ji umístěte do správné pozice v konverzním stojanu.
  2. Ke každému peletu přidejte příslušný objem směsi STM/DNR (Tab. 2).
  3. Kónické zkumavky (15 ml) překryjte speciální fólií DuraSeal tak, že ji přetáhnete přes zkumavky ve stojanu.
  4. Na zkumavky pokryté fólií položte víko stojanu a zajistěte je pomocí dvou postranních spon. Fólii odřízněte pomocí řezacího nástroje poté, co je víko bezpečně upevněno.
  5. Zvedněte páku s červenou rukojetí nahoru tak, že je v horizontální pozici.
  6. Umístěte konverzní stojan a víko na MST Vortexer 2 tak, že je největší diagonální úhel konverzního stojanu umístěn v pravém předním rohu. Upravte pozici stojanu a víka na platformě MST Vortexeru 2 tak, aby byl bezpečně usazen mezi pozičními značkami. Zajistěte stojan na místě tím, že zatlačíte páku s červenou rukojetí dolů do vertikální pozice. Stojan je takto pevně přichycen.
  7. Ověřte, že je rychlost nastavená na 100 (maximální rychlost) a že je pulzní přepínač v poloze OFF (vypnuto).
  8. Zapněte proudový vypínač Vortexeru do polohy ON (zapnuto). **Vortexujte zkumavky po dobu 30 vteřin.**
  9. Vypněte proudový vypínač Vortexeru - poloha OFF (vypnuto).
  10. Sejměte konverzní stojan a víko z MST Vortexeru 2 tak, že zvednete páku s červenou rukojetí.
  11. Umístěte stojan do vodní lázně ( $65 \pm 2$  °C) na dobu  $15 \pm 2$  minut. Ujistěte se, že úroveň vody v lázni zcela pokrývá kapalinu ve všech zkumavkách.

12. Po 15 minutové inkubaci vyjměte stojan se vzorky z vodní lázně.
13. Aby se zabránilo rozstříknutí přebytečné vody, osušte stojan předtím, než jej umístíte na MST Vortexer 2.
14. Zajistěte konverzní stojan a víko na MST Vortexeru 2 podle popisu v *Kroku 6*.
15. Ověřte, že je rychlost nastavena na 100 a zapněte proudový vypínač Vortexeru do polohy ON (zapnuto). **Vortexujte zkumavky 1 minutu.**
16. Vypněte proudový vypínač Vortexeru - poloha OFF (vypnuto).
 

**Poznámka:** Postup pro MST Vortexer 2 standardizuje rychlost míchání, dobu a celý proces; vylučuje tedy potřebu vizuální kontroly buněčných peletů, jak je vyžadováno při manuálním postupu vortexování.
17. Vraťte stojan do vodní lázně ( $65 \pm 2$  °C) a pokračujte v denaturaci po dobu  $30 \pm 3$  minut.
18. Vyjměte stojan z vodní lázně, osušte jej a zajistěte jej na Vortexeru.
19. Zapněte proudový vypínač Vortexeru do polohy ON (zapnuto). **Vortexujte po dobu 10 vteřin při maximálním nastavení.**
20. Vypněte proudový vypínač Vortexeru - poloha OFF (vypnuto). Sejměte stojan.
21. Okamžitě sejměte víko stojanu a odstraňte těsnící fólii ze zkumavek se vzorky.
22. Přejděte k *Hybridizačnímu kroku* (níže) nebo viz *Volitelné přerušení testu* pro informace o uskladnění a zpracování denaturovaných vzorků.

## VOLITELNÉ PŘERUŠENÍ TESTU

Po denaturaci mohou být vzorky STM a vzorky PreservCyt po konverzi uskladněny při 2 - 8 °C přes noc nebo při -20 °C po dobu do 3 měsíců. Při uskladnění v lednici přes noc mohou být vzorky ponechány v konverzním stojanu s novou fólií DuraSeal a přiloženým víkem stojanu. Před uskladněním při -20 °C je však třeba odstranit víko stojanu a fólii DuraSeal a zkumavky musí být opatřeny víčky. V každém případě musí být vzorky vytemperovány na teplotu 20 – 25 °C a důkladně vortexovány předtím, než se přejde k *Hybridizačnímu kroku*.

**Poznámka:** Neskladujte či neposílejte denaturované vzorky na suchém ledu.

Mohou být provedeny maximálně 3 cykly zmrazení/rozmrazení s maximální dobou 2 hodin při teplotě místnosti během každého rozmrazovacího cyklu.

## HYBRIDIZACE:

### Poznámky:

- Směs sondy CT je viskózní. Věnujte pozornost tomu, aby se zajistilo dokonalé smísení a aby do každé jamky hybridizační mikrodestičky bylo nadávkováno požadované množství směsi. Viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*.
- Pokud byl denaturovaný vzorek uskladněn při teplotě -20 °C, nechte jej roztát na teplotu 20 - 25 °C a před provedením hybridizace jej důkladně vortexujte.
- Před použitím předehejte mikrodestičkový inkubátor I na  $65 \pm 2$  °C po 60 minut. Podrobnější informace naleznete v *Návodu k použití mikrodestičkového inkubátoru I*, podle potřeby.

1. Připravte si a označte hybridizační destičku.
2. Po inkubaci vyjměte kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky z vodní lázně. Pokud pracujete se zařízením MST Vortexer 2 určeným pro více zkumavek najednou, vortexujte celý stojan se STM vzorky při maximální rychlosti po dobu minimálně 5 vteřin. Pro vzorky roztoku PreservCyt vortexujte celý konverzní stojan po dobu minimálně 10 vteřin při maximální rychlosti. Případně můžete vortexovat každou zkumavku jednotlivě, opět po dobu minimálně 5 vteřin.
3. Z každé kontroly kalibrátoru, kvality nebo vzorku napipetujte 75 µl na **dno** jamky hybridizační mikrodestičky. Dodržujte přitom stanovené uspořádání destičky (pod hlavičkou *Uspořádání pokusu*). Nedotýkejte se stěn jamek a omezte tvorbu vzduchových bublinek. Pro každý přenos použijte čistou, dlouhou pipetovací špičku, abyste zamezili zkřížené kontaminaci kontrol kalibrátoru, kvality nebo vzorků. Z transportní zkumavky pro přenos vzorků STM neodstraňujte nástroj k odběru vzorků. Denaturované vzorky mohou být zakryty šroubovacími uzávěry určenými pro zkumavky pro odběr

vzorků a uskladněny spolu s pomůckami pro odběr vzorků, které zůstaly ve zkumavkách. Denaturované vzorky PreservCyt mohou být znovu zakryty původními víčky.

#### Poznámky:

- Pokud nebudou alikvotní podíly vzorků přeneseny s náležitou péčí, mohou se vyskytnout falešně pozitivní výsledky. Dbejte na to, abyste se během přenosu vzorku, při odebrání alikvotního podílu 75- $\mu$ l, nedotkli špičkou pipety vnitřní stěny zkumavky.

4. Po přenosu posledního vzorku, **provedte inkubaci hybridizační mikrodestičky po 10 minut při teplotě 20 - 25°C.**
5. Z připravené a důkladně vortexované směsné sondy odměřte alikvotní podíly do zásobníku činidla na jedno použití. Do každé jamky s kontrolami kalibrátoru, kvality a vzorky opatrně napipetujte 25  $\mu$ l směsné sondy, a to pomocí osmi kanálové pipety, přičemž pro každou řadu použijte nové špičky. Směs sondy nadávkujte do každé hybridizační jamky, přičemž zabraňte zpětnému vystříknutí kapaliny. Nedotýkejte se stěn jamek.

**Poznámka:** Pro předchozí krok použijte 8mi kanálové pipetovací zařízení, která je opatřeno 25 - 200  $\mu$ l špičkami, a je schopné dávkovat 25 - 75  $\mu$ l. Místo osmi kanálového, použijte pro malý počet jamek jednonanálové pipetovací zařízení (opatřené 25 - 200  $\mu$ l špičkami).

6. Hybridizační mikrodestičku zakryjte příslušným víčkem. Hybridizační destičku následně třepejte na rotační třepačce I, a to při rychlosti 1 100  $\pm$  100 ot/min po dobu 3  $\pm$  2 minuty. *Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky by měly po protřepání zežloutnout.* V těch jamkách, které zůstaly fialové, pravděpodobně nebylo odpovídající množství směsné sondy. Do těchto (fialových) vzorků přidejte dalších 25  $\mu$ l směsné sondy a znovu je protřepejte. Pokud jamky zůstanou fialové i po této proceduře, vzorky testujte je znovu.
7. Proveďte inkubaci v mikrodestičkovém inkubátoru I, který byl předeheřán na rovnovážnou teplotu 65  $\pm$  2 °C po dobu 60  $\pm$  5 minut.

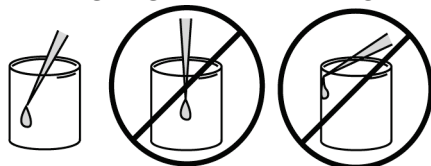
#### Poznámky:

- Při vkládání hybridizační mikrodestičky do inkubátoru I dbejte na to, aby nedošlo k rozlití vzorku.
- Po protřepání by měly vzorky roztoku PreservCyt změnit barvu na růžovou (místo žluté).

## IMOBILIZACE HYBRIDU

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

### NÁKRES 1: SPRÁVNÉ PIPETOVÁNÍ



SPRÁVNĚ

Nepipetujte vertikálně, zabraňte rozstříknutí.

Nedotýkejte se špičkou stěny jamky.

4. Mikrodestičku zakryjte příslušným víkem a po dobu  $60 \pm 5$  minut je nechejte protřepat na rotační třepačce I při rychlosti  $1\ 100 \pm 100$  ot/min, při teplotě 20 - 25 °C.
5. Během této inkubace připravte promývací pufr a zkontrolujte zásobníky pro výplach a odpad automatické promývačky destiček. Viz oddíl o přípravě a uskladnění činidel.
6. Po dokončení imobilizace vyjměte z rotační třepačky I imobilizační destičku a opatrně sejměte víko destičky. Kapaliny z jamek vylijte do výlevky, a to následujícím způsobem: Destičku obraťte nad výlevkou dnem vzhůru a silně jí zatřepete směrem dolů, a to v dostatečné vzdálenosti ode dna výlevky, aby kapalina nevyšpláchla. **Destičku neobracejte do původní polohy;** po promytí destičku vysušte (blotujte) a to tak, že jí 2 - 3 krát silně poklepete na čisté tampóny Kimtowels® nebo na papírové ubrousky bez vláken (se srovnatelnými vlastnostmi). Ujistěte se, že z jamek byla odstraněna všechna kapalina a že vrchní část destičky je suchá.

## DETEKCE HYBRIDU

### Poznámky:

- Činidlo na destičku přidávejte pomocí osmi kanálové pipety ve směru zleva doprava.
  - Pipetování doporučujeme provádět reverzním způsobem, aby při byla dosažena lepší konzistence dávkování činidla. U této techniky jsou pipetové špičky zpočátku přeplněné tak, že je použita druhá zarážka na ovladači pipetovacího zařízení pro nasávání a dávkování (na pístu). Viz postup popsáný níže. Než začnete činidlo dávkovat na destičku, otřete špičky pipety o zásobník s činidlem nebo o čistý papírový ubrousek bez vláken, aby se odstranilo přebytečné činidlo.
  - Je-li třeba, můžete pipetu stabilizovat tak, že opřete střední část pipetových špiček o horní okraj imobilizačních mikrojamek. Dejte pozor, abyste se nedotkli stěn mikrojamek, mohlo by tak dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků. Viz nákres 1 uvedený výše.
1. Do zásobníku činidla nadávkujte příslušný alikvotní podíl detekčního činidla 1 (pokyny viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*). Pomocí 8-kanálové pipety opatrně napipetujte (reverzní metodou, která je popsána níže) do každé jamky imobilizační mikrodestičky 75  $\mu$ l detekčního činidla 1.

Reverzní pipetovací metoda:

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

## PROMÝVÁNÍ

Imobilizační destičku promyjte po vzoru jednoho z níže uvedených způsobů.

### Promývání pomocí automatické promývačky destiček:

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

## PŘED KAŽDÝM POUŽITÍM:

- Zkontrolujte, zda je promývací zásobník naplněn roztokem promývacího pufru až po značku 1 l. Není-li tomu tak, připravte roztok promývacího pufru. Viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*.
  - Zkontrolujte, zda je vyplachovací zásobník naplněn destilovanou či deionizovanou vodou.
  - Zkontrolujte, zda je odpadní zásobník prázdný a zda je bezpečně utažen uzávěr.
  - Automatická promývačka destiček se před každým promýváním sama automaticky naplní a po každém promývání se zase vypláchne.
1. Z destičky sejměte víko a umístěte ji na platformu automatické promývačky.
  2. Zkontrolujte, zda je přístroj zapnutý a zda je na displeji zobrazeno „Digene Wash Ready“ (promývání připraveno) nebo „P1“.

**Poznámka: Pokud bude použita pouze část pruhu (stripu) imobilizačních jamek, na imobilizační destičku bude třeba umístit i prázdné jamky, aby se před vymýváním doplnil celý sloupec. Informace týkající se objednávek viz oddíl *Příslušenství*.**

3. Nastavte počet stripů, které chcete promýt, a to pomocí tlačítka „Rows“ (řady) a následně pomocí tlačítek „+“ nebo „-“. Stiskněte tlačítko „Rows“ (řady), a displeji se opět objeví nápis „Digene Wash Ready“ (promývání připraveno) nebo „P1“.
4. Tlačítkem „Start/Stop“ (zap./vyp.) uveďte zařízení do chodu.
5. Promývačka se šestkrát naplní a vypustí, což potrvá přibližně 10 minut. Potom bude následovat krátká přestávka v programu, takže dejte pozor, abyste destičku nevyndali předčasně. Jakmile automatická promývačka destiček dokončí promývání, na displeji se zobrazí „Digene Wash Ready“ (promývání připraveno) nebo „P1“.
6. Po skončení programu vyjměte mikrodestičku z promývačky. Destička by měla být bílá a v mikrojamkách by neměla zůstat žádná růžová kapalina.

