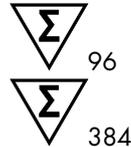


August 2015

digene[®] HC2 High-Risk HPV DNA Gebrauchsanweisung



IVD

In-vitro-Nukleinsäure-Hybridisierungsassay mit Signalverstärkung mittels Chemolumineszenzreaktion in Mikrottestplatten zum qualitativen DNA-Nachweis von 13 Hochrisiko-Typen des humanen Papillomvirus (HPV) in zervikalen und vaginalen Abstrichproben

Zum Gebrauch mit:

digene HC2 DNA Collection Device
digene Specimen Transport Medium
Hologic PreservCyt[®] Solution
BD SurePath[®] Preservative Fluid



REF

5197-1330 (Kit mit 1 Platte)
618111 (Kit mit 4 Platten)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
DEUTSCHLAND

1058538DE Rev. 02

Wichtigste Veränderungen im Vergleich zur letzten Revision der Gebrauchsanweisung

- Das Probenvorbereitungsverfahren für SurePath Postgradient-Zellpelletproben unter Verwendung des QIA Symphony® DSP HPV Media Kits sowie die zugehörigen Leistungsdaten wurden aufgenommen.
- Aktualisierungen wurden durchgeführt, um Übereinstimmung mit dem Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (Globales harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien) (GHS) zu erreichen.

Inhaltsverzeichnis

Vorgesehener Verwendungszweck	8
Zusammenfassung und Hintergrundinformationen	9
Informationen zum Pathogen	10
Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung	10
Probenvorbereitung mit dem QIAAsymphony SP	12
Probenvorbereitung mit dem QIAAsymphony DSP HPV Media Kit	12
Probenvorbereitung mit dem QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit	13
Testdurchführung mit dem Rapid Capture System (RCS)	13
Mit dem Kit gelieferte Materialien	16
1-Plattenkit	16
4-Platten-Kit	16
Kit-Inhalt	17
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	19
In-vitro-diagnostische Geräte und Materialien	19
Allgemeine Laborausrüstung und -materialien	20
Zusätzliche Ausrüstung und Materialien für die Verarbeitung von PreservCyt Proben	21
Zusätzliche Ausrüstung und Materialien für die Verarbeitung von SurePath Proben	21
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	22
Warnhinweise	22
Proben	22
Natriumazid	23
Puffer N2	23
Automatisierte Testdurchführung mit dem RCS	24
Risiko- und Sicherheitssätze zu Inhaltsstoffen	24
Vorsichtsmaßnahmen	26
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	27
Kit-Komponenten	27

Angesetzte Reagenzien.....	27
Probenentnahme und -vorbereitung.....	28
Zervikale und vaginale Abstrichproben in STM.....	28
Zervixbiopsien.....	29
Zervixproben in PreservCyt Lösung.....	29
Zervixproben in SurePath Konservierungsmedium.....	30
Automatische Probenvorbereitung von Proben in SurePath.....	31
Automatische Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath.....	32
Manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath.....	32
Testverfahren.....	33
Vorbereitung der Reagenzien.....	33
Denaturierungsreagenz.....	35
Denaturierungsreagenz 2.....	36
Sonden-Mischung.....	37
Waschpuffer.....	38
Erstellen der Platten-Layoutdatei.....	39
Probenvorbereitung.....	41
Probenverarbeitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits.....	41
Probenvorbereitung von Proben in SurePath und Postgradient-Zellpellets in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	42
Probenverarbeitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits.....	43
Manuelle Probenverarbeitung von PreservCyt Proben.....	43
Manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpellets in SurePath.....	43
Denaturierung und Hybridisierung von Proben, die mit dem QIASymphony SP präpariert wurden.....	45
Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluate für die manuelle Testung.....	46
Optionale Unterbrechung beim Testen von DNA-Eluaten.....	47
Hybridisierung der DNA-Eluate.....	47

Denaturierung und Hybridisierung von STM-Proben und manuell vorbereiteten Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath	48
Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben	48
Optionale Unterbrechung beim Testen vorbereiteter STM-Proben und manuell vorbereiteter Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath	50
Hybridisierung vorbereiteter STM-Proben und manuell vorbereiteter Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath	51
Hybridisierung unter Verwendung von Mikrottestplatte und Mikrottestplatten-Inkubator I	52
Hybridisierung unter Verwendung von Mikroreaktionsgefäßen und Wasserbad.....	53
Bindung der Hybride	55
Detektion der Hybride.....	57
Waschen	58
Waschen mit dem Automated Plate Washer.....	58
Manuelle Waschmethode	59
Amplifikation des Signals.....	61
Messung der Capture-Mikrottestplatten und Ausgabe der Ergebnisse.....	61
Interpretation der Ergebnisse.....	63
Ergebnisse bei Testung von STM-Proben.....	63
Ergebnisse bei Testung von SurePath Proben	63
Ergebnisse bei Testung von PreservCyt Proben.....	63
RLU/CO-Wert nahe bei 1,0	64
Andere HPV-Typen	64
Verifizierung der Assay-Kalibrierung	64
Negativkalibrator.....	65
Positivkalibrator	65
Quotient Positivkalibrator-Mittelwert/Negativkalibrator-Mittelwert	65
Berechnung des Cut-off-Werts	66
Qualitätskontrollen	66
Beschränkungen des Tests	68
Leistungscharakteristik.....	70

Leistungsfähigkeit beim Screening klinischer Proben von Patientinnen mit normalem Pap- Abstrichbefund als Hilfsmittel bei der Risikobeurteilung für das Patientenmanagement	70
Leistungsfähigkeit beim Screening klinischer Proben von Patientinnen mit dem Pap- Abstrichbefund „ASC-US“ zur Ermittlung der Notwendigkeit einer Überweisung zur Kolposkopie	75
Klinische Sensitivität und Spezifität bei der Bestimmung des Risikos für eine hochgradige Erkrankung bei Frauen mit dem Pap-Abstrichbefund „LSIL“ oder „HSIL“	79
Leistungsfähigkeit bei Vaginal- oder selbst entnommenen Abstrichproben.....	82
Analytische Sensitivität.....	83
Äquivalenz zwischen Probentypen	84
Äquivalenz zwischen Proben in STM und Proben in PreservCyt Lösung.....	84
Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von PreservCyt Proben und automatisierter Probenvorbereitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits.....	85
Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von PreservCyt Proben und automatisierter Probenvorbereitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits	85
Äquivalenz zwischen STM und manueller Probenvorbereitung von Postgradient- Zellpelletproben in SurePath	86
Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath und Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	87
Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath und Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	88
Übereinstimmung zwischen Testmethoden	89
Reproduzierbarkeit	93
Gesamtproduzierbarkeit bei manueller Testung.....	93
Reproduzierbarkeit bei Analyse klinischer Proben in STM	94
Reproduzierbarkeit bei Analyse klinischer Proben in PreservCyt Lösung	97
Reproduzierbarkeit bei Analyse klinischer Proben in SurePath Konservierungsmedium	109
Kreuzreaktivität.....	115
Kreuzhybridisierung	117

Einfluss von Blut und anderen Substanzen beim Testen von STM-Abstrichproben	118
Einfluss von Blut und anderen Substanzen beim Testen von PreservCyt Abstrichproben	118
Manuelle Probenvorbereitung	118
Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit	118
Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.....	119
Einfluss von Blut und anderen Substanzen beim Testen von SurePath Abstrichproben...	120
Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	120
Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	121
Verschleppungskontamination.....	122
Reagenzienstabilität im RCS	124
Literatur	127
Symbole	132
Hilfe zur Fehlerbehebung	133
Kontrolle des Reagenzes DR2 auf Kontamination	142
Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination	142
Kontrolle des Automated Plate Washer auf Kontamination	143
Kontaktinformationen	144

Vorgesehener Verwendungszweck

Für in-vitro-diagnostische (IVD-)Anwendungen.

Der *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ist ein Nukleinsäure-Hybridisierungsassay zum qualitativen Nachweis von 13 Hochrisiko-Typen der HPV-DNA in zervikalen und vaginalen Abstrichproben. Der Test wird in Mikrottestplatten durchgeführt und basiert auf der Hybrid Capture® 2 (HC2-)Technologie, wobei das Messsignal mittels einer Chemolumineszenzreaktion verstärkt wird.

Folgende Arten von Gebärmutterhals- und vaginalen Abstrichproben können mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test untersucht werden:

- Von einem Arzt mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommene Zervixproben
- Selbst mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommene Vaginalproben
- Biopsieproben, die in das Probentransportmedium *digene* Specimen Transport Medium (STM) aufgenommen wurden
- Abstrichproben, die mit einer Abstrichbürste (oder Bürsten-Spatel-Kombination) entnommen und dann in PreservCyt Lösung oder SurePath Preservative Fluid (als Konservierungsmedium) überführt wurden

Die Verwendung dieses Tests ist für folgende Zwecke angezeigt:

- Zum Nachweis der Hochrisiko-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68, die nachgewiesenermaßen den primären kausalen Faktor bei der Entwicklung des Zervixkarzinoms darstellen.
- Als erster Screening-Test für die Allgemeinbevölkerung – zur Verwendung mit oder ohne Pap-Abstrich –, um Frauen mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms oder dem Vorliegen einer hochgradigen Zervixläsion zu identifizieren. Mit zunehmendem Alter ist die HPV-Diagnose ein stärkeres Anzeichen für eine zervikale Erkrankung.
- Als Bestätigungstest bei Patientinnen mit anormalem Pap-Abstrichbefund oder einer zervikalen Erkrankung, um festzustellen, ob eine Überweisung zur Kolposkopie oder anderen Follow-up-Verfahren zwecks Abklärung erforderlich ist.
- Als Bestätigungstest vor einer Kolposkopie bei Patientinnen, deren Ergebnis beim Pap-Abstrichtest auf eine geringgradige oder hochgradige squamöse intraepitheliale Läsion (LSIL = *low-grade squamous intraepithelial lesion* bzw. HSIL = *high-grade squamous intraepithelial lesion*) hindeutet. Bei der Behandlung dieser Patientinnen hilft das Ergebnis eines *digene*

HC2 High-Risk HPV DNA Tests dem Arzt bei der Risikobewertung, indem das Vorliegen einer hochgradigen Erkrankung ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassung und Hintergrundinformationen

Die Anwesenheit bestimmter HPV-Typen im weiblichen Genitaltrakt ist mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert, u. a. Kondylom, Bowenoide Papulose oder intraepitheliale Neoplasie und Karzinom im Gebärmutterhals- (Zervix-), Vaginal- und Vulvabereich (1–3). Es ist allgemein anerkannt, dass diese Viren überwiegend durch sexuellen Verkehr übertragen werden und dass die Hochrisiko-HPV-Typen den Haupt-Risikofaktor für die Entwicklung von Gebärmutterhalskrebs darstellen (4–8).

Bislang kann HPV nicht in vitro kultiviert werden und immunologische Tests sind nicht geeignet, um das Vorhandensein einer zervikalen HPV-Infektion festzustellen. Eine anogenitale HPV-Infektion kann durch körperliche Untersuchung und das Vorhandensein charakteristischer zellulärer Veränderungen, die mit der Virusvermehrung einhergehen, durch Pap-Abstrich oder Biopsieproben indirekt nachgewiesen werden. Alternativ können Biopsien auch mittels Nukleinsäure-Hybridisierung analysiert werden, um das Vorhandensein von HPV-DNA direkt nachzuweisen..

Schon seit längerem gelten die HPV-Typen 16 und 18 als Hochrisiko-Typen, die mit Krebs assoziiert sind (8–10). Auch für die HPV-Typen 31, 33 und 35 konnte ein solcher Zusammenhang mit der Krebsentstehung – in intermediärer Ausprägung – nachgewiesen werden (2, 11–14). Diese intermediäre Assoziation beruht auf der Tatsache, dass diese Typen bei verhornenden (squamösen) intraepithelialen Läsionen relativ häufiger detektiert werden als bei Karzinomen. Daher ist die Induktion einer Krebserkrankung durch Vorhandensein dieser HPV-Typen weniger wahrscheinlich, als wenn Hochrisiko-HPV-DNA-Typen vorliegen (15). Die genannten fünf HPV-Typen machen zusammen ca. 73 % aller HPV-Infektionen aus (16, 17). Bei den übrigen Läsionen wurden hauptsächlich die folgenden weiteren HPV-Typen nachgewiesen: 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 (17–27). Diese HPV-Typen lassen sich auf Basis ihrer relativen Verteilung auf verschiedene histopathologische Diagnosekategorien in die Hochrisiko-Gruppe und die Gruppe mit intermediärem Risiko klassifizieren (16, 17, 24–28).

HPV-DNA ist bei ungefähr 10 % aller Frauen mit normalem zervikalem Epithel vorhanden; die tatsächliche Prävalenz in bestimmten Gruppen von Frauen ist jedoch stark abhängig vom Alter und anderen demografischen Variablen (2, 10, 16, 29). Prospektive Studien haben gezeigt, dass es bei 15–28 % der Frauen, die positiv auf HPV-DNA getestet wurden, innerhalb von zwei Jahren zur Entwicklung squamöser intraepithelialer Läsionen (SILs) kam im Vergleich zu lediglich 1–3 %

Frauen, deren HPV-DNA-Test negativ war (30, 31). Insbesondere ist bei den HPV-Typen 16 und 18 das Risiko einer Progression deutlich höher (um ca. 40 %) als bei anderen HPV-Typen (30).

Informationen zum Pathogen

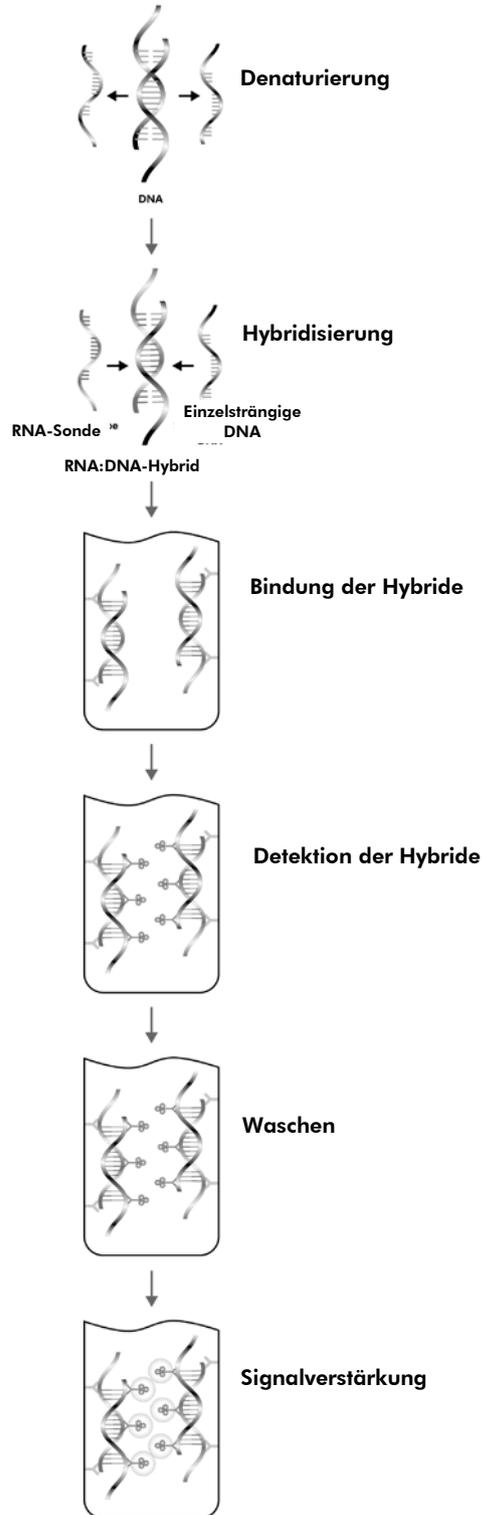
Humane Papillomviren bestehen aus einem ikosaedrischen Viruspartikel (Virion), das ein doppelsträngiges, zirkuläres DNA-Molekül mit einer Länge von 8000 Basenpaaren enthält, das von einem Capsid aus Protein umhüllt ist. Nach Infektion einzelner Epithelzellen verbreitet sich die virale DNA in der gesamten Epithelschicht, intakte Virionen finden sich jedoch nur in den oberen Gewebeschichten. Die virale DNA kommt also entweder in Form der Virionen oder als episomale bzw. integrierte HPV-Sequenzen vor, je nach Art und Schweregrad der Läsion.

Prinzip des Testverfahrens und seine Anwendung

Der *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test basiert auf der HC2-Technologie und ist ein Nukleinsäure-Hybridisierungsassay mit Signalverstärkung mittels Detektion durch eine Chemolumineszenzreaktion, die in Mikrottestplatten erfolgt. Abstrichproben, die die Target-DNA enthalten, hybridisieren mit einer spezifischen HPV-RNA-Sonde. Die resultierenden RNA:DNA-Hybridmoleküle werden in den Vertiefungen (Wells) einer Mikrottestplatte, deren Oberfläche mit spezifischen Antikörpern gegen die RNA:DNA-Hybride beschichtet ist, gebunden. Die immobilisierten Hybride werden dann mit alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörpern, die für die RNA:DNA-Hybride spezifisch sind, zur Reaktion gebracht und mittels eines chemolumineszenten Substrats nachgewiesen. Jedes Antikörper-Molekül ist mit mehreren Molekülen der alkalischen Phosphatase konjugiert. Da mehrere konjugierte Antikörper an ein gebundenes RNA:DNA-Hybridmolekül binden, führt dies zu einer erheblichen Signalverstärkung. Bei der Spaltung des Substrats durch die gebundene alkalische Phosphatase wird Licht emittiert, das in relativen Lichteinheiten (RLU) mit einem *digene* Mikrottestplatten-Luminometer (DML) gemessen wird. Die Intensität des emittierten Lichts zeigt das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Target-DNA in der Probe an.