## Metoda manuálního promývání

**Poznámka:** Pokud budou destičky nedostatečně vymyty, může dojít ke zvýšenému pozadí a k falešně pozitivním výsledkům (v důsledku zbytkové alkalické fosfatázy). Pro zajištění efektivního vymytí pomocí promývacího přístroje dohlédněte na to, aby byl promývací přístroj umístěn minimálně 61 cm a maximálně 91 cm nad promývací oblastí a aby během promývání byla destička umístěna mezi 61 a 91 cm pod promývacím přístrojem. Pokud je promývací přístroj v provozu, uzavírací kohoutek je třeba otočit do krajní polohy „open“ (otevřeno), a mimo provoz je třeba jej nastavit do polohy „off“ (vypnuto). Aby byl zajištěn dostatečný tlak, musí promývací přístroj obsahovat alespoň 1,0 l promývacího pufru.

1. Odstraňte detekční činidlo 1 z jamek tak, že na destičku položíte čisté tampóny Kimtowels (nebo ekvivalentní papírové ubrousky bez vláken) a opatrně ji převrátíte. Předtím, než destičku obrátíte, se ujistěte, že papír je v kontaktu s celým povrchem destičky. Destičku nechte odkapat po dobu 1 - 2 minut. Pro blotování použijte tampóny Kimtowels Wipers či papírové ubrousky bez vláken se srovnatelnými vlastnostmi. Použité papírové ubrousky náležitě zlikvidujte, aby v následujících fázích nedošlo ke kontaminaci alkalickou fosfatázou.
2. Destičku šestkrát ručně promyjte pomocí promývacího přístroje. Každá jamka je promyta k přetečení, aby bylo odstraněno detekční činidlo 1 z horního okraje jamek. Promývání začíná u jamky A1 a pokračuje esovitě ve směru doprava a dolů. Po naplnění všech jamek kapalinu slijte do výlevky rychlým pohybem směrem dolů. Druhé promývání začíná u jamky H12 a pokračuje esovitě směrem doleva a nahoru. Tyto 2 promývací fáze ještě dvakrát opakuje tak, aby každá jamka byla vymyta celkem šestkrát.
3. Po promytí destičku blotujte tak, že ji obrátíte dnem vzhůru na čisté tampóny Kimtowels nebo na papírové ubrousky bez vláken (se srovnatelnými vlastnostmi) a silně na ni 3 - 4 krát poklepete. Podložte další papírové ubrousky a blotování opakujte. Destičku ponechte otočenou dnem vzhůru a nechejte ji 5 minut odkapat. Potom ji ještě jednou blotujte.
4. Destička by měla být bílá a v mikrojamkách by neměla zůstat žádná růžová kapalina.

## AMPLIFIKACE SIGNÁLU

### Poznámky:

- Při práci s detekčním činidlem 2 použijte nový pár rukavic bez mastku.
- Do zásobníku pro činidlo nadávkujte  **pouze** takový alikvotní podíl požadovaného činidla, jaký je potřeba k provedení testu, aby nedošlo ke kontaminaci detekčního činidla 2. Viz oddíl *Příprava a uskladnění činidel*. **Detekční činidlo 2 nikdy NEVRACEJTE zpět do původní láhve. Nepoužitý materiál zlikvidujte.**
- Detekční činidlo 2 je třeba přidat najednou (tj. bez přerušení). U všech jamek by měla být zajištěna pokud možno stejná inkubační doba.
- Dbejte na to, abyste se nedotkli stěn mikrojamek a aby nešlo vystříknutí činidla a potřísnění špiček, protože tak by mohlo dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků (viz Nákres 1).

1. Pomocí 8-kanálové pipety opatrně napipetujte (reverzní metodou, která je popsána výše) do každé jamky imobilizační mikrodestičky 75  $\mu$ l detekčního činidla 2. *Všechny mikrojamky by měly zežloutnout.* Podle intenzity barvy zkontrolujte, zda byly náležitě naplněny všechny jamky. Barva činidla by měla mít ve všech jamkách přibližně stejnou intenzitu.
2. Mikrodestičku zakryjte příslušným víkem nebo čistou fólií Parafilm (nebo jinou fólií se srovnatelnými vlastnostmi), a po dobu 15 minut nechejte inkubovat při teplotě 20 - 25 °C. Chraňte před přímým slunečním světlem.
3. Bezprostředně po 15 minutách inkubace (a ne později než po 30 minutách inkubace) odečtěte na mikrodestičkovém luminometru schváleném společností QIAGEN údaje pro mikrodestičku.
4. Příslušný software *digene* pro tento test zajistí vstup relevantních informací o výsledcích pokusu přímo do tabulkového procesoru (spreadsheet).
5. Pokud nebyla použita celá mikrodestička, vyndejte z držáku nepoužité mikrojamky, držák důkladně vypláchněte deionizovanou vodou, vysušte a uschovejte pro příští analýzu.

## KRITÉRIA OVĚŘENÍ KALIBRACE SADY TESTŮ

Ověření kalibrace testů se provádí za účelem zjištění, zda činidla a dodaný materiál kontroly kalibrátoru a kvality správně fungují a umožňují přesné určení hodnoty limitu positivity testu. Ověřovací kritéria jsou vypočítány automaticky a jejich platnost nebo neplatnost se ověřuje pomocí software *digene* pro příslušný test. Test DNA *digene* HC2 CT-ID vyžaduje kalibraci před každým provedením, proto je nutno každé stanovení ověřit pomocí následujících kritérií. Tento ověřovací postup není určen jako náhrada interního testu kvality.

### 1. Negativní kalibrátor

Negativní kalibrátor musí být testován třikrát pro každé stanovení. Průměrná hodnota RLU negativního kalibrátoru musí být  $\geq 10$  a  $\leq 150$ , aby se mohlo pokračovat. Variační koeficient (% CV) pro replikáty negativního kalibrátoru by měl být  $\leq 25$  %. Pokud bude % CV  $> 25$  %, pak software vyřadí replikační test s hodnotou RLU, která je nejdále od průměru a přepočítá průměr a % CV pro zbývající dva replikáty. Přepočítaná hodnota % CV by měla být  $\leq 25$  %; jinak je **ověření kalibrace zařízení neplatné a test je nutno zopakovat pro všechny vzorky odebrané od pacientek. V takovém případě se výsledky testů provedených na vzorcích od pacientek neuvádějí.**

### 2. Pozitivní kalibrátor

Pozitivní kalibrátor musí být testován třikrát pro každé stanovení. Hodnota % CV pro replikáty pozitivního kalibrátoru by měla být  $\leq 20$  %. Pokud bude % CV  $> 20$  %, software vyřadí replikační test s hodnotou RLU, která je nejdále od průměru, a přepočítá průměr a % CV pro zbývající dva replikáty. Přepočítaná hodnota % CV by měla být  $\leq 20$  %; jinak je **ověření kalibrace zařízení neplatné a test je nutno zopakovat pro všechny vzorky odebrané od pacientek. V takovém případě se výsledky testů provedených na vzorcích od pacientek neuvádějí.**

3. Poměr průměrných hodnot PC (pozitivní kalibrátor)/ NC (negativní kalibrátor)  
 Průměrná hodnota replikátů pozitivního kalibrátoru (průměrná hodnota PC) a průměrná hodnota replikátů negativního kalibrátoru (průměrná hodnota NC) se používají pro výpočet poměru (průměrná hodnota PC/ průměrná hodnota NC). Software vypočítá poměr průměrné hodnoty PC k průměrné hodnotě NC. Tento poměr musí splňovat následující kritéria ověření kalibrace zařízení, **jinak nelze interpretovat výsledky dosažené s odebranými vzorky**. Pokud tento poměr bude  $\geq 2,0$  a  $\leq 20$ , pak software postoupí k dalšímu kroku. Pokud tento poměr bude  $< 2,0$  nebo  $> 20$ , **pak bude kalibrace považována za neplatnou a bude nutno ji zopakovat pro všechny vzorky odebrané od pacientek. V takovém případě se výsledky testů provedených na vzorcích od pacientek neuvádějí.**

**Poznámka:** Pro určení reprodukovatelnosti výsledků u kalibrátorů pro test DNA *digene* HC2 CT-ID, byly do tabulky (viz Tab. 3) shrnuty výsledky dosažené pomocí přístroje *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) během interních studií spočívajících v provedení 63 testů pomocí aplikace systému Rapid Capture System (RCS) a 43 testů pomocí manuální metody. Výsledky ukázaly, že průměrná hodnota % CV pro pozitivní kalibrátor u těchto 106 testů byla menší nebo rovna 5,8 % a průměrná hodnota % CV pro negativní kalibrátor testu byla menší nebo rovna 11,2 %. Ačkoliv u manuálních testů bylo dosaženo maximální průměrné hodnoty RLU pro negativní kalibrátor rovnou 88, v průměru aplikace RCS vykazovala mírně zvýšené hodnoty NC RLU v porovnání s manuální metodou. Toto zvýšení prokazatelně nemělo vliv na výsledky testů prováděných kteroukoliv z těchto možných metod. Prahová hodnota průměru RLU pro negativní kalibrátor byla definována jako 250 RLU na základě statistického výpočtu  $\pm 3SD$  průměrné hodnoty RLU pro negativní kalibrátor pozorovanou u systému testu DNA *digene* HC2 CT/GC na základě výsledků rozsáhlého testování, které bylo provedeno během vývoje aplikace RCS. Horní hranice rozsahu  $\pm 3SD$  byla rozšířena o dalších 20 %, aby bylo zajištěno dosažení prahové hodnoty NC RLU, která je běžná v klinické praxi.

Průměrná hodnota RLU NC by běžně měla být  $\leq 150$  a  $CV \leq 25$  %. Každá laboratoř by měla monitorovat kvalitu a kalibrační výkon podle normativního dokumentu C24-2A Národního výboru pro klinické laboratorní normy (NCCLS). Průměrná hodnota RLU získaná pomocí aplikace RCS může občas překročit hodnotu 150, s odpovídajícím poklesem poměru PC/NC, který podle Tab. 3 vede k dosažení průměrné hodnoty při kalibraci 7,11. V tomto případě jsou výsledky přijatelné, pokud hodnota NC RLU zůstane menší nebo rovna 250 a poměr PC/NC bude  $\geq 2,0$  a  $\leq 20$ . Pokud by však NC RLU přesáhla hodnotu 250 nebo by poměr PC/NC poklesl pod 2,0, nebo je větší než 20, pak by zkouška byla neplatná.

**Tab. 3.** Statistický přehled hodnot negativního kalibrátoru a pozitivního kalibrátoru při použití aplikace RCS a manuální metody testování

metoda	počet destiček	vypočítané průměrné hodnoty poměru PC/NC				kontrola kvality testovacích souprav (průměrná hodnota poměru RLU/CO)	
		průměr	střed	min	max	QC CT	QC GC
RCS	63	7,11	6,87	5,24	10,23	3,8	0,24
manuální metoda	43	6,75	5,70	4,60	11,25	3,5	0,16

metoda	kontrola/ kalibrátor	vypočítané průměrné hodnoty RLU				průměr vypočítané hodnoty % CV
		průměr	střed	min	max	
RCS	negativní výsledek	52	50	29	84	9,2
	pozitivní výsledek	362	369	179	505	5,3
manuální metoda	negativní výsledek	41	37	28	88	11,2
	pozitivní výsledek	275	274	135	428	5,8



## VÝPOČET LIMITU POZITIVITY

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

hodnota limitu positivity RLU = průměrná hodnota RLU pozitivního kalibrátoru

příklad výpočtu limitu positivity testu:

	hodnoty RLU NC	hodnoty RLU PC
	97	312
	101	335
	91	307
průměrná hodnota	96	318
% CV	4,9	4,7
průměrná hodnota PC/ průměrná hodnota NC	nevztahuje se (N/A)	3,31

Z toho je limit positivity RLU (průměr PC) = 318

Všechny hodnoty RLU vzorků budou převedeny na poměr k příslušnému limitu positivity (CO) hodnoty RLU programem software *digene* pro příslušný test. Tak například všechny výsledky z celé sady testů vzorků by měly být vyjádřeny pro daný vzorek jako hodnota poměru RLU/CO.

**Poznámka:** Hodnoty poměru RLU/CO a pozitivní/negativní výsledky pro všechny testované vzorky jsou uvedeny ve zprávě o analýze dat programu software *digene* pro příslušný test.

## KONTROLA KVALITY

Kontroly pro ověření kvality se dodávají s testem DNA *digene* HC2 CT-ID. Viz *Uživatelská příručka k příslušnému software digene* analýzy, kde jsou uvedeny pokyny pro vkládání čísel sérií a údaje o datech uplynutí záruční doby kontrol kvality. Tyto kontrolní testy musí být zahrnuty v každé sérii testů a poměr RLU/CO každé kontroly kvality (QC) musí spadat do následujících přijatelných rozmezí, jinak nebudou testy považovány za platné. **Pokud by kontroly kvality nespádaly do tohoto přijatelného rozsahu, pak by musela být série testů považována za neplatnou a musela by se opakovat.** Žádný výsledek neplatného testu u pacientek by se neměl zveřejňovat.