Ein RLU-Messergebnis in Höhe des Assay-Cut-off-Werts oder darüber zeigt an, dass Hochrisiko-HPV-DNA-Sequenzen in der Probe vorhanden sind. Liegt das RLU-Messergebnis dagegen unterhalb des Assay-Cut-offs, so zeigt dies an, dass die spezifischen Hochrisiko-HPV-DNA-Sequenzen, auf die getestet wurde, nicht vorhanden sind bzw. die Konzentration der HPV-DNA unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

**Workflow beim
Hybrid-Capture-2-Testverfahren**



Probenvorbereitung mit dem QIASymphony SP

Die Verarbeitung von Proben in PreservCyt Lösung kann unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits oder des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits automatisiert mit dem QIASymphony SP durchgeführt werden.

Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Die Probenvorbereitung bzw. -verarbeitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit liefert Probenextrakte in der Hybridisierungs-Mikrotestplatte, die direkt für die automatisierte Testung mit dem Rapid Capture® System (RCS) und dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test weiterverwendet werden können. Der QIASymphony SP führt alle Schritte der Probenvorbereitung für bis zu 88 Proben – in Chargen von jeweils bis zu 24 Stück – in einem einzigen Lauf durch.

Der QIASymphony SP kann 88 PreservCyt Proben in 2 Stunden und 15 Minuten verarbeiten, ohne dass ein Benutzereingriff erforderlich ist, nachdem die Proben dem Gerät zugeführt wurden.

Der QIASymphony SP kann 88 SurePath Proben in 1 Stunde und 45 Minuten verarbeiten, ohne dass ein Benutzereingriff erforderlich ist, nachdem die Proben dem Gerät zugeführt wurden. Unmittelbar nach der Probenverarbeitung durch den QIASymphony SP erfolgt eine 90-minütige Inkubation der Probenextrakte in der Hybridisierungs-Mikrotestplatte auf einem Heizgerät für Mikrotestplatten (Microplate Heater). Während der Inkubation einer aufgereinigten Probe werden die Kalibratoren und Qualitätskontrollen separat in einem Wasserbad denaturiert und werden dann manuell in die erste Spalte der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung pipettiert, wenn die Inkubation der aufgereinigten Probe beendet ist. Die Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony SP und dem QIASymphony DSP HPV Media Kit kann entweder vor Beginn der Zytologieverarbeitung oder nach Beenden der Zytologieverarbeitung durchgeführt werden.

Wichtig: Die Probenextrakte, die nach Verarbeitung von PreservCyt und SurePath Proben mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits vorliegen, dürfen nur unter Verwendung des RCS getestet werden. Die manuelle Testdurchführung mit den Probenextrakten ist nicht validiert worden.

Beschreibende Informationen und die notwendigen Anweisungen zur Durchführung der automatisierten Probenverarbeitung mit dem QIASymphony können Sie den zugehörigen Handbüchern zum QIASymphony und zum *QIASymphony DSP HPV Media Kit* entnehmen, die dabei zusätzlich zur vorliegenden Gebrauchsanweisung zu beachten sind.

Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Die Probenvorbereitung bzw. -verarbeitung mit dem QIASymphony DSP AXpH DNA Kit liefert DNA-Eluat in der Hybridisierungs-Mikrotestplatte, die direkt im Anschluss entweder nach einer manuellen Methode oder mit dem RCS-automatisierten Testverfahren mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test analysiert werden können. Der QIASymphony SP führt alle Schritte der Probenvorbereitung für bis zu 88 Proben – in Chargen von jeweils bis zu 24 Stück – in einem einzigen Lauf durch. Der QIASymphony SP kann 88 Proben in 4 Stunden und 30 Minuten verarbeiten, ohne dass ein Benutzereingriff erforderlich ist, nachdem die Proben dem Gerät zugeführt wurden.

Beschreibende Informationen und die notwendigen Anweisungen zur Durchführung der automatisierten Probenvorbereitung mit dem QIASymphony können Sie den zugehörigen Handbüchern zum QIASymphony und zum *QIASymphony DSP AXpH DNA Kit* entnehmen, die dabei zusätzlich zur vorliegenden Gebrauchsanweisung zu beachten sind.

Testdurchführung mit dem Rapid Capture System (RCS)

Die HPV-Testung bei hohem Probendurchsatz mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kann mit dem RCS durchgeführt werden. Der 4 Platten-Kit (Kat.-Nr. 618111) kann nur zusammen mit dem RCS und nicht für eine manuelle Testdurchführung verwendet werden.

Das RCS ist ein automatisiertes Pipettier- und Verdünnungssystem für allgemeine Zwecke, das zusammen mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test für die HPV-Testung bei hohem Probendurchsatz verwendet werden kann. Dieses System kann bis zu 352 Proben in acht Stunden verarbeiten, einschließlich einer Zeitspanne von 3,5 Stunden, in der kein Benutzereingriff erforderlich ist; innerhalb von 13 Stunden können die Testergebnisse von bis zu 704 Proben erhalten werden.

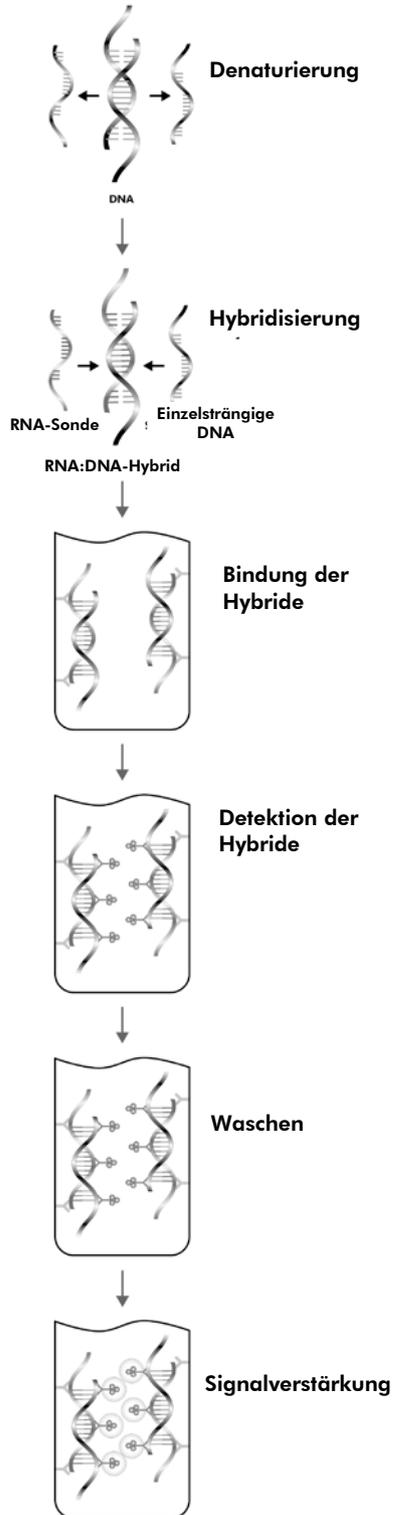
Die Probenvorbereitung wird unabhängig vom RCS durchgeführt, bevor die Proben auf die RCS-Arbeitsplattform gestellt werden. Darüber hinaus erfolgen die Detektion des Chemolumineszenzsignals und Ausgabe der Ergebnisse offline, mit einem DML-Luminometer, das sowohl für die manuelle als auch automatisierte Testung mit dem RCS verwendet werden kann.

Dabei werden alle Arbeitsschritte beim *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test in exakt gleicher Reihenfolge wie beim manuellen Verfahren durchgeführt. Das RCS ermöglicht die (zeitlich) gestaffelte Verarbeitung von bis zu vier Mikrotestplatten, wobei jede Platte mit Proben und den erforderlichen Testkalibratoren und Qualitätskontrollen beschickt ist.

Die Beschreibung und Anweisungen zur Durchführung der automatisierten HPV-Testung mit dem RCS finden Sie in den Handbüchern *Rapid Capture System User Manual* und *Rapid Capture*

System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAasymphony SP Processed Samples, die dabei zusätzlich zur vorliegenden Gebrauchsanweisung zu beachten sind.

**Workflow beim
Hybrid-Capture-2-Testverfahren**



Manuelle Probenvorbereitung |

Automatisiert mit dem Rapid Capture System

Mit dem Kit gelieferte Materialien

1-Plattenkit

Der digene HC2 High-Risk HPV DNA Test für 1 Platte (Kat.-Nr. 5197-1330) ist ausreichend für die Durchführung von 96 Tests.

Bei manueller Testdurchführung mit dem Kit mit einer Platte ist die kleinste empfohlene Anzahl an Tests bei einer Anwendung 24. Bei weniger als 24 Tests pro Anwendung kann die Gesamtzahl der Tests pro Kit aufgrund der limitierten Reagenzienvolumina reduziert sein. Die Anzahl der Patientenergebnisse variiert in Abhängigkeit von der Zahl der Anwendungen pro Kit, wie aus folgender Tabelle ersichtlich:

Anzahl der Anwendungen	Anzahl an Patientenergebnissen
1	88
2	80
3	72
4	64

Bei automatisierter Testdurchführung mit dem RCS mit dem 1-Platten-Kit ist die Testung einer vollen Mikrottestplatte (mit 88 Proben) in einem RCS-Lauf erforderlich, um einen Kit komplett auszunutzen. Auch das Testen einer teilweise beschickten Mikrottestplatte ist zwar möglich; jedoch wird dabei der gesamte Kit wegen des zum Betrieb des Geräts benötigten Leervolumens verbraucht.

4-Platten-Kit

Der digene HC2 High-Risk HPV DNA Test für 4 Platten (Kat.-Nr. 618111) ist ausreichend für die Durchführung von 384 Tests.

Der 4-Plattenkit kann nur für automatisches Testen mit einem RCS verwendet werden. Zum Durchführen von 384 Tests muss der 4-Plattenkit mit 1 der 2 RCS-Läufen verwendet werden. Wenn mehr als 2 Läufe erwünscht sind, kann die Gesamttestzahl pro Kit aufgrund der begrenzten Reagenzvolumina reduziert sein.

Kit-Inhalt

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Katalog-Nr	5197-1330	618111
Anzahl Tests	96	384
Indicator Dye (Indikatorfarbstoff) Enthält 0,05 % (w/v) Natriumazid	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (Denaturierungsreagenz) Verdünnte Natriumhydroxid-Lösung (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent (Sonden-Verdünnungsmittel) Gepufferte Lösung; mit 0,05 % (w/v) Natriumazid	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (Hochrisiko-HPV-Sonde) RNA-Sonde für HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68; in gepufferter Lösung (roter Deckel)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Niedrigrisiko-HPV-Qualitätskontrolle) 5 pg/ml (500.000 Kopien/ml) klonierte HPV-6-DNA und Carrier-DNA in STM; mit 0,05 % (w/v) Natriumazid	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Hochrisiko-HPV-Qualitätskontrolle) 5 pg/ml (500.000 Kopien/ml) klonierte HPV-16-DNA und Carrier-DNA in STM; mit 0,05 % (w/v) Natriumazid	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negativkalibrator) Carrier-DNA in STM; mit 0,05 % (w/v) Natriumazid	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (Hochrisiko-HPV-Kalibrator) 1 pg/ml klonierte HPV-16-DNA und Carrier-DNA in STM; mit 0,05 % (w/v) Natriumazid	1 ml	2 ml
Capture-Mikrotestplatte Beschichtet mit polyklonalen Antikörpern (aus Ziege) gegen RNA:DNA-Hybridmoleküle	1	4

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Katalog-Nr	5197-1330	618111
Anzahl Tests	96	384
Detection Reagent 1 (Detektionsreagenz 1)	12 ml	40 ml
Alkalische-Phosphatase-konjugierte Antikörper gegen RNA:DNA-Hybride in gepufferter Lösung; mit 0,05 % (w/v) Natriumazid		
Detection Reagent 2 (Detektionsreagenz 2)	12 ml	40 ml
CDP-Star® mit Emerald II (Chemolumineszenz-Substrat)		
Wash Buffer Concentrate* (Waschpuffer-Konzentrat)	100 ml	2 x 100 ml
Enthält 1,5 % (w/v) Natriumazid		

* Hinweise zu Gesundheitsschutz und Arbeitssicherheit finden Sie im Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 22.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Wichtig: Stellen Sie sicher, dass die für dieses Verfahren verwendeten Geräte gemäß den Herstellerempfehlungen geprüft und kalibriert wurden.

In-vitro-diagnostische Geräte und Materialien

Von QIAGEN sind nur Geräte und Materialien erhältlich, die mit *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test validiert wurden.

- *digene* Hybrid Capture 2 System (auch als „*digene* HC2-System“ bezeichnet), bestehend aus einem von QIAGEN geprüften Luminometer („DML-Luminometer“), einem von QIAGEN geprüften Computer inklusive Peripheriegeräten (Monitor, Tastatur, Maus, Drucker und Drucker kabel), der *digene* HC2-Systemsoftware (auch „*digene* Assay-Analysesoftware“ genannt), den HPV-Assay-Protokollen für das *digene* HC2-System, der Software zur LumiCheck Plate und dem Handbuch „*digene* HC2 System User Manual“
- Rotationsschüttler des Hybrid-Capture-Systems (Rotary Shaker I)
- Mikrottestplatten-Inkubator I des Hybrid-Capture-Systems (Microplate Heater I)
- automatisiertes Platten-Waschgerät des Hybrid-Capture-Systems (Automated Plate Washer)
- Multi-Vortexer 2 des Hybrid-Capture-Systems (Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2), für mehrere Probenröhrchen (optional) *
- Probentransfer-Rack (auch „Probenkonversions-Rack“) mit Deckel (optional)*
- *digene* Proben-Rack mit Deckel (optional)*
- EXPAND-4 Pipette mit Ständer (optional) †
- Spender für Röhrchen-Verschlussfolie mit Schneidegerät (optional; wird mit dem MST Vortexer 2 verwendet)
- Rapid Capture System (erforderlich bei Verwendung des 4-Platten-Kits; optional bei Verwendung des 1-Platten-Kits)
- Platten-Waschapparat
- Hybridisierungs-Mikrottestplatten
- Mikrottestplatten-Deckel
- Well-Streifen für RCS-Mikrottestplatten*

* Für die automatisierte Testung mit dem RCS erforderlich.

† Benutzerspezifisch; wird für den Transfer von Proben aus STM in die Hybridisierungs-Mikrottestplatte verwendet. Es können auch andere benutzerspezifische expandierbare Mehrkanalpipetten verwendet werden, sofern im expandierten Zustand ein Abstand von 3,2 cm zwischen den Spitzen möglich ist.

- RCS-Reagenzentröge*
- Deckel für RCS-Reagenzentröge*
- RCS-Einmal-Pipettenspitzen*
- RCS-Auflagedeckel*
- Puffer N2 †
- Puffer D2 †
- Blaue Schale des RCS-Waschgeräts ‡
- Extralange Pipettenspitzen
- Probenentnahmeröhrchen
- Probenentnahmeröhrchen-Rack
- Probenentnahmeröhrchen-Schraubdeckel
- Einmal-Reagenzienbehälter
- DuraSeal™ Röhrchen-Verschussfolie
- Mikroreaktionsgefäße für die Hybridisierung §
- Rack für Mikroreaktionsgefäße §
- Platten-Verschussfolien §

Allgemeine Laborausrüstung und -materialien

- Temperierbares Wasserbad (65 ± 2 °C) von ausreichender Größe, um ein Proben-Rack (21 cm x 32 cm x 18 cm [B x T x H]) aufzunehmen
- Tischzentrifuge
- Laborschüttler (Vortex) mit Plattenaufsatz
- Einkanal-Pipetten mit variabler Volumeneinstellung von 20–200 µl und 200–1000 µl
- Repettierpipette nach dem Direktverdrängungsprinzip, z. B. Eppendorf® Repeater®
- 8-Kanal-Pipette: mit variabler Volumeneinstellung von 25–200 µl
- Stoppuhr/Timer
- Natriumhypochlorit-Lösung, 0,5 % (v/v)
- Laborfolie, z. B. Parafilm®
- Einmal-Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere für Einkanal-Pipetten (für Volumina von 20–200 µl und 200–1000 µl)
- Einmal-Pipettenspitzen für Direktverdrängungs-Repettierpipette (12,5, 5,0, 2,5 und 1,25 ml)
- Einmal-Pipettenspitzen für 8-Kanal-Pipette (25–200 µl)
- Kimtowels® Wischtücher oder vergleichbare fusselfreie Papierhandtücher

* Für die automatisierte Testung mit dem RCS erforderlich.

† Für die Testdurchführung mit Proben erforderlich, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden.

‡ Für die automatisierte Testdurchführung mithilfe des RCS mit Proben erforderlich, die unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits präpariert wurden.

§ Für die Durchführung der Hybridisierung unter Verwendung von Mikroreaktionsgefäßen und Wasserbad erforderlich.

- Einmal-Abdecktücher/-folien für Labortische
- pulverfreie Einmal-Handschuhe
- 5-ml- und/oder 15-ml-Rundboden-Polypropylen-Röhrchen mit Schnappdeckel
- Röhrchen-Rack für 10-ml- oder 15-ml-Röhrchen
- konische 50-ml-Röhrchen

Zusätzliche Ausrüstung und Materialien für die Verarbeitung von PreservCyt Proben

 Weitere Hinweise und Anweisungen zur automatisierten Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits finden Sie in dem Kit-Handbuch *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*.

 Weitere Hinweise und Anweisungen zur automatisierten Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits finden Sie in dem Kit-Handbuch *QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*.

 Eine detaillierte Anleitung für die manuelle Probenvorbereitung finden Sie in der Gebrauchsanweisung zum *digene HC2 Sample Conversion Kit*.

Zusätzliche Ausrüstung und Materialien für die Verarbeitung von SurePath Proben

 Weitere Hinweise und Anweisungen zur automatisierten Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits finden Sie in dem Kit-Handbuch *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*.

Für die manuelle Verarbeitung von SurePath Proben sind folgende zusätzliche Ausrüstung und Materialien erforderlich:

- Ausschwingrotor-Zentrifuge, die $800 \pm 15 \times g$ erreicht und konische 15-ml-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen aufnehmen kann
- digene HC2 Sample Conversion Tubes* (HC2-Probenkonversionsröhrchen) oder 15-ml-Röhrchen aus Polypropylen (von VWR® oder Corning®)

Wichtig: Die von QIAGEN erhältlichen *digene HC2 Sample Conversion Tubes* müssen mit dem MST Vortexer 2 oder dem RCS verwendet werden.

- 7-ml-Transferpipetten mit Standardspitze oder vergleichbare Pipetten
- digene Specimen Transport Medium (STM; Probentransportmedium)

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Lesen Sie alle Anweisungen bitte sorgfältig durch, bevor Sie den Test anwenden.

Warnhinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern entnehmen (*Safety Data Sheets, SDSs*). In unserer Online-Sammlung der Materialsicherheits-Datenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Proben

ACHTUNG



Gefahr infektiöser Stoffe

Das Probenmaterial kann infektiöse Erreger enthalten und sollte dementsprechend vorsichtig gehandhabt werden. Betrachten Sie alle Proben als potenziell infektiös..

Keine bekannte Testmethode bietet 100%ige Sicherheit, dass durch eine Probe keine Infektion übertragen wird. Es wird empfohlen, mit Proben humanen Untersuchungsmaterials gemäß den anzuwendenden nationalen und regionalen Richtlinien zur biologischen Sicherheit umzugehen. Halten Sie diese Richtlinien zur biologischen Sicherheit unbedingt bei Probenmaterialien ein, die infektiöse Erreger enthalten oder im Verdacht stehen, solche Erreger zu enthalten.

Diesbezügliche Vorsichtsmaßnahmen sind u. a. folgende, ohne darauf beschränkt zu sein:

- Pipettieren Sie nie mit dem Mund!
- In Bereichen, in denen mit Reagenzien oder Proben umgegangen wird, nicht rauchen, essen oder trinken!
- Tragen Sie beim Umgang mit Reagenzien oder Proben immer pulverfreie Einmal-Handschuhe. Waschen Sie sich nach Durchführung des Tests gründlich die Hände.

- Reinigen und desinfizieren Sie alle Verschüttungen/Spritzer von Probenmaterial mit einem tuberkuloziden Desinfektionsmittel, wie z. B. 0,5 % (v/v) Natriumhypochlorit, oder einem anderen geeigneten Desinfektionsmittel (32, 33).
- Dekontaminieren und entsorgen Sie alle Proben, Reagenzien und andere potenziell kontaminierte Materialien gemäß den regionalen und nationalen Vorschriften.

Nach der Denaturierung und Inkubation kann davon ausgegangen werden, dass die Proben nicht mehr infektiös sind (34); dennoch sollte das gesamte Laborpersonal beim Umgang nach wie vor die nationalen und regionalen Sicherheitsbestimmungen einhalten.

Natriumazid

Einige der verwendeten Reagenzien enthalten Natriumazid. Natriumazid kann ggf. in Laborabflussrohren Blei- oder Kupferazid bilden. Diese Azide können bei heftiger Erschütterung (Hämmern!) explodieren. Spülen Sie daher Ausgüsse nach der Entsorgung von Lösungen, die Natriumazid enthalten, immer gründlich mit Wasser, um die Bildung von Blei- oder Kupferazid zu verhindern. Zur Entfernung derartiger Kontaminationen aus alten Abflussrohren, in denen eine Azid-Akkumulation vermutet wird, empfiehlt die US-amerikanische Behörde für Gesundheitsschutz und Sicherheit am Arbeitsplatz (U.S. Occupational Safety and Health Administration) folgendes Vorgehen:

1. Entleeren Sie den Abfluss-Siphon mit einem Gummi- oder Kunststoffschlauch.
2. Füllen Sie den Siphon vollständig mit 10%iger (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung.
3. Lassen Sie die Lösung ca. 16 Stunden lang einwirken.
4. Spülen Sie anschließend mit reichlich Wasser nach.

Puffer N2

ACHTUNG



Gefahr hochreaktiver Verbindungen

Geben Sie keine Chlorbleiche oder saure Lösungen direkt in eine Lösung oder Flüssigabfall, der Puffer N2 enthält.

Puffer N2 enthält Guanidinhydrochlorid, das sehr reaktive Verbindungen bilden kann, wenn es mit Chlorbleiche zusammengebracht wird.

Wenn Flüssigkeit, die diese Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser. Wenn die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Stoffe

enthält, reinigen Sie die Fläche zuerst mit Laborreinigungsmittel und Wasser und danach mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit.

Automatisierte Testdurchführung mit dem RCS

Für die Durchführung dieses Tests bei hohem Probendurchsatz beachten Sie bitte die Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen im zugehörigen Handbuch *Rapid Capture System User Manual*, die bei Verwendung dieses Systems zusätzlich zu beachten sind.

Risiko- und Sicherheitssätze zu Inhaltsstoffen

Die folgenden Risiko- und Sicherheitssätze (R- und S-Sätze) treffen auf Komponenten des *digene HC2 High-Risk HPV DNA Test Kits* zu:

Wash Buffer Concentrate (Waschpuffer-Konzentrat)



Enthält: Natrium azide. Achtung! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Inhalt/ Behälter einer anerkannten Abfallentsorgungsanlage zuführen.

Denaturation Reagent (Denaturierungsreagenz)



Enthält: sodium hydroxide. Gefahr! Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Inhalt/ Behälter einer anerkannten Abfallentsorgungsanlage zuführen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/ duschen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Unter Verschluss aufbewahren. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen

Probe Diluent (Sonden-Verdünnungsmittel)



Enthält: acetic acid; Polyacrylic acid. Gefahr! Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Inhalt/ Behälter einer anerkannten Abfallentsorgungsanlage zuführen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/ duschen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Unter Verschluss aufbewahren. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

High-Risk HPV Calibrator (High-Risk-HPV-Kalibrator)

Warnung! Bewirkt leichte Hautreizung. Wenn Hautreizung auftritt: Arzt hinzuziehen.

High-Risk HPV Quality Control (High-Risk-HPV-Qualitätskontrolle)

Achtung! Verursacht milde Hautreizungen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Low-Risk HPV Quality Control (Low-Risk-HPV-Qualitätskontrolle)

Achtung! Verursacht milde Hautreizungen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Negative Calibrator (Negativkalibrator)

Achtung! Verursacht milde Hautreizungen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Vorsichtsmaßnahmen

Der Anwender muss immer die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einhalten, wenn er den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchführt:

- Verwenden Sie die Reagenzien nicht weiter, wenn das Haltbarkeitsdatum, das neben dem Symbol  auf dem Umverpackungs-Etikett angegeben ist, oder das Haltbarkeitsdatum der angesetzten Reagenzien abgelaufen ist.
- Werden bei der Testdurchführung die angegebenen Zeitangaben und Temperaturbereiche nicht eingehalten, kann dies zu ungültigen Ergebnissen führen. In einem solchen Fall muss der Test wiederholt werden.
- Die Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests, die Assay-Kalibrierung, Qualitätskontrolle und Interpretation der Probenergebnisse müssen genau eingehalten werden, damit zuverlässige Testergebnisse erhalten werden.
- Es ist wichtig, das jeweils angegebene Reagenzienvolumen exakt zu pipettieren und nach Zugabe jedes Reagenzes gut zu durchmischen. Wird dies nicht beachtet, könnte es zu fehlerhaften Testergebnissen kommen. Vergewissern Sie sich, dass die angegebenen Farbwechsel tatsächlich eintreten, um so bestätigen zu können, dass die genannten Bedingungen eingehalten wurden.
- Mit Ausnahme des Waschpuffer-Konzentrats wurden die Kit-Bestandteile als eine Einheit getestet. Ersetzen Sie daher einzelne Komponenten nicht gegen solche anderer Hersteller oder aus anderen Chargen. Es ist allerdings zulässig, Komponenten aus Kits mit derselben Chargennummer zu kombinieren, um so die erforderlichen Reagenzienvolumina zum Testen mehrerer Mikrottestplatten in einem einzigen RCS-Lauf bereitzustellen.
- Nukleinsäuren sind sehr empfindlich gegenüber Abbau durch Nukleasen aus der Umgebung. Nukleasen befinden sich z. B. auf der menschlichen Haut und auf Oberflächen oder Materialien, die von Personen berührt wurden. Reinigen Sie die Arbeitsflächen und decken Sie sie mit einer Einmal-Labortischfolie ab und tragen Sie bei allen Arbeitsschritten während der Testdurchführung pulverfreie Einmal-Handschuhe.
- Stellen Sie sicher, dass während der Testdurchführung eine Kontamination der Capture-Mikrottestplatte und des Detektionsreagenzes 2 (DR2) mit exogener alkalischer Phosphatase ausgeschlossen ist. Substanzen oder Materialien, die alkalische Phosphatase enthalten könnten, sind das Detektionsreagenz 1 (DR1), Bakterien, Speichel, Haare oder Hautfett bzw. -öl. Besonders wichtig ist es, die Capture-Mikrottestplatte nach dem Waschschrift und während der Inkubation mit DR2 abzudecken, weil exogene alkalische Phosphatase mit DR2 reagieren könnte, was falsch-positive Ergebnisse zur Folge haben würde.
- Schützen Sie das Reagenz DR2 vor zu langer direkter Lichteinwirkung. Verwenden Sie DR2 unmittelbar nach dem Aliquotieren und vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung.

- Bereiten Sie die Repettierpipette vor dem Dispensieren vor, indem Sie das Reagenz ansaugen und regelmäßig kontrollieren, ob sich große Luftblasen im Reservoir befinden. Übermäßig viele große Luftblasen in der Pipettenspitze können eine ungenaue Flüssigkeitsabgabe verursachen; sie können vermieden werden, wenn Sie die Pipettenspitze füllen, die gesamte Flüssigkeit dispensieren und erneut befüllen. Eine detaillierte Bedienungsanleitung entnehmen Sie bitte dem Pipetten-Handbuch.
- Dispensieren Sie DR1 und DR2, indem Sie mit der Mehrkanal-Pipette die reverse Pipettiertechnik anwenden (siehe „Detektion der Hybride“ auf Seite 57). Kontrollieren Sie jede Pipettenspitze der Mehrkanal-Pipette auf ordnungsgemäße(n) Sitz und Füllung.
- Vergewissern Sie sich, dass jedes Well der Capture-Mikrotestplatte gründlich gespült wird (siehe „Waschen“ auf Seite 58). Ein unzureichendes Waschen führt zu einem erhöhten Hintergrundsignal und könnte falsch-positive Ergebnisse verursachen. Reste von Waschpuffer in den Wells der Capture-Mikrotestplatte könnten ein schwächeres Signal oder schlechte Reproduzierbarkeit zur Folge haben.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Kit-Komponenten

Lagern Sie den Kit nach Empfang bei 2–8 °C. Das Waschpuffer-Konzentrat, Denaturierungsreagenz und der Indikatorfarbstoff können nach Belieben bei 2–30 °C gelagert werden. Alle Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert, mit Ausnahme des Denaturierungsreagenzes (DNR), der Sonden-Mischung und des Waschpuffers.

Angesetzte Reagenzien

Nach dem Ansetzen ist das DNR für drei Monate bei 2–8 °C haltbar.

Der Waschpuffer ist nach dem Ansetzen für drei Monate bei 2–30 °C haltbar.

Bei Durchführung des Tests mit PreservCyt Proben, die unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits oder des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden, sind die nicht denaturierten Kalibratoren und Qualitätskontrollen nach Öffnung für drei Monate bei 2–8 °C haltbar.

Bei der Testung von Proben, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden, ist das Denaturierungsreagenz 2 (DNR2) nach dem Ansetzen für acht Stunden bei 15–30 °C haltbar.

Probenentnahme und -vorbereitung

Verwenden Sie für Entnahme und Transport der zervikalen und vaginalen Abstrichproben für den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test eines der folgenden Hilfsmittel für die Probenentnahme:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (bestehend aus Zervix-Abstrichbürste und Probentransportmedium STM)
- *digene* STM zur Aufnahme von Biopsieproben
- ein Abstrichbürste oder eine Kombination aus Abstrichbürste und -spatel, die nach Probenentnahme in PreservCyt Lösung oder SurePath Preservative Fluid (Konservierungsmedium) überführt wird.

Proben, die mit anderen Hilfsmitteln entnommen wurden oder in anderen Transportmedien aufbewahrt und transportiert werden, sind für die Verwendung mit diesem Test nicht qualifiziert worden. Die Untersuchungen zur Leistungscharakteristik dieses Tests wurden ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Entnahme-Hilfsmittel durchgeführt.

Das *digene* HC2 DNA Collection Device darf bei schwangeren Frauen nicht verwendet werden. Zervikale Abstrichproben müssen vor der Applikation von Essigsäure oder Jod entnommen werden, falls eine kolposkopische Untersuchung durchgeführt werden soll. Weitere Verfahrensanweisungen zur Probenentnahme und -handhabung sind der Gebrauchsanweisung zum *digene* HC2 DNA Collection Device zu entnehmen.

Bei Gebärmutterhals- und vaginalen Abstrichproben, die in STM aufgenommen wurden, ist keine Probenkonversion vor Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests erforderlich. Bei Proben, die in PreservCyt Lösung oder SurePath Medium aufgenommen wurden, ist dagegen eine Probenkonversion vor Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests erforderlich.

Zervikale und vaginale Abstrichproben in STM

Wichtig: Eine Gebärmutterhals- oder vaginale Abstrichprobe sollte bei Anwesenheit hoher Konzentrationen einer antimykotischen Creme, eines gelartigen Kontrazeptivums oder einer Vaginalspülung nicht in STM aufgenommen werden.

In STM aufgenommene Proben können bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt und ungekühlt an das Analyselabor verschickt werden. Die Zustellung der Probe sollte in einem isolierten Behälter durch einen Kurierdienst über Nacht oder am übernächsten Tag erfolgen.

Nach Eingang im Testlaboratorium können die Proben bei 2–8 °C gelagert werden, wenn der Test innerhalb einer Woche durchgeführt wird. Falls der Test erst nach Ablauf einer Woche

durchgeführt wird, versiegeln Sie die Deckel der Probenröhrchen mit Laborfolie (z. B. Parafilm) und lagern Sie die Proben für bis zu drei Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein. Wenn Sie die Proben für den Test aus dem Tiefkühlschrank entnehmen, ersetzen Sie die Deckel der Probenentnahmeröhrchen direkt durch neue Schraubdeckel.

Zur Hemmung des Bakterienwachstums und zur Stabilisierung der DNA wurde dem STM ein Konservierungsmittel zugesetzt. Es dient jedoch nicht dazu, die Lebensfähigkeit von Organismen oder Zellen zu erhalten.

Zervixbiopsien

Frisch entnommene Zervixbiopsien mit einem Durchmesser von 2–5 mm können mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test analysiert werden. Kleinere Biopsien ($< 2\text{ mm}$ Durchmesser) sollten nicht verwendet werden. Überführen Sie die Biopsieprobe unverzüglich in 1,0 ml STM, versiegeln Sie den Deckel des Probenröhrchens mit Laborfolie (Parafilm), um ein Aufspringen des Deckels zu verhindern und lagern Sie die Probe gefroren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Biopsieproben können zur Lieferung an das Testlabor über Nacht bei $2\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ versandt und bis zur Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Wenn Sie die Proben für den Test aus dem Tiefkühlschrank entnehmen, ersetzen Sie die Deckel der Probenentnahmeröhrchen direkt durch neue Schraubdeckel.

Zervixproben in PreservCyt Lösung

Wichtig: Überführen Sie eine Zervix-Abstrichprobe für die Probenverarbeitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits nicht in PreservCyt Lösung, wenn von der Anwesenheit hoher Konzentrationen einer antimykotischen Creme, eines vaginalen Gleitgels oder Blut auszugehen ist.

Wichtig: Überführen Sie eine Zervix-Abstrichprobe für die Probenverarbeitung mithilfe des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits nicht in PreservCyt Lösung, wenn mit der Anwesenheit eines gelartigen Kontrazeptivums zu rechnen ist.

Entnehmen Sie die Abstrichproben auf übliche Art und Weise und fertigen Sie die ThinPrep® Abstrichpräparate für den Pap-Test gemäß den Anweisungen des Herstellers an.

Proben in PreservCyt können nach der Entnahme für bis zu 3 Monate bei $2\text{ bis }30\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor der Probenvorbereitung für den digene HC2 High-Risk HPV DNA Test gelagert werden. Proben in PreservCyt dürfen nicht eingefroren werden.

Zur Probenvorbereitung eignen sich folgende Verfahren:

- Automatische Probenvorbereitung mit dem QIAAsymphony SP und dem QIAAsymphony DSP HPV Media Kit
- Das Ergebnis ist eine aufgereinigte Probe (die magnetische Partikel, STM und DNR enthält), die für den Denaturierungsschritt des Tests bereit ist.
- Automatische Probenvorbereitung mit dem QIAAsymphony SP und dem QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kit
- Das Resultat bei Anwendung dieser Probenverarbeitungsmethode ist ein DNA-Eluat, das sofort im Anschluss für den Hybridisierungsschritt des Tests eingesetzt werden kann.
- Manuelle Probenvorbereitung unter Verwendung des digene HC2 Sample Conversion Kits (Probenkonversions-Kit)
- Nach Durchführung der manuellen Probenvorbereitung liegt eine denaturierte Probe vor, die sofort im Anschluss für den Hybridisierungsschritt des Tests verwendet werden kann.