	QC CT	QC GC
min. RLU/CO	1,00	0
max. RLU/CO	20,00	0,9999
max. % CV	20,00	20,00

1. Kontroly kvality, které jsou součástí soupravy, obsahují klonované cílové DNA CT a GC, a jsou složeny z téže sady plazmidů pro každý jednotlivý organizmus (jedna pro CT a jedna pro GC) jako je pozitivní kalibrátor dodávaný spolu s testem DNA *digene* HC2 CT-ID.
2. Tento materiál pro kontrolu kvality není týž jako organizmus CT v matrici vzorku a nebude sloužit jako vhodný kontrolní test kvality pro zpracování transportního média vzorku (*digene* STM) nebo roztoku PreservCyt.
3. Pozitivní kalibrátor se používá pro normalizaci výsledků testů vzorků tak, že stanoví limit positivity RLU testu. S touto soupravou dodávané kontroly kvality se musí použít pro interní kontrolu kvality. Další kontrolní testy kvality mohou být provedeny podle směrnic nebo požadavků místních nebo státních zákonů nebo akreditačních organizací.
4. Za účelem testování účinnosti rozkladu a denaturace vzorků by laboratoře měly pravidelně přidávat >100 000 *C. trachomatis*, elementárních tělísek (Serovar E nebo J, podle doporučení, jsou k dispozici v ATCC, jako ATCC VR348B a VR886) k nové zkumavce STM. Vzorek by měl být inkubován po dobu minimálně jedné hodiny před zahájením testu, jako běžný klinický vzorek. Při správném zpracování

vzorku by mělo být docíleno hodnoty poměru RLU/CO  $\geq 2,50$ . Podobně lze pro tento účel použít také komerční testovací panely vzorků obsahující organismus CT.

5. Přijatelný rozsah hodnot pro negativní kalibrátor a pozitivní kalibrátor byl stanoven pouze pro luminometr schválený společností QIAGEN. Negativní a pozitivní kalibrátory pouze monitorují zásadní selhání funkce činidel a nezaručují přesnost limitu positivity testu.

## INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ KLINICKÝCH VZORKŮ

Podle kritérií testu DNA *digene* HC2 CT-ID DNA:

1. Vzorky s poměrem hodnoty RLU/CO  $\geq 2,50$  jsou považovány za „pozitivní na výskyt DNA *Chlamydia trachomatis*“. Nelze z nich usuzovat na životaschopnost nebo infekčnost organismu *Chlamydia trachomatis*, protože cílová DNA může i při absenci životaschopných organismů přetrvat.
2. Vzorky s poměrem hodnoty RLU/CO  $< 1,00$  neobsahují DNA *Chlamydia trachomatis* DNA nebo obsahují DNA pod hranici rozlišitelnosti daného testu. Tyto vzorky by měly být interpretovány jako vzorky, v nichž „nebyla objevena žádná DNA *Chlamydia trachomatis*“. Negativní výsledek neznamená vyloučení infekce *Chlamydia trachomatis*, protože výsledky závisí na správném odběru vzorku a dostatečném množství DNA pro detekci.
3. Vzorky s poměrem hodnoty RLU/CO  $\geq 1,00$  a  $< 2,50$  jsou považovány za nejednoznačné. Výsledky mohou být považovány za pravděpodobně pozitivní s ohledem na výskyt DNA *Chlamydia trachomatis*. Avšak doporučuje se opakovaný test na novém vzorku od pacientky, nebo se doporučuje další testování alternativním postupem, protože u těchto hodnot poměru RLU/CO není pozitivita jednoznačná.\*
4. Pokud je pravděpodobnost výskytu infekce *Chlamydia trachomatis* nejistá nebo sporná, doporučuje se potvrdit pozitivní výsledek jinou metodou. Analytické studie tohoto testu ukázaly na existenci předpokladu zkřížené reaktivity na určité jiné řetězce DNA, což by mohlo vést k falešnému pozitivnímu výsledku testu. Ačkoliv frekvence výskytu pBR322 a jiných řetězců DNA ve vzorcích odebraných z pohlavních orgánů nebyla plně vyhodnocena, u populace 1 818 pacientů, u nichž bylo 106 CT pozitivních vzorků testováno na přítomnost pBR322, nebyla pozorována zkřížená reaktivita. Toto je dostatečně reprezentativní vzorek populace a naznačuje, že tato zjištění nemusejí odrážet frekvenci výskytu pBR322 v celé testované populaci. Další informace viz Analytická specifická.

\* Během klinického hodnocení testu DNA *digene* HC2 CT-ID DNA byla ověřena pozitivita 7 ze 14 takto sporných výsledků pomocí testování kultury, DFA nebo reakce polymerázového řetězce (PCR); zbývajících 7 výsledků bylo zjevně falešně pozitivních. Avšak těchto 7 falešně pozitivních vzorků spadalo mezi pouze 11 vzorků, které nebyly shledány negativními testem DNA *digene* HC2 CT-ID DNA, z celkového počtu 1 643 vzorků, a u kterých bylo ověřeno, že neobsahují CT v kultuře (99,3 % správně identifikovaných ve vztahu ke kultuře nebo DFA, uvažujeme-li výsledky testů PCR). V následném hodnocení mělo těchto 7 na počátku pozitivních vzorků počáteční poměr RLU/CO v rozsahu 1,00-2,50 a 3 z nich byly negativní ve všech ostatních provedených testech (všechny 3 tyto vzorky byly negativní ve dvakrát opakovaném testu DNA *digene* HC2 CT-ID). Zbývajících 4 vzorky byly všechny pozitivní co do testů kultura/DFA/PCR a oba opakované testy DNA *digene* HC2 CT-ID byly  $\geq 1,00$  co do poměru RLU/CO.

## OMEZENÍ POSTUPU

Další omezení tohoto postupu jsou uvedena v *Uživatelské příručce k systému Rapid Capture System*. Tato omezení se týkají použití tohoto systému pro testování velkých objemů vzorků.

- Pouze pro diagnostiku *in vitro*.
- Testovací postup testu DNA *digene* HC2 CT-ID, kontrola kvality a interpretace výsledků musí být přesně dodržovány, aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků.
- Test DNA *digene* HC2 CT-ID lze použít pouze pro cervikální vzorky odebrané pomocí zařízení pro odběr vzorků *digene* HC2 DNA Collection Device a vložené do STM, nebo pro cervikální vzorky odebrané pomocí zařízení na odběr vzorků *digene* Female Swab Specimen Collection Kit a vložené do STM, a nebo pro cervikální vzorky odebrané pomocí nástroje typu košťátka a vložené do roztoku PreservCyt.
- Výsledky této sady testů by měly být interpretovány pouze ve spojení s informacemi získanými z klinického hodnocení pacientky a dalších postupů.

- Test DNA *digene* HC2 CT-ID poskytuje kvalitativní výsledky. Nebyla prokázána korelace numerické hodnoty (poměru) při překročení limitu pozitivity s množstvím DNA CT přítomným ve vzorku pacientky.
- Negativní výsledek nevylučuje možnost infekce *Chlamydia trachomatis*, protože její zjištění závisí na počtu organismů přítomných ve vzorku a může být ovlivněno metodou odběru vzorku, individuálními faktory pacientky, stádiem infekce nebo kmenem *Chlamydia trachomatis*.
- Stejně jako u všech ostatních metod, které nejsou založeny na testu kultury, pozitivní vzorek nelze interpretovat jako vzorek obsahující životaschopné organismy *Chlamydia trachomatis*.
- Test DNA *digene* HC2 CT-ID není určen ke stanovení úspěšnosti terapie.
- Test DNA *digene* HC2 CT-ID DNA byl ověřen pouze pro použití s automatickou promývačkou destiček I při nastavení parametrů určených v návodu k testu. Tato validační studie byla provedena přímo výrobcem a podpůrná data jsou k dispozici ve firmě QIAGEN. Jiné promývačky destiček a jiná nastavení promývačky nejsou přijatelná k použití u testu DNA *digene* HC2 CT-ID.
- Za účelem snížení variability výsledků na minimum (výsledky dosažené testem DNA *digene* HC2 CT-ID), je nutná odpovídající technická odbornost laboratorního personálu provádějícího tyto testy. Každá laboratoř musí také prověřit technickou odbornost personálu ve vztahu k provádění tohoto testu. Za tímto účelem se doporučuje periodické využití komerčních testovacích panelů vzorků obsahujících organismus CT či DNA CT ve shodě s postupy pro zajištění kvality.

## OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

### ČETNOST VÝSKYTU

Četnost výskytu pozitivních testů na *Chlamydia trachomatis* je různá pro různé podskupiny pacientů rozdělené podle věku, pohlaví a rizikových faktorů. Počet pozitivních testů *Chlamydia trachomatis*, ve skupině testované v rámci klinické studie populace testem DNA *digene* HC2 CT-ID, dosahoval 3,3 % až 14,6 %. Četnost výskytu byla vypočítána za předpokladu, že 14 vzorků s nejednoznačným výsledkem bylo považováno za pozitivní s ohledem na DNA CT (Tab. 4). U sedmi z těchto 14 vzorků byla pozitivita prokázána pomocí testu CT kultury/DFA nebo CT PCR.

**Tab. 4.** Četnost výskytu pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 CT-ID podle testovacích pracovišť.

testovací pracoviště	počet pozitivních/počet testovaných vzorků	% pozitivních
1	67/460	14,6
2	42/307	13,7
3	38/308	12,3
4	23/414	5,6
5	11/329	3,3
celkem	181/1818	10,0

### PREDIKTIVNÍ HODNOTA POZITIVNÍCH A NEGATIVNÍCH VÝSLEDKŮ

Hypotetické prediktivní hodnoty pozitivních a negativních výsledků (PPV a NPV) pro různé četnosti výskytu pozitivních výsledků za použití testu DNA *digene* HC2 CT-ID byly vypočítány na základě celkové citlivosti a specifity ve vztahu k testu CT kultury/DFA, určené individuálně pro vzorky odebrané nástrojem *digene* HC2 DNA Collection Device (cervikální kartáček) a pro vzorky odebrané pomocí tamponu *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (tampon Dacron). Tab. 5 obsahuje hypotetické hodnoty PPV a NPV pro vzorky odebrané kartáčkem (celková citlivost 97,71 % a specifita 98,15 %) a Tab. 6 obsahuje hypotetické hodnoty PPV a NPV pro vzorky odebrané tamponem (celková citlivost 87,50 % a specifita 98,36 %).

**Tab. 5.** Test DNA *digene* HC2 CT-ID a jeho hypotetické prediktivní hodnoty pro různé četnosti výskytu pozitivních výsledků (kartáček).

počet pozitivních výsledků (v %)	citlivost (v %)	specifita (v %)	PPV (v %)	NPV (v %)
5	97,7	98,2	73,5	99,9
10	97,7	98,2	85,4	99,7
15	97,7	98,2	90,3	96,6
20	97,7	98,2	93,0	99,4

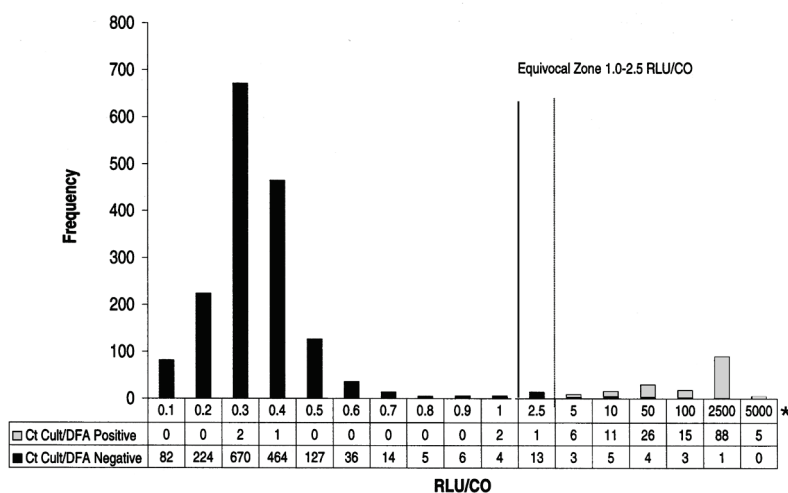
**Tab. 6.** Test *digene* HC2 CT-ID a jeho hypotetické prediktivní hodnoty pro různé četnosti výskytu pozitivních výsledků (tampon).

počet pozitivních výsledků (v %)	citlivost (v %)	specifita (v %)	PPV (v %)	NPV (v %)
5	87,5	98,4	73,4	99,4
10	87,5	98,4	83,2	98,9
15	87,5	98,4	87,2	98,4
20	87,5	98,4	89,3	97,9

### FREKVENČNÍ DISTRIBUCE: VÝSLEDKY RLU/CO PRO TEST DNA *digene* HC2 CT-ID

Distribuce poměrů RLU/CO u testu DNA *digene* HC2 CT-ID pozorovaná během multicentrické klinické studie je uvedena níže (Obr. 1). Tato data zahrnují vzorky, u kterých byl proveden test DNA *digene* HC2 CT-ID a současně byly k dispozici výsledky testu CT kultury/DFA (n=1818). Interpretace výsledků byla provedena podle následujících kritérií: Vzorky s hodnotami poměru RLU/CO < 1,00 byly považovány za negativní. Vzorky s hodnotami poměru RLU/CO ≥ 2,50 byly považovány za pozitivní. Vzorky s hodnotami poměru RLU/limitu pozitivity ≥ 1,00 a < 2,50 byly považovány za nejednoznačné.

**Obr. 1.** Frekvenční distribuce poměru RLU/CO pro výsledky testu DNA *digene* HC2 CT-ID.



Jasný rozdíl mezi poměry RLU/CO lze pozorovat mezi pozitivními a negativními výsledky testu DNA *digene* HC2 CT-ID. 99 % (1 620/1 637) negativních výsledků testu DNA *digene* HC2 CT-ID mělo hodnotu poměru RLU/CO mezi 0 a 0,7. Celkem < 1 % (14/1 818) výsledků spadalo do zóny nejednoznačnosti, u 7,1 % (1/14) byla prokázána pozitivita testem CT kultury/DFA a u dalších šesti (46 %) byla prokázána pozitivita pomocí CT PCR. 85 % (142/167) z pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 CT-ID mělo hodnotu poměru RLU/CO v rámci rozsahu 10 až 5 000.