In Abhängigkeit von der angewendeten Methode der Probenverarbeitung sind folgende Probenvolumina erforderlich:

- Für die automatisierte Probenverarbeitung unter Verwendung des QIAAsymphony DSP HPV Media Kits werden 3 ml Probe benötigt.
- Für die automatisierte Probenverarbeitung mithilfe des QIAAsymphony DSP AXpH DNA Kits sind 4 ml Probe erforderlich.
- Die manuelle Probenvorbereitung unter Verwendung des digene HC2 Sample Conversion Kits erfordert ein Mindestvolumen von 4 ml.

Proben mit weniger als dem erforderlichen Probenvolumen nach Vorbereitung des Pap-Tests enthalten nicht genügend Material für den Test und können beim *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Zervixproben in SurePath Konservierungsmedium

Wichtig: Wenn ein empfängnisverhütendes Gel, eine antimykotische Creme oder eine entzündungshemmende Creme vorhanden sind, dürfen keine Zervixproben in SurePath zur Probenvorbereitung mit dem QIAAsymphony DSP HPV Media Kit entnommen werden.

Proben in SurePath Preservative Fluid müssen entsprechend der zutreffenden Gebrauchsanweisungen entnommen werden.

Die Probenvorbereitung von Proben in SurePath kann entweder vor Beginn der Zytologieverarbeitung oder nach Beenden der Zytologieverarbeitung durchgeführt werden.

Vor Beginn der Zytologieverarbeitung verwenden Sie eine Probe aus der ursprünglichen Probe in SurePath, die mit keinem anderen diagnostischen Verfahren verarbeitet wurde, einschließlich dem BD PrepMate® System und dem BD PrepStain® Slide Processor. In diesen Gebrauchsanweisungen sind diese Proben als „Proben in SurePath“ bezeichnet, um Verwirrung zu vermeiden.

Nach Beenden der Zytologieverarbeitung verwenden Sie eine Probe aus dem restlichen Postgradient-Zellpellet, nachdem eine Probe in SurePath entsprechend der zutreffenden Anweisungen für das BD PrepMate System und den BD PrepStain Slide Processor vorbereitet wurde. In diesen Gebrauchsanweisungen sind diese Proben als „Postgradient-Zellpelletproben in SurePath“ bezeichnet, um Verwirrung zu vermeiden.

Zur Probenvorbereitung eignen sich folgende Verfahren:

- Automatische Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony SP und dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Das Ergebnis ist eine denaturierte aufgereinigte Probe (die magnetische Partikel, STM und DNR enthält), die für den Hybridisierungsschritt des Tests bereit ist.

- Automatische Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony SP und dem QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Das Ergebnis ist eine denaturierte aufgereinigte Probe (die magnetische Partikel, STM und DNR enthält), die für den Hybridisierungsschritt des Tests bereit ist.

- Manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath.

Das Ergebnis der manuellen Probenvorbereitung ist eine denaturierte Probe, die bereit ist für den Hybridisierungsschritt des Tests.

Die erforderlichen Probenvolumen hängen folgendermaßen vom Verfahren der Probenvorbereitung ab:

- Die automatische Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit erfordert 950 µl
- Die manuelle Probenvorbereitung erfordert 2,8 ml Postgradient-Zellpelletprobe in SurePath

Eine Verwendung von weniger als dem erforderlichen Volumen kann beim *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zu einem falsch-negativen Ergebnis führen.

Automatische Probenvorbereitung von Proben in SurePath

Proben in SurePath können nach der Entnahme für bis zu 4 Wochen bei 5 bis 25 °C vor der Probenvorbereitung mit dem QIASymphony SP und dem QIASymphony DSP HPV Media Kit. Die verwendete Probe in SurePath darf mit keinem anderen diagnostischen Verfahren verarbeitet

worden sein, einschließlich dem BD PrepMate System und dem BD PrepStain Slide Processor. Die automatische Probenvorbereitung erfordert 950 µl Probe in SurePath.

Automatische Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath

Wichtig: Pipettieren Sie unmittelbar nach der Herstellung des SurePath-Pap-Präparats 2,0 ml SurePath Preservative Fluid in das Zentrifugenröhrchen mit dem Postgradient-Zellpellet. Dies erhält die Integrität des Postgradient-Zellpellets für die Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests.

Das Postgradient-Zellpellet mit SurePath Preservative Fluid kann für bis zu 4 Wochen bei 5 bis 25 °C vor der Probenvorbereitung für den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test gelagert werden. Die automatische Probenvorbereitung erfordert 950 µl Postgradient-Zellpellet in SurePath.

Manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath.

Wichtig: Pipettieren Sie unmittelbar nach der Herstellung des SurePath-Pap-Präparats 2,0 ml SurePath Preservative Fluid in das Zentrifugenröhrchen mit dem restlichen Zellpellet. Dies erhält die Integrität des Postgradient-Zellpellets für die Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests.

Das Postgradient-Zellpellet mit SurePath Preservative Fluid kann für bis zu 4 Wochen bei 2 bis 30 °C vor der Probenvorbereitung für den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test gelagert werden.

In SurePath Medium befindliche Zellpellet-Proben nach Gradientenzentrifugation werden gemäß den Angaben in der vorliegenden Gebrauchsanweisung präpariert. Nach Durchführung der manuellen Probenvorbereitung liegt eine denaturierte Probe vor, die sofort im Anschluss für den Hybridisierungsschritt des Tests verwendet werden kann.

Testverfahren

Vor Beginn durchzuführende Arbeiten

- Lassen Sie für die manuelle Testdurchführung das Mikrotestplatten-Heizgerät (Microplate Heater I) bei einem Kaltstart mindestens 60 Minuten auf $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ äquilibrieren. Falls diese Vorwärmzeit nicht eingehalten wird, könnte es zum Schmelzen der Hybridisierungsmikrotestplatte kommen. Beachten Sie die weiteren Anweisungen im Handbuch Microplate Heater I User Manual.
- Vergewissern Sie sich bei Verwendung eines Wasserbads für die Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte, dass das Wasserbad auf 65 °C temperiert ist und der Wasserstand ausreichend hoch ist, um das gesamte Probenvolumen im Röhrchen einzutauchen.

Vorbereitung der Reagenzien

- Entnehmen Sie die Proben und alle erforderlichen Reagenzien unmittelbar vor Testbeginn aus dem Kühlschrank. Lassen Sie sie für 15–30 Minuten auf $20\text{--}25\text{ °C}$ temperieren. Präparieren Sie in PreservCyt Lösung oder SurePath Medium befindliche Proben, bevor Sie bereits denaturierte Proben und Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibrieren.
- Zum Vereinigen der gebrauchsfertigen Reagenzien für einen RCS-Lauf mit mehreren Platten schütteln Sie die einzelnen Flaschen gründlich und vereinigen Sie dann das entsprechende Reagenzvolumen in einem sauberen konischen Einmal-Polypropylen-Röhrchen.
- Bei der manuellen Testdurchführung werden der Waschpuffer und die Sonden-Mischung jeweils während der einzelnen Assay-Schritte angesetzt. Bei der automatisierten Testdurchführung mit dem RCS werden alle Reagenzien vor dem Starten des RCS-Laufs angesetzt und auf die RCS-Arbeitsplattform gestellt.
- Setzen Sie das DNR und gegebenenfalls das DNR2 an, bevor Sie die anderen Reagenzien ansetzen.
- Verwerfen Sie alle angesetzten Reagenzien (sofern nicht anders angegeben) und nicht benötigte Aliquots von Reagenzien nach Abschluss des Tests.
- Verwenden Sie die folgenden Tabellen 1 bis 5, um das jeweils erforderliche Volumen pro Reagenz auf Basis der Anzahl an Tests oder Mikrotestplatten und in Abhängigkeit von der Testmethode zu bestimmen. Die Volumina für die automatisierte Testdurchführung mit dem RCS beinhalten das für das Gerät benötigte Reagenzien-Leervolumen.

Tabelle 1. Erforderliche Volumen vorbereiteter und gebrauchsfertiger Reagenzien für manuelles Testen von STM-Proben und manuell vorbereiteten Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath

Anzahl Tests/Streifen	Sonden-Mischung	Waschpuffer	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 Liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 Liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 Liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 Liter	12 ml	12 ml

Tabelle 2. Erforderliche Volumen vorbereiteter und gebrauchsfertiger Reagenzien für automatisches Testen mit dem RCS von STM-Proben und manuell vorbereiteten Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath sowie Proben und Postgradient-Zellpelletproben in SurePath, die mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit vorbereitet wurden

Anzahl der Mikrotestplatten	Sonden-Mischung	Waschpuffer	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 Liter	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 Liter	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 Liter	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 Liter	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 Liter	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 Liter	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 Liter	34 ml	34 ml

Tabelle 3. Erforderliche Volumina an anzusetzenden und gebrauchsfertigen Reagenzien für die automatisierte Testdurchführung mit dem RCS bei PreservCyt Proben, die unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits präpariert wurden

Anzahl der Mikrotestplatten	DNR	Sonden-Mischung	Waschpuffer	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 Liter	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 Liter	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 Liter	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 Liter	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 Liter	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 Liter	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 Liter	34 ml	34 ml

Tabelle 4. Erforderliche Volumina an anzusetzenden und gebrauchsfertigen Reagenzien für die manuelle Testdurchführung bei PreservCyt Proben, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden

Anzahl Tests/Streifen	DNR	DNR2	Sonden-Mischung	Waschpuffer	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabelle 5. Erforderliche Volumina an anzusetzenden und gebrauchsfertigen Reagenzien für die automatisierte Testdurchführung mit dem RCS bei PreservCyt Proben, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden

Anzahl der Mikrotestplatten	DNR	DNR2	Sonden-Mischung	Waschpuffer	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 Liter	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 Liter	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 Liter	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 Liter	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 Liter	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 Liter	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 Liter	34 ml	34 ml

Denaturierungsreagenz

Der 1-Plattenkit wird mit 50 ml Denaturierungsreagenz ausgeliefert, und der 4-Plattenkit wird mit 2 x 100 ml Denaturierungsreagenz ausgeliefert. Achten Sie darauf, das Denaturierungsreagenz entsprechend dem mit dem jeweiligen Kit ausgelieferten Volumen anzusetzen.

Wichtig::

- Nach dem Ansetzen ist das DNR für drei Monate bei 2–8 °C haltbar.
- Falls die Farbe schwächer wird, geben Sie drei weitere Tropfen Indikatorfarbstoff hinzu und mischen Sie vor Gebrauch erneut gründlich.

50-ml-Flasche

1. Geben Sie 5 Tropfen Indikatorfarbstoff zu der 50-ml-Flasche mit Denaturierungsreagenz hinzu.

- Mischen Sie gründlich.

Das Denaturierungsreagenz muss eine einheitlich dunkelpurpurrote Farbe aufweisen.

- Schreiben Sie das neue Haltbarkeitsdatum auf die Flasche mit Denaturierungsreagenz.

100-ml-Flasche

- Geben Sie 10 Tropfen Indikatorfarbstoff zu der 100-ml-Flasche mit Denaturierungsreagenz hinzu.
- Mischen Sie gründlich.
Das Denaturierungsreagenz muss eine einheitlich dunkelpurpurrote Farbe aufweisen.
- Schreiben Sie das neue Haltbarkeitsdatum auf die Flasche mit Denaturierungsreagenz.

Denaturierungsreagenz 2

Hinweis: DNR2 ist nur für die Testdurchführung mit PreservCyt Proben erforderlich, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden.

- Beschriften Sie ein sauberes konisches Einmal-Röhrchen aus Polypropylen mit „DNR2“.
- Pipettieren Sie das erforderliche Volumen des Puffers N2 (siehe folgende Tabelle 6) in das beschriftete Röhrchen.

Tabelle 6. Ansetzen des DNR2

Benötigtes Volumen DNR2	Volumen Puffer N2	Volumen Puffer D2	Indikatorfarbstoff
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 Tropfen
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1–2 Tropfen
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 Tropfen
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1–2 Tropfen
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 Tropfen
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1–2 Tropfen
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 Tropfen
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1–2 Tropfen
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 Tropfen
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1–2 Tropfen

- Pipettieren Sie das erforderliche Volumen des Puffers D2 (siehe obige Tabelle 6) in das beschriftete Röhrchen.
- Geben Sie die erforderliche Menge Indikatorfarbstoff (gemäß obiger Tabelle 6) in das beschriftete Röhrchen.

Hinweis: Verwenden Sie den Indikatorfarbstoff, der in dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test-Kit mitgeliefert wird.

- Mischen Sie gründlich, für mindestens 10 Sekunden auf einem Laborschüttler (Vortex).

Hinweis: Nach dem Ansetzen ist das DNR2 für 8 Stunden bei 15–30 °C haltbar.

Sonden-Mischung

- Setzen Sie bei manueller Testdurchführung die Sonden-Mischung während der Inkubation zur Probendenaturierung an (siehe, je nach Methode, den Abschnitt „Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben“ auf Seite 48 oder „Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluate für die manuelle Testung“ auf Seite 46).
- Arbeiten Sie äußerst sorgfältig, um RNase-Kontamination zu vermeiden. Verwenden Sie für das Pipettieren der Sonde Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere.
- Das Sonden-Verdünnungsmittel ist viskos. Vergewissern Sie sich beim Ansetzen der Sonden-Mischungen, dass jeweils ein sichtbarer Flüssigkeitsstrudel beim Mischen entsteht; eine unvollständige Durchmischung könnte eine reduzierte Signalstärke zur Folge haben.
- Wenn mehrere Sonden-Fläschchen für die automatisierte Testdurchführung mit dem RCS kombiniert werden, geben Sie die Sonde in ein Fläschchen zusammen und mischen Sie durch Auf- und Abpipettieren.
 - Zentrifugieren Sie jedes Röhrchen mit Sonde kurz, um Tröpfchen (mit Sonde) aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und die Flüssigkeit am Gefäßboden zu sammeln.
 - Klopfen Sie das Röhrchen leicht auf eine Unterlage, um die Flüssigkeit zu mischen.
 - Bestimmen Sie die erforderliche Menge an Sonden-Mischung:

Empfehlung: Setzen Sie etwas mehr Sonden-Mischung an, um eventuelle Verluste beim Pipettieren (in den Pipettenspitzen) oder durch Anhaftungen an den Gefäßwandungen zu berücksichtigen. Bei den in den Tabellen 1 bis 5 (siehe oben) angegebenen Volumina ist dieses empfohlene zusätzliche Volumen bereits berücksichtigt.

Manuelle Testdurchführung: Bestimmen Sie die erforderlichen Volumina für eine 1:25-Verdünnung der Sonde in Sonden-Verdünnungsmittel, um die Sonden-Mischung anzusetzen (25 µl/Test). Die Volumina sind in der jeweils zutreffenden Tabelle 1 auf Seite 34 bzw. Tabelle 4 auf Seite 35 angegeben.

Automatisierte Testdurchführung mit RCS: Verwenden Sie die in der zutreffenden Tabelle 2 auf Seite 34, Tabelle 3 auf Seite 34 bzw. Tabelle 5 auf Seite **Error! Bookmark not defined.** angegebenen Volumina.

- Beschriften Sie ein neues Einmal-Gefäß mit „Hochrisiko-HPV-Sonden-Mischung“.
Je nach Anzahl der Testansätze wird entweder ein 5-ml- oder ein 15-ml-Schnappdeckel-Rundboden-Röhrchen aus Polypropylen empfohlen.

5. Pipettieren Sie das erforderliche Volumen des Sonden-Verdünnungsmittels (siehe folgende Tabelle 7) in das beschriftete Röhrchen.
6. Pipettieren Sie das erforderliche Volumen der Hochrisiko-HPV-Sonde in das Sonden-Verdünnungsmittel (siehe Tabelle 7, unten); halten Sie dabei die Pipettenspitze direkt oberhalb des Meniskus an die Innenwand des Röhrchens, wenn Sie die Flüssigkeit dispensieren.

Wichtig: Tauchen Sie die Pipettenspitze nicht in das Sonden-Verdünnungsmittel ein.

Tabelle 7. Ansetzen der Sonden-Mischung

Erforderliches Volumen Sonden-Mix	Volumen Sonden-Verdünnungsmittel	Volumen Hochrisiko-HPV-Sonde
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Mischen Sie gründlich für mindestens 5 Sekunden auf einem Laborschüttler (Vortex). Dabei muss sich ein sichtbarer Flüssigkeitsstrudel bilden.

Waschpuffer

- Setzen Sie bei manueller Testdurchführung den Waschpuffer während des Hybrid-Capture-Schritts an (siehe den Abschnitt „Bindung der Hybride“ auf Seite 55).
- Um die Exposition zu minimieren, ist das Waschpuffer-Konzentrat beim Ansetzen mit Wasser zu verdünnen.
- Setzen Sie für die manuelle Mikrottestplatten-Waschmethode 3 Liter Waschpuffer für den Platten-Waschapparat an.

Empfehlung: Reinigen Sie den Platten-Waschapparat einschließlich der Schläuche alle drei Monate mit 0,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung und spülen Sie gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser nach, um eine mögliche Kontamination mit alkalischer Phosphatase aus Bakterien oder Schimmelpilzen zu vermeiden.

- Für den automatisierten Platten-Waschapparat (Automated Plate Washer) setzen Sie den Waschpuffer an und lagern ihn in einem geschlossenen Behälter, oder setzen Sie 1 Liter an und füllen ihn in die Waschlösungsflasche des Platten-Waschapparats.
 - Setzen Sie für die automatisierte Testdurchführung mit dem RCS die jeweils angegebene Menge (siehe Tabelle 2 auf Seite 34, Tabelle 3 auf Seite 34 bzw. Tabelle 5 auf Seite **Error! Bookmark not defined.**) in der RCS-Waschpufferflasche an.
1. Mischen Sie das Waschpuffer-Konzentrat gut und geben Sie das erforderliche Volumen dieses Konzentrats (siehe folgende Tabelle 8) in den jeweiligen Behälter.
 2. Geben Sie dann das erforderliche Volumen destilliertes oder entionisiertes Wasser in den jeweiligen Behälter (siehe unten, Tabelle 8).

Tabelle 8. Ansetzen des Waschpuffers

Erforderliches Volumen Waschpuffer	Volumen Waschpuffer-Konzentrat	Volumen destilliertes oder entionisiertes Wasser
1 Liter	33.3 ml	966.7 ml
2 Liter	66.6 ml	1933.4 ml
3 Liter	100.0 ml	2900.0 ml
6 Liter	200.0 ml	5800.0 ml

3. Bedecken Sie die Öffnungen des Behälters mit einem sauberen, fusselfreien Papierhandtuch und mischen Sie gut.
4. Verschließen Sie den Behälter zur Vermeidung von Kontamination und/oder Verdunstung bzw. setzen Sie ihn in das zugehörige Gerät ein.
5. Beschriften Sie den Waschpuffer-Behälter mit dem neuen Haltbarkeitsdatum.

Hinweis: Der Waschpuffer ist nach dem Ansetzen für drei Monate bei 2–30 °C haltbar.

Erstellen der Platten-Layoutdatei

1. Erstellen Sie mithilfe der *digene* Assay-Analysesoftware und den *digene* Assay-Protokollen für HPV eine Platten-Layoutdatei.

Genauere Anweisungen zum Erstellen der Platten-Layoutdatei mit den korrekten Positionen für die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben finden Sie in dem zugehörigen Software-Handbuch

Hinweise:

- Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben werden in einer Konfiguration mit 8 Vertiefungen pro Spalte getestet.
- Analysieren Sie die Kalibratoren und Qualitätskontrollen in den folgenden Positionen der Mikrottestplatte (siehe Abbildung 1 auf Seite **Error! Bookmark not defined.**):
 - Wiederholproben (Replikate) des negativen Kalibrators (NC) in den Wells A1, B1, C1
 - Wiederholproben des Hochrisiko-HPV-Kalibrators (HRC) in den Wells D1, E1, F1
 - Niedrigrisiko-HPV-Qualitätskontrolle (QC1-LR) in Well G1
 - Hochrisiko-HPV-Qualitätskontrolle (QC2-HR) in Well H1

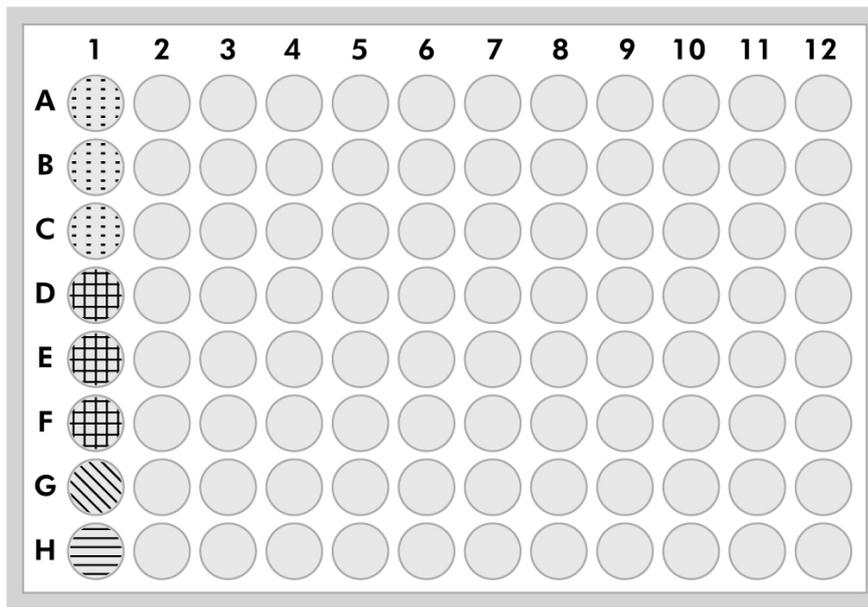


Abbildung 1. Positionen der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben in der Mikrottestplatte.

Wichtig: Bei automatisierter Testdurchführung mit dem RCS verwenden Sie die RCS-spezifischen Assay-Protokolle, um die Platten-Layoutdatei zu erstellen und Ergebnisse zu generieren. Die definierten Parameter der RCS-spezifischen Assay-Protokolle unterscheiden sich von denen der Assay-Protokolle bei manueller Testdurchführung (siehe Abschnitt „Berechnung des Cut-off-Werts“ auf Seite 66).

2. Stellen Sie Kalibratoren, Qualitätskontrollen und die zu testenden Proben in ein Probenentnahmeröhrchen-Rack oder ein Proben-Rack in der Reihenfolge, in der sie getestet werden.

Wichtig: Bei automatisierter Testdurchführung mit dem RCS ist es sehr wichtig, dass das Plattenlayout genau der Beschickung der Platte mit den zu testenden Proben in der korrekten Reihenfolge entspricht, um die Ausgabe fehlerhafter Analyseergebnisse bei den Proben zu vermeiden. Überzeugen Sie sich bei jedem verwendeten Proben-Rack und Deckel, dass die Seriennummern übereinstimmen und beschriften Sie, falls erforderlich, jedes Proben-Rack und jeden Deckel entsprechend der Reihenfolge, in der die Proben im RCS getestet werden. Verwenden Sie einen Markerstift und/oder Etiketten, die sich im Wasserbad bei 65 °C nicht ablösen

Probenvorbereitung

Bei Proben, die in PreservCyt Lösung oder SurePath Medium aufgenommen wurden, ist eine Probenvorbereitung vor Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests erforderlich. Je nach durchgeführter Methode der Probenvorbereitung sind die präparierten Proben für verschiedene Protokollschritte des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests gebrauchsfertig.

Folgende Methoden der Probenvorbereitung sind verfügbar:

- Automatisierte Probenverarbeitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits
- Automatische Probenvorbereitung von Proben und Postgradient-Zellpellets in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Automatisierte Probenverarbeitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits
- Manuelle Probenverarbeitung von PreservCyt Proben
- Manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpellets in SurePath

Probenverarbeitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits

- 📖 Weitere Hinweise und Anweisungen zur Präparation von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits finden Sie in dem Kit-Handbuch *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*.

Wichtig: Die Probenextrakte, die nach Verarbeitung von PreservCyt Proben mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits vorliegen, dürfen nur unter Verwendung des RCS getestet werden. Die manuelle Testdurchführung mit den Probenextrakten ist nicht validiert worden.

Als Resultat der Verarbeitung von PreservCyt Proben mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits liegen die Probenextrakte in einer Hybridisierungs-Mikrotestplatte, in der die Wells der ersten Spalte leer sind, vor. Die Probenextrakte enthalten die Magnet-Partikel, das Proben-Transportmedium (STM) sowie das Denaturierungsreagenz (DNR) und können direkt für die automatisierte Testung mit dem RCS (ab dem Denaturierungsschritt) eingesetzt werden. Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Probenextrakte werden gleichzeitig während der automatisierten Testung im RCS in der Hybridisierungs-Mikrotestplatte denaturiert (siehe den Abschnitt „Denaturierung und Hybridisierung von Proben, die mit dem QIASymphony SP präpariert wurden“ auf Seite 45).

 Bei automatisierter RCS-Testdurchführung mit Proben, die mit dem QIASymphony SP präpariert wurden, beachten Sie bitte die gesamten Anweisungen zur Testdurchführung im Handbuch *Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*.

Probenvorbereitung von Proben in SurePath und Postgradient-Zellpellets in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

 Anweisungen zur Vorbereitung von Proben in SurePath und Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit finden Sie im QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook).

Wichtig: Die Probenextrakte, die nach Verarbeitung von SurePath Proben mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits vorliegen, dürfen nur unter Verwendung des RCS getestet werden. Die manuelle Testdurchführung mit den Probenextrakten ist nicht validiert worden.

Das Ergebnis der Probenvorbereitung von Proben in SurePath und von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit sind Kalibratoren, Qualitätskontrollen und aufgereinigte Proben auf einer Mikrotiterplatte zur Hybridisierung, die bereit ist zum automatischen Testen mit einem RCS beim Hybridisierungsschritt des Tests.

 Bei automatisierter RCS-Testdurchführung mit Proben, die mit dem QIASymphony SP präpariert wurden, beachten Sie bitte die gesamten Anweisungen zur Testdurchführung im Handbuch *Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*.

Probenverarbeitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIAasymphony DSP AXpH DNA Kits

 Eine Anleitung zur Verarbeitung von PreservCyt Proben nach dem AXpH-Protokoll findet sich im Handbuch *QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*.

Als Resultat der Verarbeitung von PreservCyt Proben mithilfe des QIAasymphony DSP AXpH DNA Kits liegen DNA-Eluate in einer Hybridisierungs-Mikrotestplatte vor, in der die Wells der ersten Spalte leer sind. Die DNA-Eluate sind gebrauchsfertig für den Denaturierungsschritt des Tests. Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluate werden gleichzeitig in der Hybridisierungs-Mikrotestplatte denaturiert (siehe den Abschnitt „Denaturierung und Hybridisierung von Proben, die mit dem QIAasymphony SP präpariert wurden“ auf Seite 45).

Manuelle Probenverarbeitung von PreservCyt Proben

 In der Gebrauchsanweisung zum *digene HC2 Sample Conversion Kit* finden Sie eine detaillierte Anleitung für die manuelle Probenverarbeitung der PreservCyt Proben.

Die manuelle Probenverarbeitung von PreservCyt Abstrichproben unter Verwendung des *digene HC2 Sample Conversion Kits* ergibt Proben, die direkt für den Hybridisierungsschritt des Tests verwendet werden können. Präparieren Sie die Kalibratoren und Qualitätskontrollen getrennt voneinander (siehe den Abschnitt „Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben“ auf Seite 48).

Manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpellets in SurePath

Die manuelle Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpellets in SurePath ergibt Proben, die bereit sind für den Hybridisierungsschritt des Tests. Bereiten Sie die Kalibratoren und Qualitätskontrollen getrennt voneinander vor (siehe „Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens“ auf Seite 48).

Wichtig: Wenn das Postgradient-Zellpellet der Probe in SurePath kleiner als 1 ml ist, ist das Postgradient-Zellpellet nicht zum Testen mit dem *digene HC2 High-Risk HPV DNA Test* geeignet, da nach der Zytologie kein SurePath Preservative Fluid hinzugegeben wurde.

1. Äquilibrieren Sie die Postgradient-Zellpellets in SurePath auf Raumtemperatur und vergewissern Sie sich, dass das sichtbare Flüssigkeitsvolumen ungefähr 2,8 ml entspricht.
2. Zentrifugieren Sie die Postgradient-Zellpellets in SurePath in einem Ausschwing-Rotor für 10 \pm 1 Minuten bei $800 \pm 15 \times g$.

3. Entnehmen Sie anschließend die Röhrrchen aus der Zentrifuge.
4. Dekantieren Sie unmittelbar nach der Zentrifugation vorsichtig den Überstand und trocknen Sie jedes Röhrrchen, indem Sie es ca. 3-mal vorsichtig auf ein saugfähiges fusselfreies Papierhandtuch (Kimtowels Wischtücher o. Ä.) abtupfen. Kontrollieren Sie das Pellet in jedem Röhrrchen.

Wichtig: Lassen Sie die Zellpellets im Röhrrchen beim Trockentupfen nicht nach unten gleiten.

5. Stellen Sie die Röhrrchen zurück in das Rack.
6. Pipettieren Sie mit einer Repettier- oder Einkanal-Pipette 200 µl STM zu jedem Pellet.
7. Resuspendieren Sie jedes Pellet, indem Sie jedes Röhrrchen einzeln für ca. 15 Sekunden bei maximaler Drehzahl schütteln (Vortex).

Falls das Pellet schwierig zu resuspendieren ist, schütteln Sie es für weitere 5–30 Sekunden (Vortex) bzw. bis das Pellet sich vom Röhrrchenboden ablöst und sich auflöst.

Hinweis: Die Röhrrchen können ohne Deckel auf dem Vortex geschüttelt werden.

8. Pipettieren Sie mithilfe einer Repettier- oder Einkanal-Pipette 100 µl DNR zu jeder SurePath Probe.

Wichtig: Stellen Sie sicher, dass Sie die Röhrrchenwandungen nicht berühren bzw. dass es nicht zur Kreuzkontamination zwischen den Proben kommen kann.

9. Mischen Sie den Inhalt jedes Röhrrchens gründlich, indem Sie es einzeln für 5 Sekunden bei hoher Drehzahl auf einem Vortex-Mischer schütteln.

Hinweis: Die Röhrrchen können ohne Deckel auf dem Vortex geschüttelt werden.

10. Beschriften Sie die *digene* HC2 Probenkonversionsröhrrchen oder konische 15-ml-Röhrrchen mit der entsprechenden Probenkennung und dem Probentyp (z. B. „SP“ für eine SurePath Probe) und stellen Sie die Röhrrchen in ein Röhrrchen-Gestell.

Hinweis: Bei automatisierter Testdurchführung mit dem RCS müssen die *digene* HC2 Probenkonversionsröhrrchen („Sample Conversion Tubes“) benutzt werden.

11. Überführen Sie das gesamte Volumen mit einer 7-ml-Standard-Einmal-Transferpipette o. Ä. in das entsprechende konische 15-ml-Röhrrchen.
12. Schließen die konischen Röhrrchen jeweils mit einem Deckel und stellen Sie sie in ein Röhrrchen-Gestell.
13. Inkubieren Sie die Röhrrchen für 90 ± 5 Minuten in einem Wasserbad bei 65 ± 2 °C.

Hinweis: Diese Inkubationszeit ist länger als die bei anderen zugelassenen Probentypen erforderliche Zeit.

Falls die Testdurchführung am selben Tag abgeschlossen wird, denaturieren Sie die Kalibratoren und Qualitätskontrollen (siehe Abschnitt „Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben“ auf Seite 48).

14. Entnehmen Sie das Röhrchen-Gestell nach der Inkubation aus dem Wasserbad.

Lassen Sie bei Verwendung eines Proben-Racks dieses nicht abkühlen, bevor Sie den Deckel vom Rack abnehmen. Fahren Sie unverzüglich mit der Testdurchführung fort bzw. entfernen Sie den Rack-Deckel und die DuraSeal Röhrchen-Verschlussfolie.

Hinweis: Falls sich das Proben-Rack abkühlt, könnten die Röhrchen am Rack-Deckel kleben bleiben und es könnte nachfolgend zu einer Verschüttung kommen.

Die präparierten SurePath Proben können:

- Sofort getestet werden (fahren Sie fort mit Abschnitt „Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples“ auf Seite 50)
- gelagert werden (siehe „Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples“ auf Seite 50)

Denaturierung und Hybridisierung von Proben, die mit dem QIASymphony SP präpariert wurden

Als Resultat der Probenverarbeitung mit dem QIASymphony SP liegt eine Hybridisierungs-Mikrotestplatte vor, die zumindest die präparierten Proben enthält.

Falls PreservCyt Proben mit dem QIASymphony SP verarbeitet wurden, ist die erste Spalte der Hybridisierungs-Mikrotestplatte leer. Die in der Mikrotestplatte enthaltenen Proben können direkt für den Denaturierungsschritt des Tests eingesetzt werden. Die Kalibratoren und Qualitätskontrollen werden entweder manuell oder während der automatisierten Testung mit dem RCS in die Hybridisierungs-Mikrotestplatte pipettiert; danach wird der Denaturierungsschritt durchgeführt.

Wenn Proben in SurePath oder Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony SP vorbereitet wurden, enthält die Platte die vorbereiteten Proben zusammen mit den denaturierten Kalibratoren und Qualitätskontrollen, die in die erste Spalte der Mikrotestplatte zur Hybridisierung pipettiert wurden. Die in der Mikrotestplatte enthaltenen Proben können mit den Kalibratoren und Qualitätskontrollen direkt für die automatisierte Testung mit dem RCS, und zwar ab dem Denaturierungsschritt des Tests, eingesetzt werden.

Wichtig: Die im Ergebnis der Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit aufgereinigten Proben können nur unter Verwendung des RCS getestet werden. Die manuelle Durchführung des Tests mit aufgereinigten Proben ist nicht validiert worden.