## CHARAKTERISTIKA VÝKONU

### VÝSLEDKY KLINICKÝCH TESTŮ PODLE VZORKŮ

Charakteristika výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID byla určena porovnáním výsledků sady testů s výsledky testů kultury Chlamydia a DFA. Bylo odebráno a později testováno 1 818 vzorků od pacientů na 5 různých pracovištích, včetně STD, Kliniky pro plánované rodičovství a Gynekologicko-porodnické kliniky. Testy DFA byly provedeny na sedimentu transportního média CT kultury po centrifugaci pro vzorky, které byly pozitivní v testu DNA *digene* HC2 CT-ID a negativní v testu kultury. Pak byly provedeny testy PCR na vzorcích s pozitivním výsledkem testu DNA *digene* HC2 CT-ID, negativním výsledkem testu kultury a negativním výsledkem DFA. Výsledky testu DNA *digene* HC2 CT-ID NEBYLY vyřešeny pomocí výsledků testu PCR a proto PCR nemělo vliv na výpočet charakteristiky výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Pro generování dat pro charakteristiku výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID byly použity dva různé modely luminometru (Dynex MLX a ML2200). Výsledky klinické studie vzorků odebraných pomocí *digene* HC2 DNA Collection Device (cervikální kartáček) jsou uvedeny v Tab. 7 a vzorky odebrané pomocí tamponu *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (tampon ) jsou uvedeny v Tab. 8.

**Tab. 7.** Test DNA *digene* HC2 CT-ID vs. výsledky testu CT kultury/DFA pro vzorky odebrané kartáčkem.

Výpočet charakteristiky výkonu pomocí hodnot poměru RLU/CO hranice pozitivity 1,0 jsou uvedeny níže. Hodnoty v závorkách představují výkon uvažující poměr RLU/CO limitu pozitivity 2,5. Intervaly spolehlivosti 95% zahrnují oba rozsahy, kdy se odhady pro každou hodnotu poměru RLU/CO limitu pozitivity lišily.

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

1 Ve dvou případech byl test DFA požadován, avšak nebyl neproveden.

2 Toto jsou pouze informativní údaje; výsledky nebyly řešeny pomocí testu PCR.

3 Jeden negativní vzorek DNA *digene* HC2 CT-ID s negativním testem kultury byl zbytečně testován testem DFA s pozitivním výsledkem. Tento výsledek byl zařazen do výpočtu výkonu jako falešně negativní výsledek testu DNA *digene* HC2 CT-ID.

4 U jednoho vzorku nebyl proveden test PCR.

5 V jednom případě byl požadován test DFA, ale nebyl proveden.

N/A = Nevztahuje se.

**Tab. 8.** Test DNA *digene* HC2 CT-ID vs. výsledky testu CT kultury/DFA pro vzorky odebrané tamponem.

Výpočet charakteristiky výkonu pomocí hodnot poměru RLU/CO limitu pozitivity 1,0 jsou uvedeny níže. Hodnoty v závorkách představují výkon uvažující poměr RLU/CO limitu pozitivity 2,5. Intervaly spolehlivosti 95 % zahrnují oba rozsahy, kdy se odhady pro každou hodnotu poměru RLU/CO limitu pozitivity lišily.

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

1 Do této kategorie byly zařazeny všechny vzorky, kde byl požadován text DFA, ale nebyl proveden.

2 Toto jsou pouze informativní údaje; výsledky nebyly řešeny pomocí testu PCR.

3 V jednom případě nebyl proveden test PCR.

4 Ve dvou případech nebyl proveden test PCR.

5 Ve třech případech nebyl proveden test PCR.

NA = Nevztahuje se

Charakteristika výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID DNA byla vypočítána pro limit pozitivy jak 1,0 a též 2,5 bez ohledu na předpokládané pozitivní vzorky spadající do nejednoznačného rozsahu, jak je popsáno v „Interpretaci výsledků“ tohoto návodu k použití. Proto se výkon testu DNA *digene* HC2 CT-ID podle měření ve vaší laboratoři může od našich hodnot lišit, v závislosti na distribuci hodnot spadajících do nejednoznačné zóny. Můžete provést opakování testů kontrol vzorků, u kterých se předpokládá pozitivní výsledek, ale které spadají do zóny nejednoznačných výsledků, jak se doporučuje v části Interpretace výsledků tohoto návodu k použití (kritérium 3) Pro informaci - do této skupiny spadalo méně než 0,8 % vzorků (14 z 1 818) testovaných v rámci multicentrické klinické studie používané ke stanovení výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Viz Frekvenční distribuce výsledků poměru RLU/CO v oddíle Očekávané výsledky, které jsou součástí tohoto návodu k použití.

Neexistuje dostatek údajů pro odhad ekvivalentní citlivosti a pozitivní prediktivní hodnoty testu DNA *digene* HC2 CT-ID využívajícího odběrové tampony *digene* Female Swab Specimen Collection Kit v porovnání se vzorky odebranými nástrojem *digene* HC2 DNA Collection Device. Protože použití kartáčku soupravy *digene* HC2 DNA Collection Device je kontraindikováno pro odběr vzorků u těhotných žen, schopnost testu zjistit přítomnost DNA CT může být omezena v této skupině pacientek nebo ve skupině používající pro odběr vzorků tampony *digene* Female Swab Specimen Collection Kit.

Klinická citlivost a specifita testu DNA *digene* HC2 CT-ID pro pacienty s klinicky aktivní infekcí, která je přenosná na partnera nebo může způsobit následky spojené s Chlamydia, nebyla určena v porovnání s komerčně dostupnou metodou amplifikace kyseliny nukleové (NAA) sloužící k určení přítomnosti DNA CT. V klinických studiích modifikovaná sada komerčních testů NAA prokázala pozitivitu u 12 vzorků pozitivních na základě testu DNA *digene* HC2 CT-ID a u 6 vzorků spadajících do zóny pravděpodobné positivity získaných od 24 pacientů s negativními výsledky testu kultury CT/DFA, avšak 1 637 vzorků s negativním výsledkem testu DNA *digene* HC2 CT-ID z této studie a 5 vzorků s pozitivním výsledkem testu DNA *digene* HC2 CT-ID a negativním výsledkem testu CT kultury/DFA nebylo pomocí této modifikované metody NAA testováno. Odhadovaná citlivost je založena na počtu pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 CT-ID zjištěných u pacientů, jejichž testy kultury nebo DFA zjišťující *Chlamydia trachomatis* byly pozitivní. Proto lze citlivost testu DNA *digene* HC2 CT-ID pouze dedukovat ve vztahu k pozitivitě testu kultury/DFA, jehož citlivost může být asi 60 - 85 %. Navíc bylo provedeno několik studií různých nezávislých výzkumných skupin zkoumajících výkon testu DNA *digene* HC2 CT-ID v porovnání se komerčními a výzkumnými testy NAA.<sup>22</sup>

## REPRODUKOVATELNOST

V rámci multicentrické klinické studie byl proveden test pro určení reprodukovatelnosti pro jednotlivé sady testů, pro jednotlivé dny, pracoviště, a celkové reprodukovatelnosti testu DNA *digene* HC2 CT-ID pomocí panelu tvořeného cílovými DNA *Chlamydia trachomatis* a pozitivními a negativními klinickými vzorky testu DNA *digene* HC2 CT-ID.

Desetičlenný panel maskovaných, denaturovaných klinických a neklinických vzorků tvořených 8-mi pozitivními a dvěma negativními vzorky byl testován šesti opakovanými testy, dvěma denně po dobu tří dnů, na všech čtyřech pracovištích (3 externí pracoviště a pracoviště QIAGEN). Každé pracoviště vygenerovalo 36 datových údajů po každý testovaný vzorek. Všechny vzorky byly před testováním denaturovány a uloženy v mrazícím boxu. 99,9 % shoda byla pozorována u 1 152 očekávaných pozitivních výsledků (1 151 z 1 152) a 99,6 % shoda byla pozorována u 288 očekávaných negativních výsledků (287 z 288). Celková shoda byla 99,9 % (1 438 z 1 440), s intervalem spolehlivosti 95 % (99,5-99,9) a hodnotou kappa = 0,996. Nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi jednotlivými sadami, dny nebo pracovišti, proto byly údaje ze všech sad spojeny a jsou prezentovány v níže uvedené Tab. 9.



**Tab. 9.** Reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 CT-ID v multicentrické studii.

číslo vzorku	pracoviště 1		pracoviště 2		pracoviště 3		pracoviště 4		celkem		
	̄RLU/ CO	% shody	̄RLU/ CO	% shody	̄RLU/ CO	% shody	̄RLU/ CO	% shody	̄RLU/ CO	pozorování/ očekávání	% shody
1	3,7	100	3,2	100	4,1	100	4,2	100	3,8	144/144	100
2	6,7	100	6,0	100	7,4	100	9,8	100	7,5	144/144	100
3	34,2	100	29,3	100	38,6	100	42,8	100	36,2	144/144	100
4	61,9	100	55,0	100	69,4	100	79,1	100	66,4	144/144	100
5	2,7	100	2,5	100	3,2	100	3,4	100	3,0	144/144	100
6	6,4	100	5,4	100	7,4	100	7,4	100	6,6	144/144	100
7	13,9	100	12,0	100	16,0	100	16,3	100	14,5	144/144	100
8	17,3	100	14,8	100	19,2	97,2	23,2	100	18,6	143/144	99,3
9	0,3	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,3	100	0,3	97,2	0,3	100	0,2	100	0,3	143/144	99,3
CELKEM										1438/1440	99,9

Další studie reprodukovatelnosti a účinnosti, s celým organismem *Chlamydia trachomatis* (CT) přidaným do matrice nepravého klinického vzorku epitelových buněk, byla provedena na třech externích pracovištích. Testované vzorky obsahovaly reprezentanty vzorků, které byly jednak negativní, jednak s nízkou pozitivitou (na hranici detekce nebo blízko ní) a střední pozitivitou s dvěma CT serovary, se smíšenou infekcí *Neisseria gonorrhoeae* (GC) a vzorky obsahující krev. U dvanácti vzorků se předpokládala pozitivita a třináct vzorků mělo být negativních. Procentuální shoda mezi pozorovanými a očekávanými výsledky testu DNA *digene* HC2 CT-ID na třech nezávislých testovacích pracovištích a pro všechna pracoviště dohromady je uvedena v Tab. 10. Citlivost, specifická, shoda a hodnoty kappa pro každé pracoviště jsou uvedeny v Tab. 11.

**Tab. 10.** Výsledky studie reprodukovatelnosti testu DNA *digene* HC2 CT-ID.

prac.	n	pozorované vs. očekávané výsledky			% shody		
		pozitivní			všechny vzorky		
		negativní	nejednoznačné	pozitivní (≥2,5)	@1,0 limit*	@2,5 limit	@2,5 limit
1	25	13	7	5	25/25 (100%)	18/25 (72%)	18/18 (100%)
2	25	13	3	9	25/25 (100%)	22/25 (88%)	22/22 (100%)
3	25	13	2	10	25/25 (100%)	23/25 (92%)	23/23 (100%)
celkem	75	39	12	24	75/75 (100%)	63/75 (84%)	63/63 (100%)

\*Týchž hodnot bylo dosaženo pro interpretaci výsledků jako „předpokládaná pozitivita“ při limitu 2,5. Pozn. - prac. = pracoviště

**Tab. 11.** Výsledky testu DNA *digene* HC2 CT-ID, přehledná statistika (limit 1,0).

statistické údaje	pracoviště 1	pracoviště 2	pracoviště 3	pracoviště 4
citlivost	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
specifická	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
shoda	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (95,20%-100%)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

\*Čísla v závorkách označují intervaly spolehlivosti 95%.

V rutinním testu účinnosti všech 12 nejednoznačných vzorků uvedených v Tab. 11, které obsahovaly nízké koncentrace organismu CT (~5x10<sup>4</sup> organismů/ml), jsou výsledky interpretovány, podle oddílu Interpretace výsledků tohoto návodu k použití, jako vzorky s předpokládanou pozitivitou. Proto sada testů prokázala schopnost objevit DNA CT ve vzorcích s koncentrací organismů na hranici detekce nebo blízko této hranice. Další důkaz vhodnosti tohoto testu byl pozorován při testování panelu vzorků, který obsahoval vzorky s nízkým počtem organismů v rozsahu předpokládané detekce amplifikovanými testy na nukleovou kyselinu. Testování na třech externích pracovištích a v QIAGEN prokázalo 100 % pozitivitu (nebo předpokládanou pozitivitu) výsledků vzorků panelu, které obsahovaly organismus CT. Ve dvou případech spadaly hodnoty poměru RLU/CO do nejednoznačné zóny (viz Tab. 12 níže).

**Tab. 12.** Výsledky pro panel vzorků obsahujících CT a GC.

prac.	označ. vzorku	výsledky testu DNA <i>digene</i> HC2 CT/GC		očekávaný výsledek
		RLU/CO	interpretace	
1	1	3,63	<b>POZ</b>	<b>POZ</b>
	2	0,14	NEG	NEG
	3	0,17	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,21	NEG	NEG
2	1	1,79	<b>NEJEDN.*</b>	<b>POZ</b>
	2	0,11	NEG	NEG
	3	0,10	NEG	NEG
	4	0,09	NEG	NEG
	5	0,14	NEG	NEG
3	1	3,24	<b>POZ</b>	<b>POZ</b>
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,14	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,13	NEG	NEG
4	1	1,87	<b>NEJEDN.*</b>	<b>POZ</b>
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,53	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,15	NEG	NEG

\*Tyto vzorky byly interpretovány jako vzorky s předpokládanou pozitivitou. Pozn. – prac. = pracoviště.