 Bei automatisierter RCS-Testdurchführung mit Proben, die mit dem QIASymphony SP präpariert wurden, beachten Sie bitte die gesamten Anweisungen zur Testdurchführung im

Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluate für die manuelle Testung

- Dieses Verfahren dient der manuellen Testdurchführung mit Proben von PreservCyt Abstrichproben, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits präpariert wurden. Bei automatisierter RCS-Testdurchführung mit Proben beachten Sie bitte die gesamten Anweisungen zur Testdurchführung im Handbuch *Rapid Capture System User Manual* — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples.
 - Die Denaturierung der Kalibratoren und Qualitätskontrollen wird mit DNR durchgeführt, während für die Denaturierung der DNA-Eluate DNR2 verwendet wird
1. Mischen Sie jede Kalibrator- und Qualitätskontroll-Lösung für 10 Sekunden bei maximaler Drehzahl auf einem Laborschüttler (Vortex).
 2. Drehen Sie jedes Röhrchen auf den Kopf, um in dem Röhrchendeckel befindliches Material wieder mit der restlichen Lösung zu vereinen.
 3. Nehmen Sie die Deckel von den Kalibrator- und Qualitätskontroll-Röhrchen ab und werfen Sie sie.
 4. Pipettieren Sie mithilfe einer Einkanal-Pipette jeweils 50 µl der Kalibrator- oder Qualitätskontroll-Lösung entsprechend dem erstellten Plattenlayout auf den Boden des entsprechenden leeren Wells der Hybridisierungs-Mikrotestplatte.
Falls die Kalibrator- und Qualitätskontroll-Lösungen für weitere Tests verwendet werden sollen, verschließen Sie die Röhrchen mit neuen Schraubdeckeln für Probenentnahmeröhrchen, beschriften Sie sie mit dem neuen Ablaufdatum und lagern Sie sie bei 2–8 °C.
Hinweis: Nach dem Öffnen sind die Kalibratoren und Qualitätskontrollen bei 2–8 °C für drei Monate haltbar.
 5. Mischen Sie die vorbereiteten Reagenzien DNR und DNR2 auf einem Laborschüttler (Vortex) und aliquotieren Sie jedes in einen entsprechend beschrifteten Einmal-Reagenzienbehälter.
Wichtig: Stellen Sie sicher, dass Sie das jeweils richtige Reagenz in die entsprechende Spalte der Eluat-Mikrotestplatte geben.
 6. Pipettieren Sie mithilfe einer 8-Kanal-Pipette jeweils 25 µl DNR in die erste Spalte der Hybridisierungs-Mikrotestplatte, in der sich die Kalibratoren und Qualitätskontrollen befinden
 7. Pipettieren Sie dann mit der 8-Kanal-Pipette jeweils 25 µl DNR2 in jedes Well der Hybridisierungs-Mikrotestplatte, in dem sich ein DNA-Eluat befindet.
 8. Schließen Sie die Hybridisierungs-Mikrotestplatte mit einem Mikrotestplatten-Deckel und schütteln Sie sie für 30 Minuten auf dem Rotationsschüttler I bei 1100 ± 100 U/min.

9. Stellen Sie die Mikrottestplatte in das auf 65 ± 2 °C temperierte Mikrottestplatten-Heizgerät; vermeiden Sie dabei ein Verspritzen der Probenextrakte. Inkubieren Sie die Hybridisierungs-Mikrottestplatte für 45 ± 5 Minuten.

Setzen Sie die Sonden-Mischung während dieser Inkubation an (siehe „Sonden-Mischung“ auf Seite 37 ff.).

10. Entnehmen Sie die Hybridisierungs-Mikrottestplatte aus dem Mikrottestplatten-Inkubator I.

Die denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluate können

- gelagert werden (siehe den folgenden Abschnitt „Optionale Unterbrechung beim Testen von DNA-Eluaten“, Seite 47) oder
- direkt im Anschluss getestet werden (fahren Sie dazu mit „Hybridisierung der DNA-Eluate“ auf Seite 47 fort).

Optionale Unterbrechung beim Testen von DNA-Eluaten

Denaturierte DNA-Eluate, einschließlich Kalibratoren und Qualitätskontrollen können – bedeckt mit einem Mikrottestplatten-Deckel – bei 2–8 °C für zwei Wochen gelagert werden.

Hybridisierung der DNA-Eluate

Falls die Hybridisierungs-Mikrottestplatte mit den denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluaten gelagert wurde: Nehmen Sie den Deckel ab und lassen Sie die Hybridisierungs-Mikrottestplatte auf 20–25 °C äquilibrieren.

1. Schütteln Sie die Sonden-Mischung gründlich (auf einem Vortex) und aliquotieren Sie sie in einen Einmal-Reagenzienbehälter.
2. Pipettieren Sie mithilfe einer 8-Kanal-Pipette sorgfältig 25 µl der Sonden-Mischung in jedes Well der Hybridisierungs-Mikrottestplatte; verwenden Sie dabei für jeden einzelnen Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze.
3. Vermeiden Sie ein Aufspritzen und das Berühren der Wells der Hybridisierungs-Mikrottestplatte.
4. Schließen Sie die Hybridisierungs-Mikrottestplatte mit einem Mikrottestplatten-Deckel und schütteln Sie sie für 3 ± 2 Minuten auf dem Rotationsschüttler I bei 1100 ± 100 U/min.
5. Nach diesem Mischvorgang sollten die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und DNA-Eluate eine gelbe Farbe annehmen.
6. Bei Proben, die violett bleiben, wurde eventuell nicht die richtige Menge an Sonden-Mischung zugegeben. Pipettieren Sie zusätzliche 25 µl der Sonden-Mischung in die violetten

Proben und schütteln Sie sie erneut. Falls eine Probe dann immer noch violett ist, führen Sie mit dieser Abstrichprobe den gesamten Test erneut durch

7. Stellen Sie die Mikrottestplatte in das auf 65 ± 2 °C temperierte Mikrottestplatten-Heizgerät; vermeiden Sie dabei ein Verspritzen der Probenextrakte. Inkubieren Sie die Hybridisierungs-Mikrottestplatte für 60 ± 5 Minuten.
8. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Bindung der Hybride“ auf Seite 55 fort.

Denaturierung und Hybridisierung von STM-Proben und manuell vorbereiteten Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath

- Beim Testen manuell vorbereiteter Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath ist der Denaturierungsschritt für die Proben nicht erforderlich. Die für den Test erforderlichen Kalibratoren und Qualitätskontrollen sind jedoch gemäß den folgenden Anweisungen zu denaturieren.
- Einige in STM aufgenommene Abstrichproben können Blut oder anderes biologisches Material enthalten, das den Farbwechsel der Proben nach DNR-Zugabe maskieren bzw. beeinflussen kann. Proben mit einer dunklen Farbe vor Zugabe des DNR ergeben eventuell keinen deutlichen Farbwechsel bei diesem Schritt. In diesen Fällen beeinflusst das Ausbleiben eines deutlichen Farbwechsels nicht die Ergebnisse des Tests. Bestätigen Sie eine ordnungsgemäße Durchmischung, indem Sie den Farbwechsel bei den Kalibratoren und Qualitätskontrollen beobachten.

Denaturierung der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben

- Do not remove the specimen collection device from the specimen tube at any time.
- To avoid false-positive results, it is critical that all specimen material come into contact with the DNR. Mixing after the DNR addition is a critical step.
- Bei STM-Proben, die mit dem MST-Vortexer-2-Verfahren denaturiert wurden, muss das Verfahren „Hybridisierung mit einer Mikrotiterplatte und dem Microplate Heater I“ auf Seite 51 angewendet werden. Das Verfahren „Hybridisierung mit Mikroröhrchen und Wasserbad“ (Seite 53) ist für STM-Proben, die mit dem MST Vortexer 2 denaturiert wurden, nicht validiert worden.

1. Nehmen Sie die Deckel von den Röhren ab und werfen Sie sie.

Wichtig: Betrachten Sie die von den STM-Probenröhren abgenommenen Deckel als potenziell infektiös (weitere Informationen, siehe „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ auf Seite 22).

2. Pipettieren Sie das angegebene Volumen an DNR (gemäß folgender Tabelle 9) mithilfe einer Pipettier- oder verstellbaren Pipette in die Röhren.

Stellen Sie sicher, dass Sie die Röhrenwandungen nicht berühren bzw. dass es nicht zur Kreuzkontamination zwischen den Proben kommen kann.

Wichtig: Der 1-Platten-Kit und der 4-Platten-Kit haben unterschiedliche Volumina an Hochrisiko-HPV-Kalibrator ("High-Risk HPV Calibrator"). Achten Sie darauf, das korrekte Volumen Denaturierungsreagenz (DNR) zuzugeben.

Hinweis: Das zugegebene Volumen DNR entspricht der Hälfte des Flüssigkeitsvolumens in dem Röhren

Tabelle 9. Zugabe des DNR

Kalibrator, Qualitätskontrolle oder STM-Probe	Benötigtes Volumen DNR
Negativer Kalibrator, 2 ml	1000 µl
Hochrisiko-HPV-Kalibrator, 1 ml	500 µl
Hochrisiko-HPV-Kalibrator, 2 ml	1000 µl
Niedrigrisiko-HPV- oder Hochrisiko-HPV-Qualitätskontrolle, 1 ml	500 µl
STM-Probe, 1 ml	500 µl

3. Mischen Sie den Inhalt der Röhren entweder mit dem MST-Vortexer-2-Verfahren oder mit dem manuellen Vortex-Verfahren für individuelle Röhren.

MST-Vortexer-2-Verfahren

- a. Versiegeln Sie die Röhren mit DuraSeal Röhren-Verschlussfolie, indem Sie die Folie über die Röhren im Proben-Rack ziehen.
- b. Setzen Sie den Rack-Deckel auf die mit Folie versiegelten Röhren und arretieren Sie ihn mit den beiden seitlich angebrachten Klemmbügeln. Schneiden Sie die Folie mit dem Schneidegerät ab.
- c. Bringen Sie den mit rotem Handgriff versehenen Hebel in die obere, horizontale Position ("UP").
- d. Stellen Sie das Proben-Rack sicher in die Führung des MST Vortexer 2 und mit der größten ausgesparten Ecke des Racks in der vorderen rechten Ecke des Geräts. Sichern Sie das Proben-Rack durch Drehen des Hebels mit dem roten Handgriff in die untere, vertikale Position ("DOWN").
- e. Vergewissern Sie sich, dass die Drehzahl auf 100 (maximale Drehzahl) eingestellt und der MST Vortexer 2 eingeschaltet ("ON") ist.
- f. Schütteln Sie die Röhren für 10 Sekunden.
- g. Schalten Sie den MST Vortexer 2 aus.

- h. Entnehmen Sie das Proben-Rack aus dem MST Vortexer 2, nachdem Sie den Hebel mit dem roten Handgriff in die obere Position gebracht haben.

Manuelle Methode, Röhrchen einzeln schütteln

- a. Versetzen Sie die Röhrchen mit neuen Schraubdeckeln für Probenentnahmeröhrchen.
- b. Mischen Sie den Inhalt jedes Röhrchens gründlich, indem Sie es einzeln für 5 Sekunden bei hoher Drehzahl auf einem Vortex-Mischer schütteln.
Wichtig: Während des Mischvorgangs muss ein sichtbarer Flüssigkeitsstrudel erkennbar sein, der die gesamte innere Oberfläche des Röhrchens benetzt.
- c. Drehen Sie jedes Röhrchen einmal auf den Kopf, um das Innere von Röhrchen, Deckel und Rand zu benetzen.
- d. Stellen Sie das Röhrchen zurück in das Rack.

Die Flüssigkeit im Röhrchen sollte sich violett verfärben.

4. Inkubieren Sie die Röhrchen in einem Gestell für 45 ± 5 Minuten in einem Wasserbad bei 65 ± 2 °C.

Setzen Sie bei manueller Testdurchführung während dieser Inkubation die Sonden-Mischung an (siehe „Sonden-Mischung“ auf Seite 37).

5. Entnehmen Sie die Röhrchen nach der Inkubation aus dem Wasserbad.

Lassen Sie bei Verwendung eines Proben-Racks dieses nicht abkühlen, bevor Sie den Deckel vom Rack abnehmen. Fahren Sie unverzüglich mit der Testdurchführung fort bzw. entfernen Sie den Rack-Deckel und die DuraSeal Röhrchen-Verschlussfolie.

Hinweis: Falls sich das Proben-Rack abkühlt, könnten die Röhrchen am Rack-Deckel kleben bleiben und es könnte nachfolgend zu einer Verschüttung kommen.

Die denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben können:

- gelagert werden (siehe „Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples“ auf Seite 50)
- sofort getestet werden (fahren Sie fort mit Abschnitt „Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples“ auf Seite 50)

Optionale Unterbrechung beim Testen vorbereiteter STM-Proben und manuell vorbereiteter Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath

Wichtig: Lagern oder verschicken Sie denaturierte Proben nicht auf Trockeneis.

Alle vorbereiteten Proben, einschließlich Kalibratoren und Qualitätskontrollen, können über Nacht bei $2-8$ °C oder bei -20 °C für bis zu drei Monate gelagert werden. Maximal dürfen die Proben

3-mal eingefroren und wiederaufgetaut werden, wobei sie bei einem Auftauzyklus maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen dürfen.

Versiegeln Sie die Probenröhrchen bei Übernacht-Lagerung bei 2–8 °C im Proben-Rack mit DuraSeal Röhrchen-Verschlussfolie und setzen Sie den Rack-Deckel auf.

Bei Lagerung bei –20 °C im Proben-Rack nehmen Sie den Rack-Deckel und die DuraSeal Röhrchen-Verschlussfolie ab und verschließen die Röhrchen mit einem passenden Deckel.

Hybridisierung vorbereiteter STM-Proben und manuell vorbereiteter Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath

 Zum automatischen Testen mit dem RCS von STM-Proben oder manuell vorbereiteten Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath beachten Sie bitte die Anweisungen im Rapid Capture System User Manual zum vollständigen Test.

Wenn die denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder Proben gelagert wurden, müssen sie auf 20 bis 25 °C äquilibriert werden. Wenn sie in einem Probengestell gelagert wurden, müssen die Deckel von den Röhrchen entfernt werden und entsorgt werden.

- Für STM-Proben und manuell vorbereitete Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath sind zwei Verfahren verfügbar: „Hybridisierung mit einer Mikrotiterplatte und dem Microplate Heater I“ und „Hybridisierung mit Mikroröhrchen und Wasserbad“.
- Bei STM-Proben, die mit dem MST-Vortexer-2-Verfahren denaturiert wurden, muss „Hybridisierung mit einer Mikrotiterplatte und dem Microplate Heater I“ auf Seite 51 verwendet werden. „Hybridisierung mit Mikroröhrchen und Wasserbad“ (Seite 53) ist für STM-Proben, die mit dem MST Vortexer 2 denaturiert wurden, nicht validiert worden.
- Die Sonden-Mischung ist viskos. Stellen Sie sicher, dass die Sonden-Mischung gründlich gemischt und die erforderliche Menge vollständig in jedes Well der Hybridisierungs-Mikrotestplatte bzw. -Mikroreaktionsgefäße abgegeben wird.
- Vermeiden Sie es, beim Probentransfer in die Hybridisierungs-Mikrotestplatte oder -Mikroreaktionsgefäße die Wandung der Mikrotestplatten-Wells bzw. der Mikroreaktionsgefäße zu berühren, da es zu falsch-positiven Testergebnissen kommen kann, wenn die Proben nicht sorgfältig pipettiert werden. Die Bildung von Luftblasen ist zu vermeiden bzw. zu minimieren. Verwenden Sie für jeden Flüssigkeitstransfer eine saubere, extralange Pipettenspitze, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Hybridisierung unter Verwendung von Mikrottestplatte und Mikrottestplatten-Inkubator I

1. Beschriften Sie eine Hybridisierungs-Mikrottestplatte.
2. Mischen Sie nach einer der folgenden Methoden auf einem Laborschüttler (Vortex):

Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder STM-Proben mit Multi-Schüttler (MST Vortexer 2)

- a. Versiegeln Sie die Röhren, falls erforderlich, mit DuraSeal Verschlussfolie und fixieren Sie den Rack-Deckel auf dem Proben-Rack.
- b. Schütteln Sie das Proben-Rack für mindestens 5 Sekunden bei maximaler Drehzahl.
- c. Stellen Sie das Proben-Rack danach auf einem Labortisch ab und entriegeln Sie die Arretierungen. Heben Sie den Rack-Deckel ungefähr 1 cm an und bewegen Sie ihn vorsichtig nach links und rechts, um Röhren zu lösen, die eventuell an der DuraSeal Verschlussfolie haften. Entfernen Sie den Rack-Deckel, indem Sie ihn gerade nach oben heben, sodass das Proben-Rack freigegeben wird.
- d. Lösen Sie sorgfältig die DuraSeal Röhren-Verschlussfolie von dem Rack-Deckel ab und werfen Sie sie.

Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt oder SurePath mit MST Vortexer 2

- a. Versiegeln Sie die Röhren, falls erforderlich, mit DuraSeal Verschlussfolie und fixieren Sie den Rack-Deckel auf dem Proben-Rack.
- b. Schütteln Sie das Proben-Rack (Probenkonversions-Rack) für mindestens 10 Sekunden bei maximaler Drehzahl.
- c. Stellen Sie das Proben-Rack danach auf einem Labortisch ab und entriegeln Sie die Arretierungen. Heben Sie den Rack-Deckel ungefähr 1 cm an und bewegen Sie ihn vorsichtig nach links und rechts, um Röhren zu lösen, die eventuell an der DuraSeal Verschlussfolie haften. Entfernen Sie den Rack-Deckel, indem Sie ihn gerade nach oben heben, sodass das Proben-Rack freigegeben wird.
- d. Lösen Sie sorgfältig die DuraSeal Röhren-Verschlussfolie von dem Rack-Deckel ab und werfen Sie sie.

Beliebiger Probentyp auf Laborschüttler (Vortex)

- a. Schütteln Sie jedes Röhren einzeln für mindestens 5 Sekunden.

3. Pipettieren Sie mithilfe der EXPAND-4-Pipette oder einer Einkanal-Pipette mit extralanger Pipettenspitze jeweils 75 µl jeder Kalibrator-, Qualitätskontroll- oder Probenlösung entsprechend dem Plattenlayout auf den Boden eines leeren Wells der Hybridisierungs-Mikrottestplatte.