## PŘESNOST

Studie přesnosti byla provedena na třech pracovištích s cílem určit přesnost pro jednotlivé sady a celkovou přesnost testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Studie byla realizována pomocí panelu pozitivních a negativních maskovaných simulovaných klinických STM vzorků. Navíc byla na tomtéž panelu pozorována intra- a inter-nástrojová přesnost při použití dvou samostatných luminometrů. Dva luminometrické modely zahrnovaly přístroj DML 2000, který se doporučuje používat v kombinaci s testem DNA *digene* HC2 CT-ID, a luminometr MLX; který byl jedním z luminometrických modelů používaných během klinického hodnocení, které již nejsou k dispozici. Během počátečního testování vykázala dvě z pracovišť přijatelné výsledky. Jedno pracoviště však mělo potíže, které by bylo možno připsat technice testování této sady, pravděpodobně způsobené technickou chybou díky nevhodnému nebo neodpovídajícímu vyškolení obsluhy. Technik, který na tomto pracovišti testování prováděl a znal správnou techniku tohoto testu, již test DNA *digene* HC2 CT-ID neprováděl po více než 6 měsících.

Tab. 13 ukazuje výkon testu DNA *digene* HC2 CT-ID, včetně pracoviště, které mělo technické problémy. Technik dostal poučení o správné technice testu a testování bylo opakováno. Údaje o přesnosti se podstatně zlepšily a jsou uvedeny v Tab. 14.

**Tab. 13.** V rámci instrumentu, mezi instrumenty, v rámci sady, celkové odhady přesnosti pro poměr RLU/CO pro jednotlivé vzorky před přeškolením technika.

vzorek panelu	č.	průměr RLU/CO	v rámci instrumentu		mezi instrumenty		v rámci sady		celkem	
			standardní odchylka (SD)	(% CV)	(SD)	(% CV)	(SD)	(% CV)	(SD)	(% CV)
1	54	17,6152	2,7418	15,5647	0,6011	3,4123	45,8628	260,3593	53,8172	305,5160
2	54	6,9076	0,8102	11,7297	0,2198	3,1819	17,9588	259,9861	20,9987	303,9941
3	54	3,0293	0,0969	3,1981	0,0930	3,0685	0,6870	22,6801	0,6739	22,2459
4	54	5,4674	0,3348	6,1231	0,1485	2,7156	10,0455	183,7341	11,4415	209,2673
5	54	13,6956	0,4045	2,9536	0,5280	3,8555	1,7475	12,7599	1,8065	13,1904
6	54	16,9526	0,7011	4,1359	0,6187	3,6497	22,1095	130,4199	25,9379	153,0027

Výsledky testu přesnosti pro všechna pracoviště dohromady ukazuje Tab. 14. Ačkoliv to z tabulky není patrné, byly kvalitativní výsledky 100 % (54 z 54) (93,4 %-100 % 95 % CI) ve shodě s očekávanými výsledky na všech třech pracovištích po přeškolení technika provádějícího test DNA *digene* HC2 CT-ID.

**Tab. 14.** V rámci instrumentu, mezi instrumenty, v rámci sady, celkové odhady přesnosti pro poměr RLU/CO pro jednotlivé vzorky po přeškolení technika.

vzorek panelu	č.	průměr RLU/CO	v rámci instrumentu		mezi instrumenty		v rámci sady		celkem	
			standardní odchylka (SD)	(% CV)	(SD)	(% CV)	(SD)	(% CV)	(SD)	(% CV)
1	54	0,1441	0,0224	15,5507	0,0000	0,0000	0,0603	41,8765	0,0629	43,6874
2	54	0,1256	0,0212	16,8771	0,0000	0,0000	0,0210	16,7125	0,0234	18,6069
3	54	2,7720	0,0996	3,5933	0,0888	3,2046	0,4732	17,0719	0,4749	17,1332
4	54	1,8643	0,0647	3,4683	0,0635	3,4051	0,4015	21,5358	0,3956	21,2227
5	54	13,2050	0,4129	3,1266	0,5281	3,9989	1,7018	12,8873	1,6604	12,5743
6	54	7,8674	0,2725	3,4633	0,3946	5,0157	1,5361	19,5250	1,5118	19,2160

U vzorků panelu č. 3 a 4, které oba obsahovaly nízké koncentrace organismu CT, byly pozorované hodnoty poměru RLU/CO uvnitř nebo poblíž zóny nejednoznačnosti 1,0 - 2,5.

Pro účely analýzy těchto dat byly všechny hodnoty poměru RLU/CO - spadající do nejednoznačného rozsahu nebo překračující hodnotu 2,5 - interpretovány jako pozitivní.

V QIAGEN byla pak provedena ještě další studie přesnosti za účelem určení celkové přesnosti testu DNA *digene* HC2 CT-ID pomocí přístroje DML 2000. Byl připraven panel se šesti vzorky pomocí matrice simulovaných klinických vzorků, obsahujících epitelové buňky s nasazenou kulturou, suspendované ve transportním médiu vzorku (STM) a skládající se ze dvou negativních vzorků, dvou pozitivních vzorků s nízkou koncentrací sledovaného organismu, a dvou středně pozitivních vzorků, všech získaných odběrem kartáčkem. Každý panel byl testován třemi opakovanými testy, dva panely na destičku, dvěma techniky po dobu 5 dní. Pro každou destičku byl použit čerstvě denaturovaný panel. Celkové výsledky testu přesnosti pro test DNA *digene* HC2 CT-ID sestavené na základě všech pěti testovacích dnů jsou uvedeny v Tab. 15. Ačkoliv to z tabulky není patrné, byly kvalitativní výsledky ve 100 % shodě s očekávanými výsledky (120/120; 97,0 - 100 % 95 % CI), při použití hodnoty RLU/CO 1,0.

**Tab. 15.** Celková přesnost testu DNA *digene* HC2 CT-ID.

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

#### PŘESNOST U VZORKŮ ROZTOKU PRESERV CYT

Byla provedena multicentrická studie s cílem charakterizovat přesnost s ohledem na jednotlivá laboratorní pracoviště a jednotlivé dny pro testování sad vzorků roztoku PreservCyt. Dvě pracoviště (kromě vlastního pracoviště QIAGEN) testovala dvanáctičlenný panel simulovaných vzorků od pacientů, odebraných v roztoku PreservCyt. Každá laboratoř testovala celý panel třikrát, dvakrát denně během tří dnů, za použití činidel téže výrobní série. Dvanáctičlenný panel simulovaných vzorků roztoku PreservCyt byl připraven s proměnným množstvím organismů CT (Serovar D; ATCC VR885) tak, aby byl vytvořen panel prezentovaný v Tab. 16.

**Tab. 16.** Složení panelu pro určení přesnosti.

hromadný vzorek	členové panelu *	očekávané výsledky testu DNA <i>digene</i> HC2 CT/GC	přibližné hodnoty RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	nízký CT- pozitivní	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	střední CT-pozitivní	~10
C	5N, 11N	negativní	~0,20
D	6N, 12N	vysoký negativní	~0,70

\*Identifikace vzorku označuje známý statut *C. trachomatis* [pozitivní (P) nebo negativní (N)]

V souladu s pokyny instrukce EP-12A , příslušející NCCLS, pro hodnocení kvalitativních diagnostických testů *in vitro*, byly vzorky členů panelu 6N a 12N, které byly oba odvozeny z hromadného vzorku „D“, zahrnuty proto, aby byla zhodnocena přesnost bezprostředně pod negativní hodnotou limitu positivity RLU/CO 1,0.

Pro účely analýzy údajů byla kombinována data pro členy panelu, odvozenými z téhož hromadného vzorku.

**Tab. 17.** Kvalitativní výsledky postupu testu DNA *digene* HC2 CT-ID DNA podle hromadného vzorku.

pro zásobu hromadného vzorku	CT pozitivní n (%)	nejednoznačný n (%)	negativní n (%)	celkem
negativní (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
vysoký negativní (6N, 12N)	0 (0,0)	12 (11,2)	90 (88,8)	108
celkový negativní	0 (0,0)	12 (5,6)	204 (94,4)	216
CT nízký pozitivní (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
CT střední pozitivní (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
celkový pozitivní	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Tab. 18.** Standardní odchylky (SD) a variační koeficienty (CV) pro přesnost podle laboratoře a dne: test DNA *digene* HC2 CT-ID v PreservCyt

vzorek	N	průměr RLU/CO	SD v rámci testu	SD mezi testy	SD mezi dny	SD mezi prac.	celk. SD	% CV
negativní (5N, 11N)	108	0,215	0,038	0,020	0,010	0,037	0,058	27,0
vysoký negativní (6N, 12N)	108	0,648	0,304	0,210	0*	0	0,370	57,1
CT střední pozitivní (2P,3P,8P,9P)	216	12,64	1,444	0,733	1,013	1,070	2,189	17,3
CT nízký pozitivní (1P, 2P, 7P, 8P)	216	4,637	0,490	0,485	0,285	0,288	0,800	17,3

\*Negativní součásti odchylky byly nastaveny na nulu. Pozn. – prac. = pracoviště.

## ANALYTICKÁ CITLIVOST

Analytická citlivost (limity detekce) testu DNA *digene* HC2 CT-ID byla určena přímým testováním roztoků neklinického panelu vzorků tvořeného 15 serovary *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia psittaci* a *Chlamydia pneumoniae*. Čtyřbodová série ředění roztoků pro každý serovar byla testována testem DNA *digene* HC2 CT-ID za účelem určení odhadované zátěže organismu pro nejvyšší zředění roztoku, které ještě dokáže ukázat pozitivní výsledek v testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Každá koncentrace každého cílového typu vzorku byla testována třikrát podle návodu k použití pro test DNA *digene* HC2 CT-ID.

Limity detekce serovaru *Chlamydia* jsou uvedeny v Tab. 19. Uvedený limit detekovatelnosti představuje roztok každého serovaru, který byl určen jako spadající do zóny nejednoznačnosti nebo nad rozsah 1,0-2,5 RLU/CO. Limit detekovatelnosti se pohyboval mezi 1 000 a 500 000 EB/ml podle testovaného serovaru. Rozlišení 50 až 25 000 EB v každém testu se rovná 1 000 až 500 000 EB v původním vzorku (na ml STM).

Nejběžnější serovary CT ve Spojených státech u asymptomatických žen mladších 30 let jsou serovary E, I a D (v sestupném pořadí).<sup>23</sup> Pro ženy ve věku 17 – 68 let, které navštěvovaly gynekologickou kliniku ve vnitřním městě, byly nejběžnějšími zjištěnými serovary F, E a G (v sestupném pořadí). Je důležité si uvědomit, že pro všechny nejběžnější se vyskytující serovary CT, s výjimkou serovaru E, byl spodní limit detekce testu DNA *digene* HC2 CT-ID roven 50 EB/sada; serovar E má vyšší limit detekce (2 500 EB/sada), jak bylo již popsáno. Autoři této práce navrhuji existenci spojení některých serovarů se symptomatickou (např. serovar G) a jiných s asymptomatickou (např. serovary D a I) infekcí. Pro tyto serovary ukázal test DNA *digene* HC2 CT-ID opět nižší limit detekce v hodnotě 50 EB/sada.

**Tab. 19.** Přehled limitů detekovatelnosti pro citlivost u serovarů CT.

serovar	detekovatelná koncentrace	
	EB/ml	EB/test
A	1 000 - >10 000	50 - >500
B	10 000 – 100 000	500 – 5 000
Ba	5 000 – 50 000	250 – 2 500
C	10 000	500
D	1 000 – 10 000	50 - 500
E	50 000	2 500
F	1 000	50
G	1 000 – 10 000	50 - 500
H	10 000 – 100 000	500 – 5 000
I	1 000 – 10 000	50 - 500
J	5 000 – 500 000	2 500 – 25 000
K	20 000	1 000
L1	2 000	100
L2	2 000 – 20 000	100 – 1 000
L3	10 000	500

## DALŠÍ OKOLNOSTI S OHLEDEM NA VZORKY ROZTOKU PRESERVICYT

Studie limitů detekce (popsané v předchozím oddíle pro STM) nebyly opakovány při použití vzorků roztoku PreservCyt, protože se očekává, že analytická citlivost zkoušky nebude závislá na typu vzorku (buď STM nebo PreservCyt); zvláště proto, že vzorky roztoku PreservCyt jsou podrobeny konverznímu postupu (podrobnější informace získáte v Návodu k použití *digene* HC2 Sample Conversion Kit [souprava pro konverzi vzorků firmy QIAGEN]). Tento postup má za následek podobné složení vzorků roztoku PreservCyt jako vzorky STM před použitím testu DNA *digene* HC2 CT-ID.

Protože jsou však vzorky roztoku PreservCyt podrobeny centrifugačnímu kroku během konverzní procedury, bylo třeba zhodnotit možný vliv centrifugace na analytickou citlivost testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Ke zjištění možného vlivu centrifugace na analytickou citlivost bylo připraveno 88 párů vzorků *C. trachomatis* DNA-negativních v STM a v roztoku PreservCyt, obsahující stejná množství organismů CT (serovar G). Byly testovány párové vzorky a analytická citlivost byla stanovena porovnáním získaných průměrných hodnot RLU/CO [(PreservCyt:STM) x 100].

Párový-T test údajů uvedených v Tab. 20 ukazuje, že analytická citlivost testu DNA *digene* HC2 CT-ID není statisticky odlišná ( $p = 0,33$ ), zda-li se testování cervikálních vzorků provádí v roztoku PreservCyt nebo STM.