Wenn die Proben gelagert werden sollen, verschließen Sie die denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben mit neuen Schraubdeckeln für Probenentnahmeröhren und setzen Sie bei den Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath die Originaldeckel auf die jeweilige Probe.

Hinweis: Lagern Sie die Proben entsprechend der Zeitgrenzen, die im Abschnitt „Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples“ auf Seite 50 angegeben sind.

4. Setzen Sie nach Überführen der letzten Probe einen Deckel auf die Hybridisierungs-Mikrotestplatte und inkubieren Sie sie für 10 Minuten bei 20–25 °C.
5. Schütteln Sie die Sonden-Mischung gründlich (auf einem Vortex) und aliquotieren Sie sie in einen Einmal-Reagenzienbehälter.
6. Pipettieren Sie mithilfe einer 8-Kanal-Pipette sorgfältig 25 µl der Sonden-Mischung in jedes Well der Hybridisierungs-Mikrotestplatte; verwenden Sie dabei für jeden einzelnen Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze.

Vermeiden Sie ein Aufspritzen und das Berühren der Wells der Hybridisierungs-Mikrotestplatte.

7. Schließen Sie die Hybridisierungs-Mikrotestplatte mit einem Mikrotestplatten-Deckel und schütteln Sie sie für 3 ± 2 Minuten auf dem Rotationsschüttler I bei 1100 ± 100 U/min. Nach dem Schütteln sollten sich die Kalibratoren, Qualitätskontrollen, STM-Proben und SurePath Proben gelb verfärben, während PreservCyt Proben eine rosa Färbung annehmen sollten.

Bei Proben, die violett bleiben, wurde eventuell nicht die richtige Menge an Sonden-Mischung zugegeben. Pipettieren Sie zusätzliche 25 µl der Sonden-Mischung in die violetten Proben und schütteln Sie sie erneut. Falls eine Probe dann immer noch violett ist, führen Sie mit dieser Abstrichprobe den gesamten Test erneut durch.

8. Stellen Sie die Mikrotestplatte in das auf 65 ± 2 °C temperierte Mikrotestplatten-Heizgerät; vermeiden Sie dabei ein Verspritzen der Proben. Inkubieren Sie die Hybridisierungs-Mikrotestplatte für 60 ± 5 Minuten.
9. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Bindung der Hybride“ auf Seite 55 fort.

Hybridisierung unter Verwendung von Mikroreaktionsgefäßen und Wasserbad

1. Beschriften Sie die erforderliche Anzahl sauberer Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäße und stellen Sie sie in das Mikroreaktionsgefäß-Rack.
2. Schütteln Sie jedes Kalibrator-, Qualitätskontroll- und Probenröhrchen einzeln für mindestens 5 Sekunden (auf einem Vortex), bevor Sie die Probe entnehmen.
3. Pipettieren Sie mithilfe einer Einkanal-Pipette mit extralanger Pipettenspitze jeweils 75 µl jeder Kalibrator-, Qualitätskontroll- oder Probenlösung entsprechend dem Plattenlayout auf den Boden des entsprechenden Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäßes.

Wenn die Proben gelagert werden sollen, verschließen Sie die denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben mit neuen Schraubdeckeln für Probenentnahmeröhrchen und setzen Sie bei den Postgradient-Zellpelletproben in PreservCyt und SurePath die Originaldeckel auf die jeweilige Probe.

Hinweis: Lagern Sie die Proben entsprechend der Zeitgrenzen, die im Abschnitt „Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples“ auf Seite 50 angegeben sind.

4. Inkubieren Sie nach Überführen der letzten Probe die Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäße für 10 Minuten bei 20–25 °C.
5. Schütteln Sie die Sonden-Mischung gründlich (auf einem Vortex) und aliquotieren Sie sie in einen Einmal-Reagenzienbehälter.
6. Pipettieren Sie mithilfe einer 8-Kanal-Pipette sorgfältig 25 µl der Sonden-Mischung in jedes Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäß; verwenden Sie dabei für jede Reihe eine neue Pipettenspitze.

Vermeiden Sie ein Aufspritzen und das Berühren der Wandungen der Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäße.

Vergewissern Sie sich durch Sichtkontrolle des Racks von unten, dass in alle Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäße das korrekte Volumen Sonden-Mischung pipettiert wurde.

7. Bedecken Sie die Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäße mit einer Platten-Verschlussfolie. Setzen Sie den Rack-Deckel auf das Rack. Schütteln Sie das Mikroreaktionsgefäß-Rack für 3 ± 2 Minuten auf dem Rotationsschüttler I bei 1100 ± 100 U/min

Nach dem Schütteln müssen sich die Kalibratoren, Qualitätskontrollen, STM-Proben und Postgradient-Zellpelletproben in SurePath gelb färben, und die Proben in PreservCyt müssen sich rosa färben.

Bei Proben, die violett bleiben, wurde eventuell nicht die richtige Menge an Sonden-Mischung zugegeben. Pipettieren Sie zusätzliche 25 µl der Sonden-Mischung in die violetten Proben und schütteln Sie sie erneut. Falls eine Probe dann immer noch violett ist, führen Sie mit dieser Abstrichprobe den gesamten Test erneut durch.

8. Inkubieren Sie das Mikroreaktionsgefäß-Rack für 60 ± 5 Minuten in einem Wasserbad bei 65 ± 2 °C.

Stellen Sie sicher, dass der Wasserstand in dem Wasserbad ausreichend hoch ist, um das gesamte Probenvolumen in den Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäßen einzutauchen.

Hinweis: Das Mikroreaktionsgefäß-Rack wird im Wasserbad flottieren.

9. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Bindung der Hybride“ auf Seite 55 fort.

Bindung der Hybride

1. Entnehmen alle nicht benötigten Wells der Capture-Mikrotestplatte aus dem Plattenrahmen.
2. Überführen Sie diese unbenutzten Wells der Capture-Mikrotestplatte in den Originalbeutel und verschließen Sie ihn wieder.
3. Nummerieren Sie mit einem Marker-Stift der Reihe nach die einzelnen Spalten und beschriften Sie die Capture-Mikrotestplatte mit einer entsprechenden Kennung.

Die Proben werden entsprechend dem erstellten Plattenlayout in die Wells der Capture-Mikrotestplatte gegeben.

4. Entnehmen Sie die Hybridisierungs-Mikrotestplatte aus dem Mikrotestplatten-Inkubator I bzw. das Mikroreaktionsgefäße-Rack aus dem Wasserbad.

Nehmen Sie sofort den Deckel von der Mikrotestplatte und setzen Sie ihn auf einer sauberen Fläche ab bzw. entfernen Sie den Rack-Deckel und ziehen Sie von dem Mikroreaktionsgefäße-Rack langsam die Platten-Verschlussfolie ab.

5. Überführen Sie mit einer 8-Kanal-Pipette die gesamten Inhalte (jeweils ca. 100 µl) aus den Wells der Hybridisierungs-Mikrotestplatte bzw. aus den Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäßen in die entsprechenden Wells der Capture-Mikrotestplatte (auf den Boden der Wells pipettieren).

Verwenden Sie für jeden Transfer neue Pipettenspitzen und lassen Sie alle Pipettenspitzen leerlaufen, um einen vollständigen Probentransfer zu gewährleisten. Falls gewünscht, können Sie die Pipette stabilisieren, indem Sie die Pipettenspitzen mittig auf dem oberen Rand der Wells der Capture-Mikrotestplatte ablegen (siehe unten, Abbildung 2).

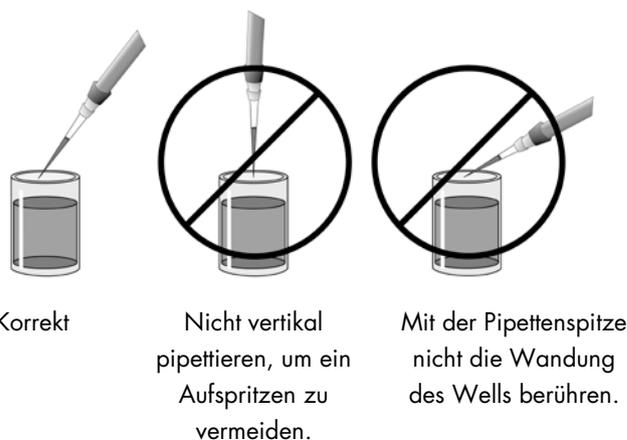


Abbildung 2. Korrektes Pipettieren.

6. Verschließen Sie die Capture-Mikrotestplatte mit dem Deckel oder einer neuen Platten-Verschlussfolie und schütteln Sie sie bei

20–25 °C für 60 ± 5 Minuten auf dem Rotationsschüttler (Rotary Shaker I) bei einer Drehzahl von 1100 ± 100 U/min.

Setzen Sie den Waschpuffer während dieser Inkubation an (siehe „Waschpuffer“ auf Seite 38 ff.).

7. Entnehmen Sie die Capture-Mikrotestplatte nach Abschluss der Inkubation aus dem Rotationsschüttler und entfernen Sie vorsichtig den Deckel bzw. die Platten-Verschlussfolie.
8. Dekantieren Sie die Flüssigkeit aus den Wells der Capture-Mikrotestplatte in einen Ausguss; drehen Sie dazu die Platte über dem Ausguss vollständig um und schütteln Sie sie heftig nach unten.

Wichtig: Drehen Sie die Platte nicht wieder um.

Stellen Sie sicher, dass es nicht zum Auf-/Zurückspritzen der Flüssigkeit kommt, beispielsweise indem Sie zu nahe am Boden des Ausgusses dekantieren.

9. Tupfen Sie die Platte trocken, indem Sie sie 2- bis 3-mal fest auf fusselfreie Papierhandtücher (z. B. Kimtowels Wischtücher) klopfen.

Vergewissern Sie sich, dass die Flüssigkeit vollständig aus den Wells der Capture-Mikrotestplatte entfernt und die Oberseite der Platte trocken ist.

10. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Detektion der Hybride“ auf Seite 57 fort.

Detektion der Hybride

- Geben Sie die Reagenzien von links nach rechts mit einer 8-Kanal-Pipette in die Wells der Capture-Mikrotestplatte. Wischen Sie die Pipettenspitzen kurz auf dem Einmal-Reagenzienbehälter ab, um überschüssiges Reagenz vor der Abgabe in die Capture-Mikrotestplatte zu entfernen.
 - Falls keine 8-Kanal-Pipette zur Verfügung steht, können Sie stattdessen auch eine Repletierpipette benutzen. Aliquotieren Sie das Reagenz DR1 in ein Polypropylen-Röhrchen von geeigneter Größe für das erforderliche Volumen.
 - Es wird empfohlen, die reverse Pipettiertechnik anzuwenden, um die Gleichmäßigkeit der Reagenzienabgabe zu verbessern. Die Methode wird unten beschrieben.
 - Falls gewünscht, können Sie die Pipette stabilisieren, indem Sie die Pipettenspitzen mittig auf dem oberen Rand der Wells der Capture-Mikrotestplatte ablegen. Stellen Sie sicher, dass Sie nicht die Wandungen der Wells der Capture-Mikrotestplatte berühren, da dies eine Kreuzkontamination der Proben verursachen könnte (siehe Abbildung 2 auf Seite **Error! Bookmark not defined.**).
1. Mischen Sie das DR1-Reagenz gründlich und überführen Sie sorgfältig das erforderliche Volumen (siehe Tabelle 1 auf Seite 34 bzw. Tabelle 4 auf Seite 35) in einen sauberen Einmal-Reagenzienbehälter.
 2. Pipettieren Sie 75 µl DR1 in jedes Well der Capture-Mikrotestplatte; wenden Sie dabei wie folgt die reverse Pipettiertechnik an:
 - a. Bringen Sie die Pipettenspitzen an der 8-Kanal-Pipette an; vergewissern Sie sich, dass alle Spitzen fest sitzen.
 - b. Drücken Sie den Pipettenkolben über den ersten Druckpunkt hinaus bis zum zweiten Druckpunkt.
 - c. Tauchen Sie die Pipettenspitzen in das Reagenz ein.
 - d. Lassen Sie den Kolben langsam los, sodass sich die Spitzen mit Reagenz füllen.
 - e. Dispensieren Sie das Reagenz in die Mikrotestplatten-Wells, indem Sie den Kolben bis zum ersten Druckpunkt drücken. Den Kolben weiterhin gedrückt haltend, tauchen Sie die Pipettenspitzen wieder in das Reagenz ein.
 - f. Füllen Sie die Pipettenspitzen erneut und wiederholen Sie diesen Vorgang, bis alle Mikrotestplatten-Wells gefüllt sind.

Vergewissern Sie sich, dass alle Wells der Capture-Mikrotestplatte gefüllt sind, indem Sie die Intensität der rosa Farbe kontrollieren. Alle Wells der Capture-Mikrotestplatte sollten eine vergleichbar intensive rosa Farbe zeigen.

3. Bedecken Sie die Capture-Mikrotestplatte mit einem Mikrotestplatten-Deckel oder sauberer Laborfolie (z. B. Parafilm o. Ä.) und inkubieren Sie sie für 30–45 Minuten bei 20–25 °C.
4. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Waschen“ auf Seite 58 fort.

Waschen

Waschen Sie die Capture-Mikrotestplatte nach einer der beiden im Folgenden beschriebenen Methoden.

Waschen mit dem Automated Plate Washer

Lassen Sie den Automated Plate Washer immer eingeschaltet. Vergewissern Sie sich, dass die Spüllösungsflasche gefüllt und die Flüssigabfallflasche leer ist. Bei diesem automatisierten Platten-Waschgerät wird das System zu Reinigungszwecken regelmäßig gespült. Weitere Anweisungen können Sie dem Handbuch *Automated Plate Washer User Manual* entnehmen.

- Vergewissern Sie sich, dass die Waschlösungsflasche mindestens bis zur 1-Liter-Markierung mit Waschpuffer gefüllt ist. Ist dies nicht der Fall, setzen Sie Waschpuffer an (siehe „Waschpuffer“ auf Seite 38 ff.).
 - Vergewissern Sie sich, dass die Spüllösungsflasche mit entionisiertem oder destilliertem Wasser gefüllt ist.
 - Überzeugen Sie sich davon, dass die Flüssigabfallflasche leer ist und der Deckel fest zuge dreht ist.
 - Vor jedem Waschvorgang saugt das automatisierte Platten-Waschgerät automatisch Flüssigkeit an und nach jedem Waschvorgang wird das System gespült.
 - Falls ein Well-Streifen der Capture-Mikrotestplatte nur teilweise genutzt wird, setzen Sie vor dem Waschvorgang die leeren Mikrotestplatten-Wells in die Capture-Mikrotestplatte, um die Spalte zu komplettieren.
1. Nehmen Sie den Deckel ab und setzen Sie die Capture-Mikrotestplatte auf die Plattform des Platten-Waschgeräts.
 2. Stellen Sie sicher, dass der Automatische Plattenspüler EIN geschaltet ist und auf der Anzeige **Digene Wash Ready** oder **P1** angezeigt wird.
 3. Wählen Sie die Anzahl der zu spülenden Reihen durch Drücken der Taste **Rows** (Zeilen) und dann **+** oder **-** zum Einstellen aus.
 4. Drücken Sie die Taste **Rows**, um zu der Anzeige **Digene Wash Ready** oder **P1** zurückzukehren.
 5. Zum Beginnen Drücken Sie die Taste **Start/Stop**.

Der Automated Plate Washer führt sechs Füll-und-Ansaug-Zyklen durch, was ca. 10 Minuten dauert. Während des Waschprogramms gibt es eine kurze Pause; nehmen Sie die Mikrotestplatte nicht vorzeitig aus dem Gerät.

Wenn der Automated Plate Washer die Waschprozedur abgeschlossen hat, erscheint wiederum "Digene Wash Ready" oder "P1" in der Anzeige.

6. Nehmen Sie die Capture-Mikrotestplatte von der Plattform des Automated Plate Washer, wenn das Programm beendet ist.

Die Wells der Capture-Mikrotestplatte sollten keine Reste rosafarbener Flüssigkeit mehr enthalten und weiß bzw. transparent erscheinen.

7. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Amplifikation des Signals“ auf Seite 61 fort.

Manuelle Waschmethode

1. Entfernen Sie wie folgt das DR1-Reagenz aus den Wells der Capture-Mikrotestplatte: Legen Sie fusselfreie Papierhandtücher (Kintowels Wischtücher o. Ä.) oben auf die Capture-Mikrotestplatte.
2. Vergewissern Sie sich, dass die Papierhandtücher dabei die gesamte Oberfläche der Platte berühren und drehen Sie die Platte vorsichtig um.
3. Lassen Sie die Wells der Capture-Mikrotestplatte für 1–2 Minuten leerlaufen.
4. Tupfen Sie die Platte auf sauberen fusselfreien Papierhandtüchern (Kintowels Wischtücher o. Ä.) trocken.

Verwerfen Sie die gebrauchten Papierhandtücher vollständig, um eine Kontamination mit alkalischer Phosphatase zu vermeiden.

5. Waschen Sie die Capture-Mikrotestplatte insgesamt sechsmal von Hand mithilfe des Platten-Waschapparats.

Füllen Sie die Wells der Capture-Mikrotestplatte dabei jeweils bis zum Überlaufen mit Waschpuffer. Dadurch werden auch Reste des Reagenzes DR1 von den oberen Rändern der Wells entfernt. Beginnen Sie bei Well A1 mit dem Waschen der Capture-Mikrotestplatte und gehen Sie dann serpentinartig nach rechts und unten weiter vor. Nachdem alle Wells der Capture-Mikrotestplatte gefüllt sind, dekantieren Sie die Flüssigkeit mit heftiger, nach unten gerichteter Bewegung in den Ausguss. Beginnen Sie das zweite Waschen bei Well H12 der Capture-Mikrotestplatte und gehen Sie dann serpentinartig nach links und oben weiter vor. Wiederholen Sie diese Abfolge der beiden Waschvorgänge noch zweimal, sodass die Capture-Mikrotestplatte insgesamt sechsmal gewaschen wird.