**Tab. 20.** Srovnání analytické citlivosti – test DNA *digene* HC2 CT-ID – párové vzorky roztoku PreservCyt (PC) a STM.

	test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID RLU/CO	
	STM	PreservCyt
<b>počet vzorků</b>	88	88
<b>průměr RLU/CO</b>	3,38	3,48
<b>střed RLU/CO</b>	3,41	3,44
<b>standardní odchylka</b>	0,41	0,54
<b>max. RLU/CO</b>	4,42	5,01
<b>min. RLU/CO</b>	2,44	2,27

Další studie poskytla podobné srovnání u párových simulovaných vzorků od pacientů. Vzorky odebrané pacientům umístěné v roztoku PreservCyt Solution byly získány z pracoviště mimo QIAGEN a byl u nich provedeno plošné vyšetření (screening) testem DNA *digene* HC2 CT-ID, aby byly identifikovány pozitivní vzorky. Tyto pozitivní vzorky od pacientů byly pak zkombinovány tak, aby vytvořily celkové zásoby 10-ti koncentrovaných vzorků roztoku PreservCyt. Z těchto zásob byly připraveny dva alikvotní podíly a byly zpracovány do rezultující formy buněčných peletů. Buněčné pelety byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS). Alikvotní podíl A byl připraven přidáním resuspendovaného peletu do STM a alikvotní podíl B byl připraven přidáním resuspendovaného peletu do roztoku PreservCyt. Oba alikvotní podíly byly testovány testem DNA *digene* HC2 CT-ID - byly získány následující výsledky:

Párový-T test údajů v Tab. 21 poukazuje na to, že analytická citlivost testu DNA *digene* HC2 CT-ID není statisticky odlišná ( $p = 0,98$ ), ať se testování cervikálních vzorků provádí v roztoku PreservCyt nebo STM.

**Tab. 21.** Srovnání analytické citlivosti – test DNA *digene* HC2 CT-ID – simulované vzorky od pacientů v roztoku PreservCyt párované s STM.

	test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID	
	STM (aliquotní podíl A)	PreservCyt (aliquotní podíl B)
<b>počet vzorků</b>	10	10
<b>průměr RLU/CO</b>	30,92	24,90
<b>střed RLU/CO</b>	3,56	3,00
<b>standardní odchylka</b>	47,27	38,91
<b>max. RLU/CO</b>	125,62	115,08
<b>min. RLU/CO</b>	1,15	1,26

## ANALYTICKÁ SPECIFICITA

Baterie bakterií, virů a plasmidů potenciálně zjištěných v ženském anogenitálním traktu byla testována za účelem určení zkřížené reaktivity sondami používanými při testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Všechny mikroorganismy byly testovány v koncentracích  $10^5$  a  $10^7$  organismů na ml, a kde to bylo možné, dokonce v koncentraci  $10^9$  organismů na ml. Vyčištěná DNA virů a plasmidů byla testována v koncentraci 4 ng na ml.

Bakterie testované pomocí testu DNA *digene* HC2 CT-ID jsou uvedeny v Tab. 22. Všechny bakterie s výjimkou *Chlamydia psittaci* vykázaly v testu DNA *digene* HC2 CT-ID negativní výsledek. *Chlamydia psittaci* je zjištěná na kůži lidí, kteří pracují s jistými druhy ptáků, ale nebyla zjištěna v konečniku a pohlavním traktu.<sup>24</sup> Proto se neočekává zkřížená reaktivita mezi *Chlamydia psittaci* a sondou CT, která by mohla vést k falešným klinickým výsledkům vzorků z konečniku a pohlavního traktu.

Sonda CT neprokázala zkříženou reakci s *Neisseria gonorrhoeae*, což ukazuje, že sondy testu DNA *digene* HC2 CT-ID nereagují s organismy, které se zjišťují sondou GC-ID v testu DNA *digene* HC2 GC-ID.

**Tab. 22. Mikroorganismy testované na zkříženou reaktivitu.**

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

<sup>a</sup> Testované koncentrace byly  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  organizmů/ml.

<sup>b</sup> Byly testovány jak kmen *E. coli* používaný pro růst plasmidů (HB101) tak klinický izolát *E. coli*.

<sup>c</sup> Testované koncentrace byly  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  organizmů/ml.

<sup>d</sup> Testované koncentrace byly  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  a  $2 \times 10^9$  organizmů/ml.

<sup>e</sup> Testované koncentrace byly  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  organizmů/ml.

\* Kmen ATCC *Neisseria* má vlastnosti jak *Neisseria gonorrhoeae* tak *Neisseria meningitidis* (ATCC č. 43831).

Druhy virové nebo plasmidové DNA nebo lidského séra testované testem DNA *digene* HC2 CT-ID jsou uvedeny v Tab. 23. Předpokládaná zkřížená reaktivita byla pozorována u plasmidových vektorů pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Zf a pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). Přítomnost těchto homologických řetězců se uvádí u lidských vzorků z genitálií a za přítomnosti vysokých hladin těchto bakteriálních plasmidů by se mohly objevit falešně pozitivní výsledky. Z 106 klinických vzorků, u nichž byla testem DNA *digene* HC2 CT-ID zjištěna pozitivita, z celkové populace pacientů 1 818 byla u dvou zjištěna pBR322; avšak jeden vzorek ukázal pozitivní nález v testu CT kultury a DFA a jiný v testu DNA CT PCR. Proto se neobjevily falešně pozitivní výsledky těchto testů díky přítomnosti homologických řetězců pBR322, pGEM3Z a pGEM3Z(-) v těchto 106 klinických vzorcích. Frekvence zjištění těchto plasmidů ve vzorcích odebraných z ženských pohlavních orgánů nebyla plně určena. Toto je reprezentativní vzorek pacientů a nemusí odrážet frekvenci výskytu pBR322 u celé testované populace.

**Tab. 23.** Virová nebo plazmidová DNA nebo lidské sérum testované na zkříženou reaktivitu.

Cytomegalovirus	Lidská plná krev
Epstein Barr Virus	Lidský Papillomavirus typ 6
Hepatitis B Surface Antigen Positive Serum	Lidský Papillomavirus typ 11
Herpes Simplex I	Lidský Papillomavirus typ 16
Herpes Simplex II	Lidský Papillomavirus typ 18
Lidské epitelové buňky	pGEM <sup>®</sup> 3Z
Lidský virus HIV <sup>a</sup>	pGEM <sup>®</sup> 3Zf(-)
Lidská genotypová DNA	pBR322
Lidská placentální DNA	SV40

<sup>a</sup> Testované koncentrace byly  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ , a  $2 \times 10^8$  organizmů/ml.

### VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY STM

Vliv krve a dalších potenciálně rušivých látek byl hodnocen pomocí testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Krev, tělový šampon, protiplísňový krém a antikoncepční želé (látky, které lze běžně nalézt v cervikálních vzorcích) byly přidány v koncentracích 1 % a 5 % k negativním a pozitivním vzorkům v STM (klinické zásoby vzorků a neklinické vzorky). Nebyly pozorovány žádné falešně pozitivní výsledky u žádné z těchto čtyř látek v žádné koncentraci. Studie blíže neurčených látek přítomných v 117 negativních klinických vzorcích ukázala, že blíže neurčené látky mohou mírně, avšak nikoliv významně, zvýšit signál přítomnosti DNA *Chlamydia trachomatis* zjišťovaný testem DNA *digene* HC2 CT-ID. Tento vliv není na závadu, protože je protikladem inhibujícího vlivu.

### VLIV KRVE A DALŠÍCH LÁTEK NA VZORKY ROZTOKU PRESERVICYT

Hodnocení vlivu specifických rušivých látek, jak je popsáno v předchozím oddíle pro vzorky STM, nebylo pro vzorky roztoku PreservCyt provedeno. U vzorků roztoku PreservCyt nejsou však očekávány profily rušivých jevů rozdílné od STM vzorků, protože anatomické místo odběru endocervikálních vzorků je totožné jak pro vzorky roztoku PreservCyt, tak pro STM. Protože je vzorek roztoku PreservCyt podroben konverznímu procesu (jak je podrobně popsáno v návodu k použití k soupravě pro konverzi vzorků *digene* HC2 Sample Conversion Kit), má to za následek podobné složení vzorků roztoku PreservCyt jako vzorky STM; zbytkový pufr pro konverzi vzorku (SCB)<sup>1</sup> může být přítomen ve stopových množstvích ve zcela konvertovaných vzorcích roztoku PreservCyt. Byla proto dokončena analytická studie k ověření analytického výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID v přítomnosti různého množství SCB. Různé koncentrace plasmidu DNA CT byly připraveny v STM. Potom byly přidány ke vzorkům přidány nadbytečné objemy SCB a tři alikvotní podíly z každého vzorku byly testovány k získání průměrné hodnoty RLU/CO pro každý vzorek, v přítomnosti buď roztoku PreservCyt nebo SCB. Srovnání těchto hodnot průměrů RLU/CO pro každý vzorek (porovnávány s hodnotami průměru RLU/CO pro každý kontrolní vzorek STM) neposkytlo žádné falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky.

### PŘESNOST LIMITU POZITIVITY TESTU DNA *digene* HC2 CT-ID U KLINICKÝCH VZORKŮ ODEBRANÝCH V STM

Reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 CT-ID u klinických vzorků v STM byla určena ze studie 30 klinických zásob vzorků (15 pozitivních a 15 negativních) připravených kombinací předem denaturovaných a testovaných cervikálních vzorků odebraných kartáčkem v STM. Vzorky byly testovány čtyřmi opakovanými testy po dobu 5 dnů, což celkem činilo 20 opakování testu na každý vzorek. Testování bylo provedeno testem DNA *digene* HC2 CT-ID. Průměrná hodnota poměru RLU/CO, 95 % intervaly spolehlivosti kolem průměru (CI) a procento pozitivních výsledků byly vypočítány pro každý vzorek za celé období pěti dnů a jsou obsaženy v Tab. 24.

<sup>1</sup> Pufr pro konverzi vzorku je pufovaným roztokem Eosinu Y s 0,05 % azidu sodného, který je vyžadován pro konverzi vzorku roztoku PreservCyt. Pro podrobnější informace konzultujte Návod u soupravy pro konverzi vzorku *digene* HC2 firmy QIAGEN.



**Tab. 24.** Průměrná hodnota RLU/CO s intervaly spolehlivosti a procento pozitivních výsledků testu DNA *digene* HC2 CT-ID (v sestupném pořadí podle průměrné hodnoty RLU/CO).

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

Vzorky s průměrnou hodnotou RLU/CO 20 % nebo více nad limitem positivity byly pozitivní v 98 % případů, zatímco vzorky s průměrnou hodnotou RLU/CO 20 % nebo více pod limitem byly ve 100 % případů negativní. Tyto výsledky naznačují, že vzorky vzdálené o 20 % nebo více procent od limitu budou pravděpodobně přinášet v testu DNA *digene* HC2 CT-ID shodné výsledky.

Vzorky s hodnotami blízko limitu positivity zkoušky většinou zůstávaly pozitivními nebo negativními; ty, které byly nad limitem o méně než 20 % zůstaly pozitivní v 70 % případů. Vzorky pod limitem do 20 % zůstaly negativní v 79 % případů.

Tyto výsledky ukazují, že test DNA *digene* HC2 CT-ID přináší reprodukovatelné výsledky pro klinické vzorky v STM, jejichž hodnoty poměru RLU/CO se pohybují v oblasti vzdálené do 20 % od limitu positivity.

## HISTORICKÉ INFORMACE

V minulosti se kromě nástroje DML 2000 pro údaje o výkonu testu DNA *digene* HC2 CT-ID používal také luminometr Dynex Model MLX. Luminometr MLX už není k dispozici a pro získání údajů se stále používá přístroj DML 2000. Následující údaje byly získány v rámci multicentrické klinické studie provedené za účelem určení reprodukovatelnosti pozitivního kalibrátoru a negativního kalibrátoru a jsou uvedeny dále jako historické informace.

Pro určení reprodukovatelnosti pozitivního kalibrátoru a negativního kalibrátoru byly shrnuty výsledky klinických hodnocení 81 sad testů DNA *digene* HC2 CT-ID (Tab. 25). Výsledky ukazují, že průměrné % CV pro těchto 81 sad testů bylo 6,4 % a žádná sada nevykázala průměrné hodnoty negativního

kalibrátoru vyšší než 150 RLU. Reprodukovatelnost pozitivního kalibrátoru přesahující 25 % CV byla pozorována jen u 2 z 81 sad testů (2,5 %). Žádná z hodnot % CV nezůstala vyšší než 25 %, což naznačuje, že všechny testy byly platné.

**Tab. 25.** Výkon z hlediska testu pozitivního kalibrátoru a negativního kalibrátoru. Kombinované údaje z multicentrické klinické studie a studie přesnosti (n = 81 testových sad).

přístroj	počet sad testů	průměr poměrů S/N	průměr vypočítaných průměrů (RLU)		průměr vypočítaných %CV		
			typ kontrolního nebo kalibračního testu	úprava po vyřazení okrajových hodnot	úprava po vyřazení okrajových hodnot		
DML2000	9	5,49	negativní	44,89	39,15	26,10	13,75
			pozitivní	231,41	231,41	7,35	7,35
MLX*	72	5,33	negativní	0,075	0,074	16,59	12,90
			pozitivní	0,265	0,263	6,34	4,86

\*již není v užívání

### EKVIVALENCE MEZI VZORKY STM A VZORKY ROZTOKU PRESERVCYT

Ekvivalence mezi vzorky STM a vzorky roztoku PreservCyt byla zkoumána pomocí klinického hodnocení 1231 párových cervikálních vzorků. Vzorek roztoku PreservCyt byl zpracován podle návodu k použití k soupravě pro konverzi vzorku *digene* HC2 a testován spolu s párovým vzorkem STM pomocí testu DNA *digene* HC2 CT-ID. Výsledky tohoto hodnocení jsou uvedeny v Tab. 26. Klinická účinnost byla stanovena se zbytkovým objemem větším než 6,5 ml na vzorcích za použití roztoku PreservCyt. Testování vzorků se zbytkovým objemem od 4,0 - 6,5 ml musí být ověřeno laboratoří.

**Tab. 26.** Souhrn statistických údajů pro souhlas testu DNA *digene* HC2 CT-ID mezi párovými cervikálními vzorky odebranými v STM a v roztoku PreservCyt.

analýza dat pro dané seskupení	kappa (95 % CI)	pozitivní souhlas (n/N) 95 % CI	negativní souhlas (n/N) 95 % CI	celkový souhlas (n/N) 95 % CI
vyloučení údajů nejednoznačné oblasti	0,92 (0,88; 0,96)	92,16 (94/102) 85,13; 96,55	99,36 (1092/1099) 98,69; 99,74	98,75 (1186/1201) 97,95; 99,30
algoritmus* opakování testu v nejednoznačné oblasti	0,90 (0,86; 0,94)	90,09 (100/111) 82,96; 94,95	99,20 (1111/1120) 98,48; 99,63	98,30 (1211/1231) 97,50; 99,00

\*U vzorků v rozmezí RLU/CO 1,0 až 2,5 bylo testování dvakrát opakováno. Klasifikace vzorku byla pak stanovena podle pravidla dva ze tří.

Reprodukovatelnost testu DNA *digene* HC2 CT-ID DNA byla posouzena jako část klinického hodnocení s cílem prokázat, že byly obdrženy ekvivalentní výsledky testu DNA *digene* HC2 CT-ID při testování panelu 20 vzorků roztoku PreservCyt po dobu 3 dnů ve třech laboratořích. Výsledky této studie reprodukovatelnosti jsou uvedeny v Tab. 271 níže.

**Tab. 27.** Test DNA *digene* HC2 CT-ID, procentuální souhlas – podle pracoviště

pracoviště	pozorováno vs. očekáváno <sup>a</sup>	% souhlasu (95 % CI)
1	60/60	100 (94,04-100)
2	60/60	100 (94,04-100)
3	60/60	100 (94,04-100)
kombinovaná pracoviště	180/180	100 (97,97-100)

<sup>a</sup>20 členů panelu x 3 dny x 3 pracoviště

## ODKAZY

1. Litwin J. The growth cycle of the psittacosis group of micro-organisms. *J Infect Dis* 1959;105:129-60.
2. Matsumoto A, Higashi N. Electron microscopic observations of DNA molecules of the mature, elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. *Ann Rep Inst Virus Res ,Kyoto Univ* 1973;16:33-9.
3. Moulder JW. Characteristics of Chlamydiae. In: Barron AL, editor. *Microbiology of Chlamydia*. 1 ed. Boca Raton,FL: CRC Press; 1988. p 3-19.
4. Schachter J. Chlamydiae (psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group). In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr., Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 1985. p 856-62.
5. Stephens RS, Tam MR, Kuo C-C, Nowinski RC. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol* 1982;128(3):1083-9.
6. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(2):119-36.
7. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1983;17(4):666-8.
8. Ripa KT, Mardh P-A. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide-treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977;6(4):328-31.
9. Chernesky MA, Mahony JB, Castriciano S, Mores M, Stewart IO, Landis SJ, Seidelman W, Sargeant EJ, Leman C. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J Infect Dis* 1986;154(1):141-8.
10. Horn JE, Quinn T, Hammer M, Palmer L, Falkow S. Use of nucleic acid probes for the detection of sexually transmitted infectious agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:101S-9S.
11. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986;16:52-62.
12. Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990;28(9):1968-73.
13. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
14. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
15. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Wayne,PA: NCCLS; 1997.
17. Centers for Disease Control. *Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings*. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
18. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
20. U.S.Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.
21. Martin LS, McDougal JS, Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 1985 Aug;152(2):400-3.

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

## ZÁVADY A JEJICH ODSTRAŇOVÁNÍ

Test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
Během denaturace byla pozorována nesprávná barevná změna nebo k žádné barevné změně nedošlo.	Nebylo přidáno denaturační činidlo nebo bylo přidáno denaturační činidlo, které nebylo správně připravené.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Zkontrolujte, zda denaturační činidlo obsahuje indikační barvivo a zda má tmavě fialovou barvu.</li> <li>Zkontrolujte, zda bylo do vzorku přidáno denaturační činidlo, a to tak, že změříte objem vzorku (měl by být 1,5 ml). Pokud na základě měření objemu zjistíte, že denaturační činidlo nebylo přidáno, přidejte jej v náležitém množství, zamíchejte a pokud dojde k příslušné barevné změně, pokračujte v analýze.</li> </ol>
	U vzorků, které obsahují krev, může dojít k zakrytí barevné změny.	U těchto typů vzorků se neočekává, že dojde k přesně takové barevné změně, jak je popsána, na výsledky testu by to však nemělo mít žádný negativní vliv.
	pH vzorku může být neobvykle kyselé.	Vzorek může být neobvykle kyselý, a proto nedojde k očekávané barevné změně. Odeberte nový vzorek, a to <u>ještě předtím</u> , než na cervix aplikujete kyselinu octovou, protože nesprávné pH vzorku nepříznivě ovlivní výsledky testu.
Při kontrole kvality (QC) byly zaznamenány nesprávné výsledky.	Pro test byl vybrán nesprávný softwarový protokol	Pokud byl pro právě probíhající test zvolen nesprávný protokol, bude třeba co možná nejdříve znovu odečíst hodnotu pro danou destičku pomocí správného protokolu (během 30 minut po přidání detekčního činidla 2).
	Obrácené umístění QC-CT a QC-GT.	Zopakovat test na vzorcích.
Během hybridizace byla pozorována nesprávná barevná změna.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nedostatečné promíchání směsné sondy s denaturovaným kalibrátorem, kontrolou, kvalitou nebo se vzorky.</li> <li>Nebyla přidána směs sondy.</li> <li>Přidáno nesprávné množství činidla.</li> </ul>	Hybridizační mikrodestičku nechte protřepat další 2 minuty. Jestliže některé jamky ještě zůstaly fialové nebo šedivé, přidejte dalších 25 µl sondy a důkladně promíchejte. Jestliže k příslušné barevné změně nedojde ani po přidání sondy a protřepání a vzorek neobsahuje krev ani jiné materiály, proveďte test na vzorku znovu.
	U vzorků, které obsahují krev, může dojít k zakrytí barevné změny.	U těchto typů vzorků se neočekává, že dojde k přesně takové barevné změně, jak je popsána, na výsledky testu by to však nemělo mít žádný negativní vliv.
	Ve vzorcích bylo < 1000 ml <i>digene</i> STM (médiu pro přenos vzorků)	Zkontrolujte objem původního vzorku. Tento objem by měl být 1425 µl ± 20 µl (po odebrání 75 µl). Pokud bude objem < 1405 µl, bude to znamenat, že původní vzorek obsahoval < 1000 µl média pro přenos vzorků (STM). Vezměte nový vzorek.
Při analýze nebyla splněna ověřovací kritéria. U pozitivního kalibrátoru, kontrol kvality ani u vzorků nebyl pozorován žádný signál.	Do roztoku pro ředění sondy nebyla přidána žádná sonda.	Připravte směs CT sondy, a to tak, jak je to popsáno v tomto návodu k použití, v oddíle Příprava a uskladnění činidel. Důkladně promíchejte. Zkumavku náležitě označte. Analýzu opakujte s nově připravenou směsí sondy.
	Sonda byla během přípravy kontaminována RNázou.	Při pipetování sondy používejte špičky pipet s aerosolovým filtrem a ochranné rukavice bez mastku. Sondu zředte ve sterilní nádobce. Používejte pouze čisté, nové nádoby na jedno použití.
	Nedostatečné smísení sondy a roztoku pro ředění sondy.	Po přidání sondy do roztoku pro ředění sondy důkladně promíchejte vortexováním při vysoké rychlosti po dobu nejméně 5 vteřin. Musí se objevit viditelný vír.
	Nedostatečné smísení zředěné sondy a denaturovaného vzorku.	Jakmile přidáte směs sondy do denaturovaného vzorku, hybridizační destičku zakryjte a pomocí rotační třepačky (Rotary Shaker I) nechejte protřepat po dobu 3 ± 2 při rychlosti 1100 ± 100 ot./min., jak je to popsáno v návodu k použití, v oddíle Postup testu, hybridizace, krok 6. Zkontrolujte, zda ve všech jamkách došlo k barevné změně z purpurové na žlutou.

Test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Nesprávná doba nebo teplota během hybridizační fáze.	Proveďte hybridizaci, a to po dobu 60 ± 5 minut při teplotě 65 ± 2 °C, jak je to popsáno v návodu k použití, v oddíle Postup testu, hybridizace, krok 7 v instrukcích. Zkontrolujte teplotu mikrodestičkového inkubátoru I (Microplate Heater I). Zajistěte, aby byl inkubátor nastaven tak, aby temperoval vzorky na správnou teplotu a aby byl předeřhán 1 hodinu pře použitím.
	Nedostatečné smísení během imobilizační fáze.	Pomocí rotační třepačky (Rotary Shaker I) nechte protřepat po dobu 60 ± 5 minut při rychlosti 1100 ± 100 ot./min. a při teplotě 20-25 °C, jak je to popsáno v příbalovém návodu, v oddíle Postup testu, hybridizace, krok 4. Pomocí kalibrace ověřte rychlost rotační třepačky I, jak je uvedeno v Příručce pro použití rotační třepačky I, v oddíle Kalibrace rychlosti třepačky.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nebylo přidáno odpovídající množství detekčního činidla 1.</li> <li>U inkubace nebyla dodržena stanovená doba.</li> </ul>	<p>Pomocí 8mi kanálové pipety napipetujte do každé jamky 75 µl detekčního činidla 1.</p> <p>Inkubujte při 20-25°C po dobu 30-45 minut.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nebylo přidáno odpovídající množství detekčního činidla 2.</li> <li>U inkubace nebyla dodržena stanovená doba.</li> </ul>	<p>Pomocí 8-kanálové pipety napipetujte do každé jamky 75 µl detekčního činidla 2.</p> <p>Nechte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 15-30 minut.</p>
	Porucha nebo nesprávné naprogramování luminometru.	Postupujte podle pokynů v části údržba a odstraňování závad příslušného návodu k použití k softwaru pro příslušný test nebo kontaktujte oddělení technické podpory společnosti QIAGEN.
<b>U kalibrátoru, kontrol nebo vzorků byly zaznamenány zvýšené hodnoty RLU (v mnoha či všech jamkách byly hodnoty RLU ≥150). Je možné, že analýza nesplňuje ověřovací kritéria.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nebylo přidáno denaturační činidlo, nebo bylo přidáno nesprávné množství činidla, nebo denaturační činidlo nebylo dostatečně smíseno se vzorky, kalibrátory nebo kontrolami kvality.</li> <li>Nesprávná teplota vodní lázně a nedostatečná úroveň hladiny vody.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Před přidáním denaturačního činidla ověřte, zda opakovací pipeta odměřuje přesně. Je třeba používat kalibrované pipety. Do každé zkumavky přidejte polovinu objemu denaturačního činidla a dobře promíchejte. Abyste se vyhnuli falešně pozitivním výsledkům, ujistěte se, že kapalina smývá celý vnitřní povrch zkumavky (v případě manuálního mísení převratte zkumavku dnem vzhůru). Kontroly kvality, kalibrátory a vzorky by měly po přidání denaturačního činidla dostat purpurovou barvu. U zařízení určeného pro více zkumavek (Multi-Specimen Tube Vortexer 2 zkontrolujte kalibraci rychlosti.</li> <li>Zkontrolujte hladinu a teplotu vody.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Únik světla u luminometru.</li> <li>Poškozené těsnění.</li> <li>Dvířka nejsou těsně uzavřena.</li> </ul>	Zkontrolujte hodnotu pozadí (měření hrubých údajů) luminometru odečtem údajů pro prázdné jamky mikrodestičky. Pokud bude tato hodnota vyšší než 50 RLU, bude to znamenat, že dochází k úniku světla. Postupujte podle pokynů v části údržba a odstraňování závad příslušného návodu k použití k softwaru pro příslušný test nebo kontaktujte oddělení technické podpory společnosti QIAGEN
	Kontaminace detekčního činidla 2 či imobilizačních mikrojamek detekčním činidlem 1 nebo exogenní alkalickou fosfatázou.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
	Kontaminovaný promývací pufr.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
	Kontaminace automatické promývačky destiček I.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
	Nedostatečné promytí imobilizačních mikrojamek po inkubaci s detekčním činidlem 1.	Mikrojamky důkladně (šestkrát) promyjte promývacím pufrem, přičemž pokaždé naplňte jamky do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček. Po vymytí by v jamkách neměla zůstat žádná růžová kapalina. Postup při ověřování, zda nedošlo ke kontaminaci nebo zda zařízení funguje správně viz oddíl Závady a jejich odstraňování <i>Návod k používání automatické promývačky destiček.</i>

Test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Kontaminace mikrojamek detekčním činidlem 1.	Dbejte na to, aby všechny pracovní plochy byly čisté a suché. Při práci s detekčním činidlem 1 postupujte opatrně. Vyvarujte se styku s aerosoly.
	Opakované vysušení (blotování) hybridizačního roztoku na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers nebo srovnatelných papírových ubrousků bez vláken.  Pro vysušení byly použity nevhodné ubrousky.	Při vysušení (blotování) pomocí tamponů Kimtowels Wipers nebo papírových ubrouscích bez vláken dbejte na to, abyste nepoužili opakovaně stejné místo.  Pro blotování použijte tampóny Kimtowels Wipers či papírové ubrousky bez vláken se srovnatelnými vlastnostmi
	Materiál kontroly kvality CT byl použit jako pozitivní kalibrátor. Analýza nespĺňuje ověřovací kritéria.	Zajistěte správné umístění kalibrátorů a kontrol kvality.
<b>Nízké hodnoty poměru PC/NC nebo velký počet vzorků s nízkou pozitivitou (&gt;20% z celkového počtu vzorků) a s poměrem RLU/CO &lt;2,0. Může se stát, že analýza nespĺňuje ověřovací kritéria.</b>	Nedostatečná příprava vzorků.	Přidejte příslušné množství denaturačního činidla a důkladně promíchejte vortexováním. Abyste se vyhnuli falešně pozitivním výsledkům, ujistěte se, že kapalina při vortexování pomocí zařízení (Multi-Specimen Tube Vortexer I) omývá celý vnitřní povrch zkumavky, a to po dobu minimálně 5 vteřin (v případě manuálního vortexování také 5 vteřin, po čemž je třeba zkumavku převrátit dnem vzhůru). Přitom by se měla výrazně změnit barva z průhledné na tmavě purpurovou. Následně nechte inkubovat při teplotě 65 ± 2°C po dobu 45 ± 5 minut. Při použití vzorků PreservCyt Solution, tyto hybridy se mohou nacházet na vnitřních stěnách zkumavky. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenedaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy CT/GC. Podrobnosti o postupu naleznete v návodu k použití k soupravě <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.
	Sonda je nedostatečně promíšena nebo bylo pro účely analýzy přidáno nedostatečné množství sondy.	Připravte směs sondy podle návodu. Důkladně promíchejte vortexováním a ujistěte se, že se vytvořil viditelný vír. Směsnou sondu je třeba přidat do zkumavek pomocí vícekanálové nebo opakovací pipety, aby se zajistilo přesné dávkování.
	Do jednotlivých hybridizačních jamek na mikrodestičce bylo přidáno nedostatečné množství směsi sondy.	Před přidáním směsi sondy na hybridizační mikrodestičku zkontrolujte, zda 8mi kanálová pipeta dávkuje přesně. Do každé jamky mikrodestičky, obsahující na dně denaturovaný vzorek, přidejte 25 µl směs sondy. Před přidáním směsi sondy do hybridizačních jamek ověřte, že dávkování pomocí 8-kanálové pipety je přesné. Po přidání směsi sondy a důkladném promíchání by mělo dojít ke změně zabarvení z tmavě fialového na žluté.
	Detekční činidlo 1 přestalo být aktivní.	Detekční činidlo 1 uskladněte při teplotě 2-8 °C. Použijte jej před uplynutím záruční doby, která je uvedena na štítku nalepeném na krabičce soupravy.
	Nedostatečná imobilizace hybridů RNA: DNA.	Imobilizační fáze by měla být provedena s použitím rotační třepačky I nastavené na 1100 ±100 ot/min. Pomocí kalibrace ověřte rychlost rotační třepačky I, jak je uvedeno v návodu k použití rotační třepačky I, v oddíle Kalibrace rychlosti třepačky.
	Nedostatečné promytí.	Jamky na mikrodestičce důkladně (šestkrát) promyjte promývacím pufrům, přičemž pokaždé naplňte jamky do přetečení, nebo použijte automatickou promývačku destiček.
	Kontaminovaný promývací pufr.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.
	<b>Série pozitivních vzorků s přibližně stejnými hodnotami RLU.</b>	Během manipulace při analýze došlo ke kontaminaci jamek imobilizační mikrodestičky.

Test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Kontaminace detekčního činidla 2.	Dbejte na to, aby při pipetování detekčního činidla 2 do imobilizačních jamek mikrodestičky nedošlo ke kontaminaci zásobního roztoku. Zabraňte kontaminaci detekčního činidla 2 aerosoly z detekčního činidla 1 nebo laboratorním prachem atd.
	Porucha automatické promývačky destiček I.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění nebo viz. návod k použití k automatické promývačky destiček.
<b>Velké rozpětí % CV mezi replikáty.</b>	Nesprávné pipetování (tj. vzduchové bubliny, nekalibrovaná pipeta)	Zkontrolujte pipetovací zařízení, zda jsou dávkovány reprodukovatelné objemy. Pipety pravidelně kalibrujte.
	Nedostatečné smísení.	Při každé fázi důkladně promíchejte. Před a po denaturační inkubací důkladně vortexujte. Na hladině se musí vytvořit viditelný vír.
	Neúplný přenos kapaliny z hybridizační mikrodestičky do jamek imobilizační mikrodestičky.	Při přenosu z hybridizační mikrodestičky na imobilizační destičku dbejte na to, aby byly přeneseny reprodukovatelné objemy.
	Nevhodné podmínky pro promývání.	Jamky na mikrodestičce důkladně (šestkrát) promyjte promývacím puřrem, přičemž je pokaždé naplňte do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček a příslušný protokol pro automatickou promývačku destiček.
	Kontaminace jamek mikrodestičky detekčním činidlem 1	Dbejte na to, aby všechny pracovní plochy byly čisté a suché. Při práci s detekčním činidlem 1 postupujte opatrně. Vyvarujte se styku s aerosoly.
	Kontaminace špičky pipety materiálem, který nebyl denaturován, během přenosu nedenaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky používané pro hybridizaci CT sondy.	Denaturační krok při postupu zpracování vzorku musí být proveden podle tohoto návodu k použití. Nedostatečné vortexování vzorku, obrácení zkumavky a třepání může mít za následek neúplnou denaturaci nespecifických hybridů RNA:DNA, které jsou endogenní cervikálním vzorkům. Při použití vzorků roztoku PreservCyt jsou tyto hybridy hlavně přítomny na vnitřních stěnách konverzní zkumavky vzorku. Pro prevenci přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu se nesmí špička pipety dotknout vnitřních stěn konverzní zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky, která je užita pro hybridizaci sondy CT.
	Blotování několika řad na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers.	Nepoužívejte opakovaně stejné místo tampónů Kimtowels Wipers k blotování.
<b>U známých negativních vzorků byly vykázány falešně pozitivní výsledky.</b>	Kontaminace detekčního činidla 2.	Dbejte na to, aby při přidávání detekčního činidla 2 k vzorkům nedošlo ke zkřížené kontaminaci mezi vzorky. Pokud používáte pouze část soupravy, nadávkujte do čistého zásobníku činidel alikvotní podíl, který je potřeba k provedení dané analýzy předtím, než naplníte pipetu.
	Kontaminace jamek mikrodestičky detekčním činidlem 1.	Jamky na mikrodestičce důkladně (šestkrát) promyjte promývacím puřrem, přičemž pokaždé naplňte jamky do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček I. Po vymytí by v jamkách neměla zůstat žádná růžová kapalina.
	Kontaminace špičky pipety nedenaturovaným materiálem během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky používané pro hybridizaci CT sondy.	Denaturační krok při postupu zpracování vzorku musí být proveden podle těchto instrukcí. Nesprávné vortexování vzorku, obrácení zkumavky a třepání může mít za následek neúplnou denaturaci nespecifických hybridů RNA:DNA, které jsou endogenní cervikálním vzorkům. Při použití vzorků roztoku PreservCyt jsou tyto hybridy hlavně přítomny na vnitřních stěnách konverzní zkumavky. Pro prevenci přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, se špička pipety nesmí dotknout vnitřních stěn konverzní zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky, která je užita pro hybridizaci sondy CT.



Test DNA <i>digene</i> HC2 CT-ID		
POZOROVÁNÍ	PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY	ŘEŠENÍ
	Nedostatečná příprava vzorků.	Přidejte příslušné množství denaturačního činidla a důkladně promíchejte vortexováním. Abyste se vyhnuli falešně pozitivním výsledkům ujistěte se, že kapalina smývá celý vnitřní povrch zkumavky, za použití vortexování pomocí MST Vortexer 2 po dobu nejméně 5 vteřin (u manuální metody převraťte jednu zkumavku dnem vzhůru). Přitom by se měla výrazně změnit barva z průhledné na tmavě purpurovou. Následně nechte inkubovat při teplotě $65 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu $45 \pm 5$ minut. Při použití vzorků PreservCyt Solution, tyto hybridy se mohou nacházet na vnitřních stěnách zkumavky. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy CT/GC. Podrobnosti o postupu naleznete v návodu k přípravě k soupravě <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.
	Nevhodné podmínky pro promývání.	Důkladně (šestkrát) promyjte mikrojamky promývacím pufrům, pokaždé naplňte mikrojamky do přetečení nebo použijte automatickou promývačku destiček a příslušný protokol pro automatickou promývačku destiček .
<b>U negativního kalibrátoru zaznamenány zvýšené hodnoty RLU (&gt;150 RLU). Zbytek stanovení probíhá očekávaným způsobem.</b>	Inkubace detekčního činidla 2 byla provedena při teplotě vyšší než $20 - 25^\circ\text{C}$ .	Test je neplatný, protože u kalibrátorů byly zaznamenány vysoké negativní hodnoty. Proveďte test znovu a zajistěte, aby inkubace během imobilizační a detekční fáze byla provedena při teplotě $20 - 25^\circ\text{C}$ .
	Inkubace detekčního činidla 2 trvala déle než 30 minut.	Po 15 minutách inkubace při $20 - 25^\circ\text{C}$ (nejpozději po 30 minutách inkubace) přečtete údaj pro destičku.
	Detekční činidlo 2 nebo promývací pufr byly kontaminovány alkalickou fosfatázou nebo detekčním činidlem 1.	Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.

## TESTOVÁNÍ NA KONTAMINACI

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

## QIAGEN KONTAKTNÍ INFORMACE

Kontaktní údaje na svého místního zástupce firmy QIAGEN pro tento výrobek najdete na přiloženém listu s kontaktními informacemi.

### Uznání ochranných známek:

**QIAGEN®**, *digene®*, Hybrid Capture®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CDP-Star® (Life Technologies Corporation); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); pGEM® (Promega Corp); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); Sarstedt®: SARSTEDT AG & Co.; VWR® (VWR International, Inc.).

# SOUHRN TESTU DNA *digene* HC2 CT-ID

**Důležité: Předtím, než toto shrnutí použijete, je důležité, abyste se podrobně seznámili s celým postupem.**

	POSTUP	
<b>Denaturace</b> (pro vzorky roztoku PreservCyt viz Postup přípravy vzorků roztoku PreservCyt)	<b>Metoda manuálního vortexování</b>  Rozvrhněte uspořádání destičky. Označte hybridizační mikrozkušavky. Připravte denaturační činidlo. ↓ Napipetujte denaturační činidlo (v množství, které odpovídá polovině objemu vzorku) do kontrol kvality, kalibrátorů a vzorků. Každou kontrolu kvality, kalibrátor a vzorek jednotlivě vortexujte, a to po dobu 5 vteřin při vysoké rychlosti, a zkumavky následně otočte dnem vzhůru (podrobnější informace viz tento návod k použití). ↓ Zkontrolujte, že se všechny zkumavky zbarvily do fialova. ↓ Nechte inkubovat při teplotě $65 \pm 2$ °C po dobu $45 \pm 5$ minut. ↓ Připravte směs CT sondy . ↓ ↓ ↓	<b>Vortexování pomocí zařízení pro více zkumavek (Multi-Specimen Tube Vortexer 2)</b>  Rozvrhněte uspořádání destičky. Označte hybridizační destičku. Připravte denaturační činidlo. ↓ Napipetujte denaturační činidlo (v množství, které odpovídá polovině objemu vzorku) do kontrol kvality, kalibrátorů a vzorků. ↓ Zkontrolujte, že se všechny zkumavky zbarvily do fialova. ↓ Zakryjte stojan fólií a víkem. ↓ Vortexujte při maximální rychlosti po dobu 10 vteřin. ↓ Nechte inkubovat při teplotě $65 \pm 2$ °C po dobu $45 \pm 5$ minut. ↓ Připravte směs CT sondy . ↓ ↓
<b>Hybridizace</b>	<b>Metoda inkubátoru mikrodestiček I</b>  Denaturované vzorky důkladně promíchejte a odpipetujte vždy 75 µl vzorku, kalibrátoru a kontroly kvality nebo vzorku do příslušných jamek na mikrodestičce. ↓ Nechte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 10 minut. ↓ Napipetujte 25 µl směsné sondy CT do jamek na mikrodestičce. ↓ Zakryjte mikrodestičku víkem a třepejte na rotační třepačce I při rychlosti $1100 \pm 100$ ot/min po dobu $3 \pm 2$ minut. <i>Zkontrolujte, zda se všechny jamky zbarvily do žluta.</i> (Vzorky roztoku PreservCyt se zbarví do růžova). ↓ Nechte inkubovat při teplotě $65 \pm 2$ °C po dobu $60 \pm 5$ minut.. ↓ Připravte imobilizační mikrodestičku. ↓	
<b>Imobilizace hybridu</b>	Obsah z jednotlivých jamek hybridizační destičky přeneste pomocí 8mi kanálové pipety do příslušné jamky imobilizační mikrodestičky. ↓ Zakryjte víkem destičky nebo fólií. Protřepejte při rychlosti $1100 \pm 100$ ot/min, při teplotě 20-25 °C po dobu $60 \pm 5$ minut. Připravte promývací pufr. ↓ Imobilizační mikrodestičku slijte a blotujte (podrobnější informace viz tento návod k použití). ↓	
<b>Detekce hybridu</b>	Do každé jamky imobilizační mikrodestičky napipetujte 75 µl detekčního činidla 1. Imobilizační mikrodestičku zakryjte příslušným víkem, fólií Parafilm nebo jinou fólií se srovnatelnými vlastnostmi. <b>Nechte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 30 - 45 minut. Promyjte destičku za použití příslušné metody.</b> ↓	
<b>Promývání</b>	<b>Manuální promývání</b>  Provedte dekantaci a blotujte imobilizační mikrodestičku (podrobnější informace viz Návod přiložený k soupravě). ↓ Šestkrát promyjte. ↓ Blotujte pomocí papírových ubrousků bez vláken. ↓	<b>Promývání pomocí automatické promývačky destiček</b>  Umístěte destičku na promývačku a stisknutím tlačítka „START/STOP“ ji uveďte do chodu. ↓ Přejděte na další krok ↓ ↓ ↓ ↓
<b>Zesílení signálu</b>	Do každé jamky imobilizační mikrodestičky napipetujte 75 µl detekčního činidla 2. <b>Zakryjte destičku víkem. Nechte inkubovat při teplotě 20-25 °C po dobu 15-30 minut.</b> ↓	
<b>Odečtení hodnot</b>	Na luminometru schváleném společností QIAGEN odečtěte výsledky pro imobilizační destičku. ↓ Potvrďte platnost analýzy a proveďte interpretaci výsledků pro vzorky.	