-
6. Tupfen Sie die Platte nach dem Waschvorgang trocken, indem Sie sie umdrehen und 3- bis 4-mal fest auf fusselreie Papierhandtücher (z. B. Kimtowels Wischtücher) klopfen. Ersetzen Sie die Papierhandtücher und tupfen Sie die Platte erneut ab.
 7. Lassen Sie die Capture-Mikrotestplatte umgekehrt liegen und für 5 Minuten endgültig leerlaufen. Tupfen Sie die Platte noch einmal (durch mehrmaliges Klopfen) trocken.
Die Wells der Capture-Mikrotestplatte sollten keine Reste rosafarbener Flüssigkeit mehr enthalten und weiß bzw. transparent erscheinen.
 8. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Amplifikation des Signals“ auf Seite 61 fort.

Amplifikation des Signals

- Ziehen Sie vor Handhabung des Nachweisreagenzes DR2 ein neues Paar Handschuhe an.
 - Geben Sie die Reagenzien von links nach rechts mit einer 8-Kanal-Pipette in die Wells der Capture-Mikrotestplatte.
 - Falls keine 8-Kanal-Pipette zur Verfügung steht, können Sie stattdessen auch eine Repletierpipette benutzen. Aliquotieren Sie das Reagenz DR2 in ein Polypropylen-Röhrchen von geeigneter Größe für das erforderliche Volumen.
 - Pipettieren Sie DR2 zügig, ohne Unterbrechung. Die Inkubationszeit sollte für alle Wells der Capture-Mikrotestplatte möglichst gleich sein.
 - Stellen Sie sicher, dass Sie nicht die Wandungen der Wells der Capture-Mikrotestplatte berühren oder Reagenzienspritzer auf die Pipettenspitzen gelangen, da dies eine Kreuzkontamination der Proben verursachen könnte (siehe Abbildung 2 auf Seite **Error! Bookmark not defined.**).
1. Mischen Sie das DR2-Reagenz gründlich und überführen Sie das erforderliche Volumen (siehe Tabelle 1 auf Seite 34 bzw. Tabelle 4 auf Seite 35) in einen sauberen Einmal-Reagenzienbehälter.
 2. Pipettieren Sie sorgfältig 75 µl DR2 in jedes Well der Capture-Mikrotestplatte; wenden Sie dabei die oben beschriebene reverse Pipettiertechnik an (siehe Abschnitt „Detektion der Hybride“ auf Seite 57).

Vergewissern Sie sich, dass alle Wells der Capture-Mikrotestplatte ordnungsgemäß gefüllt sind, indem Sie die Intensität der gelben Farbe kontrollieren; alle Wells sollten eine vergleichbare gelbe Farbe aufweisen.
 3. Decken Sie die Capture-Mikrotestplatte mit einem Mikrotestplatten-Deckel ab und inkubieren Sie sie für 15 Minuten (maximal 30 Minuten) bei 20–25 °C.

Wichtig: Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung.
 4. Setzen Sie die Testdurchführung mit dem Abschnitt „Messung der Capture-Mikrotestplatten und Ausgabe der Ergebnisse“ auf Seite 61 fort.

Messung der Capture-Mikrotestplatten und Ausgabe der Ergebnisse

1. Messen Sie die Capture-Mikrotestplatte in einem DML-Luminometer.

Einzelheiten zur Messung einer Capture-Mikrotestplatte und wie Sie einen Testergebnis-Report erzeugen, können Sie dem zugehörigen Software-Handbuch entnehmen. In der digene Assay-Analysesoftware können relevante Informationen zum jeweiligen Assay eingegeben werden.

-
2. Falls keine vollständig belegte Capture-Mikrotestplatte gemessen wurde, entnehmen Sie die gebrauchten Wells aus dem Plattenrahmen. Spülen Sie den Rahmen gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser ab, trocknen Sie ihn und verwenden Sie ihn für den nächsten Test weiter.
 3. Verwerfen Sie alle Reagenzien-Aliquots und angesetzten Reagenzien, sofern nicht anders angegeben.

Verdünnen Sie vor der Entsorgung das restliche DNR-Reagenz in der Flasche gemäß den national und lokal anzuwendenden Laborverfahren.

Interpretation der Ergebnisse

Der Assay-Grenzwert von 1 pg/ml des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests entspricht 100.000 HPV-Kopien/ml oder 5.000 HPV-Kopien pro Assay.

Ergebnisse bei Testung von STM-Proben

STM-Proben mit einem RLU/CO-Wert von $\geq 1,0$ werden als „positiv“ für einen oder mehrere der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 angesehen.

STM-Proben mit einem RLU/CO-Wert von $< 1,0$ werden als „negativ“ angesehen bzw. erhalten das Testergebnis „keine HPV-DNA detektiert“ (“no HPV DNA detected”) für die 13 HPV-Typen, auf die getestet wurde. Das bedeutet, dass die Hochrisiko-HPV-DNA-Sequenzen entweder nicht vorhanden sind oder der HPV-DNA-Gehalt unter der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Ergebnisse bei Testung von SurePath Proben

SurePath Proben mit einem RLU/CO-Wert von $\geq 1,0$ werden als „positiv“ für einen oder mehrere der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 angesehen.

SurePath Proben mit einem RLU/CO-Wert von $< 1,0$ werden als „negativ“ angesehen bzw. erhalten das Testergebnis „keine HPV-DNA detektiert“ (“no HPV DNA detected”) für die 13 HPV-Typen, auf die getestet wurde. Das bedeutet, dass die HPV-DNA-Sequenzen entweder nicht vorhanden sind oder der HPV-DNA-Gehalt unter der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Ergebnisse bei Testung von PreservCyt Proben

PreservCyt Proben mit einem RLU/CO-Wert von $\geq 1,0$ werden als „positiv“ für einen oder mehrere der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 angesehen.

PreservCyt Proben mit einem RLU/CO-Wert von $< 1,0$ werden als „negativ“ angesehen bzw. erhalten das Testergebnis „keine HPV-DNA detektiert“ (“no HPV DNA detected”) für die 13 HPV-Typen, auf die getestet wurde. Das bedeutet, dass die HPV-DNA-Sequenzen entweder nicht vorhanden sind oder der HPV-DNA-Gehalt unter der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Bei PreservCyt Proben mit einem RLU/CO-Wert von $\geq 1,0$ und $< 2,5$ empfiehlt QIAGEN, den Test zu wiederholen, und zwar wie folgt:

- Ergibt der erste Wiederholungstest einen RLU/CO-Wert von $\geq 1,0$, wird die Probe als „positiv“ gewertet. Ein erneuter Test ist nicht erforderlich.
- Ist beim ersten Wiederholungstest der RLU/CO-Wert $< 1,0$, dann ist ein zweiter Wiederholungstest (drittes Ergebnis) erforderlich. Das zweite Ergebnis ist das Endergebnis ($< 1,0$ = negativ, $\geq 1,0$ = positiv) und wird ausgegeben bzw. dokumentiert.

RLU/CO-Wert nahe bei 1,0

Falls der RLU/CO-Wert einer Probe nahe bei, aber kleiner 1,0 ist und eine Hochrisiko-HPV-Infektion vermutet wird, dann sollte eine alternative Testmethode und/oder das Testen einer Wiederholprobe in Erwägung gezogen werden.

Andere HPV-Typen

Zu bedenken ist stets, dass andere Niedrigrisiko-HPV-Typen in der Probe vorhanden sein können, denn mit dem Assay werden nur die Hochrisiko-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 nachgewiesen. Falls spezifisch auf das Vorhandensein von sexuell übertragenen Niedrigrisiko-HPV-Typen getestet wird, verwenden Sie den *digene* HC2 HPV DNA Test, mit dem Niedrigrisiko- und Hochrisiko-HPV-DNA-Typen erfasst werden.

Verifizierung der Assay-Kalibrierung

Die Verifizierung der Assay-Kalibrierung wird durchgeführt, um zu überprüfen, dass die Reagenzien, Kalibratoren und Qualitätskontrollen funktionsfähig sind, sodass eine genaue Bestimmung des Cut-off-Werts (CO) des Assays möglich ist. Der *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test erfordert bei jeder Durchführung des Tests eine Assay-Kalibrierung; daher ist es notwendig, dass jeder Test verifiziert wird. Dieses Verifizierungsverfahren ist nicht als Ersatz für interne Qualitätskontrolltests vorgesehen. Akzeptierbaren Wertebereiche für die Assay-Kalibrierung und Qualitätskontrollen wurden nur für von QIAGEN zugelassenen DML-Geräten ermittelt.

Die Assay-Kalibrierung wird automatisch von der *digene* Assay-Analysesoftware durchgeführt und im Datenauswertungs-Bericht mit ausgedruckt. Anwender der *digene* Qualitative Software in der Version 1.03 (oder früher) müssen die Verifizierung der Assay-Kalibrierung jedoch manuell durchführen, bevor die Ergebnisse der Patientenproben dokumentiert bzw. ausgegeben werden

dürfen. Setzen Sie sich mit dem Technischen Service von QIAGEN in Verbindung, wenn Sie weitere Informationen benötigen.

Der Test muss die angegebenen Kriterien der Assay-Kalibrierung erfüllen. Falls bei einem der folgenden Kriterien das Resultat „ungültig“ („invalid“) ist, dann wird die Software die für die betreffende Probe erhaltenen Ergebnisse nicht auswerten.

Negativkalibrator

Der Negativkalibrator („Negative Calibrator“, NC) muss bei jedem Assay als Dreifach-Bestimmung getestet werden. Der NC-Mittelwert muss ≥ 10 und ≤ 250 RLU und der Variationskoeffizient („Coefficient of Variation“, CV) muss $\leq 25\%$ sein. Ist der CV-Wert $> 25\%$, dann berücksichtigt die Software den RLU-Wert, der am stärksten vom Mittelwert abweicht, als „Ausreißer“ nicht und berechnet Mittelwert und CV-Wert unter Verwendung der beiden verbleibenden Werte neu.

Ist der CV-Wert dann immer noch $> 25\%$, dann ist die Assay-Kalibrierung ungültig und der Test muss für alle Patientinnenproben wiederholt werden. Dementsprechend dürfen keine Ergebnisse für die Patientinnenproben dokumentiert bzw. ausgegeben werden.

Positivkalibrator

Der Hochrisiko-Kalibrator („High-Risk Calibrator“, HRC) ist bei jedem Assay in Dreifach-Bestimmung zu testen. Dabei muss der CV-Wert des HRC $\leq 15\%$ sein. Ist der CV-Wert $> 15\%$, dann berücksichtigt die Software den RLU-Wert, der am stärksten vom Mittelwert abweicht, als „Ausreißer“ nicht und berechnet Mittelwert und CV-Wert unter Verwendung der beiden verbleibenden Werte neu.

Ist der CV-Wert dann immer noch $> 15\%$, dann ist die Assay-Kalibrierung ungültig und der Test muss für alle Patientinnenproben wiederholt werden. Dementsprechend dürfen keine Ergebnisse für die Patientinnenproben dokumentiert bzw. ausgegeben werden.

Quotient Positivkalibrator-Mittelwert/Negativkalibrator-Mittelwert

Die Software berechnet anhand der Werte von $HRC\bar{X}$ und $NC\bar{X}$ den Quotienten $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Ein gültiger $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ -Quotient ist wie folgt definiert:
 $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$.

Ist der Quotient $\text{HRC}\bar{X}/\text{NC}\bar{X} < 2,0$ oder > 15 , dann ist die Assay-Kalibrierung ungültig und der Test muss für alle Patientinnenproben wiederholt werden. Dementsprechend dürfen keine Ergebnisse für die Patientinnenproben dokumentiert bzw. ausgegeben werden.

Berechnung des Cut-off-Werts

Die *digene* Assay-Analysesoftware berechnet für alle Proben den RLU/CO-Wert sowie das Testergebnis „positiv“ oder „negativ“ und gibt diese Werte und Ergebnisse aus. Der Cut-off-Wert (CO) zur Bestimmung einer positiven Abstrichprobe ist der HRC-Mittelwert \bar{X} . Die *digene* Assay-Analysesoftware verwendet die RLU-Werte der Proben, um die Ergebnisse als Proben-RLU/CO darzustellen.

Bei automatisierter Testdurchführung mit dem RCS wendet das HPV-Assay-Protokoll des RCS einen Kalibrierfaktor („Calibration Adjustment Factor“, CAF) von 0,8 auf den gültigen HRC-Wert \bar{X} an. Dieser Kalibrierfaktor (CAF) ist notwendig, damit die Leistungscharakteristik des automatisierten Tests mit dem RCS äquivalent zu der bei manueller Testdurchführung bleibt. Der CAF wird nur auf die beim automatisierten Test mit dem RCS erhaltenen Ergebnisse angewendet; daher ist es äußerst wichtig, das richtige Assay-Protokoll auszuwählen, damit das System genaue Testergebnisse generiert.

Qualitätskontrollen

Die mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test gelieferten Qualitätskontroll-Proben sind für die interne Qualitätskontrolle zu verwenden. Bei den mitgelieferten Qualitätskontrollen handelt es sich um klonierte HPV-DNA-Zielsequenzen (Targets); sie leiten sich nicht von Wildtyp-HPV-DNA ab. Es handelt sich dabei um denselben Typ von Probenmaterial wie bei den mitgelieferten Kalibratoren. Gegebenenfalls sind zusätzliche Qualitätskontrollen gemäß den Richtlinien oder Anforderungen nationaler oder regionaler Vorschriften oder Akkreditierungseinrichtungen zu testen. Die mitgelieferten Qualitätskontrollen können nicht als geeignete Qualitätskontrolle bei der Verarbeitung von Proben, die in PreservCyt Lösung oder SurePath Konservierungsmedium aufgenommen wurden, verwendet werden.

Detaillierte Anweisungen zur Eingabe der Chargennummer und des Verfallsdatums der Qualitätskontrollen finden Sie im zugehörigen Handbuch zur *digene* Assay-Analysesoftware. Damit ein Assay gültig ist, muss das Verhältnis RLU/CO bei jeder Qualitätskontrolle innerhalb des angegebenen Bereichs der in der folgenden Tabelle 10 definierten Kriterien liegen.

Liegen die Qualitätskontrollen nicht innerhalb dieser Wertebereiche, dann ist der Assay ungültig und muss wiederholt werden. Dementsprechend dürfen die Ergebnisse für die Patientinnenproben nicht dokumentiert bzw. ausgegeben werden.

Tabelle 10. Assay-Validitätskriterien für die Qualitätskontrollen

Qualitätskontrolle	Minimum (RLU/CO)	Maximum (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Beschränkungen des Tests

- Der digene HC2 High-Risk HPV DNA Test für die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 wird nicht für die Beurteilung eines Verdachts auf sexuellen Missbrauch empfohlen.
- Die Prävalenz von HPV-Infektion in einer Population kann sich auf die Leistungsfähigkeit auswirken. Die positiven prädiktiven Werte sind geringer, wenn Populationen mit niedriger Prävalenz oder Personen ohne bestehendes Infektionsrisiko getestet werden.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer HPV-Infektion nicht aus, weil durch ein sehr niedriges Infektionsniveau oder einen Fehler bei der Probenentnahme ein falsch-negatives Testergebnis verursacht sein könnte. Darüber hinaus werden mit diesem Test die DNAs der Niedrigrisiko-HPV-Typen (6, 11, 42, 43 und 44) nachgewiesen.
- Eine Infektion mit HPV ist weder ein definitiver Indikator für das Vorliegen einer Gebärmutterhals-Erkrankung schweren Grades noch bedeutet es, dass sich in jedem Fall eine hochgradige zervikale Erkrankung oder ein Zervixkarzinom entwickeln wird.
- Zwischen der Hochrisiko-HPV-Sonde und den HPV-Typen 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 und MM9 kommt es in geringem Ausmaß zur Kreuzhybridisierung. Patientinnen, deren Proben laut Testergebnis einen hohen Gehalt dieser HPV-Typen aufweisen, könnten fälschlicherweise zur Kolposkopie überwiesen werden (15, 35).
- Der digene HC2 High-Risk HPV DNA Test ist dafür vorgesehen, Hochrisiko-HPV-Typen nachzuweisen, unter anderem die Typen 39, 58, 59 und 68. Von QIAGEN durchgeführte analytische Untersuchungen, bei denen klonierte HPV-Plasmid-DNA verwendet wurde, haben ergeben, dass diese HPV-Typen mit diesem Test in einem Konzentrationsbereich von 0,62 pg/ml bis 1,39 pg/ml detektiert werden. Dies ist äquivalent zur Nachweischarakteristik der anderen HPV-Typen, die mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test erfasst werden. Bei den QIAGEN Untersuchungen konnte nur für eine geringe Anzahl klinischer Proben der Nachweis dieser HPV-Typen validiert werden. Aufgrund der niedrigen Prävalenz dieser Typen in der Allgemeinbevölkerung (28) wurde die Leistungscharakteristik des digene HC2 High-Risk HPV DNA Test für den Nachweis der HPV-Typen 39, 58, 59 und 68 statistisch nicht bestätigt.
- Wenn die Entnahme der Abstrichprobe und Überführung in Probentransportmedium (STM) für den Test in Gegenwart hoher Konzentrationen an antimykotischer Creme, gelartigem Kontrazeptivum oder Vaginalspülung erfolgt, besteht die Wahrscheinlichkeit für ein falsch-negatives Ergebnis, falls die Probe eine hohe Menge an HPV-DNA enthält, die einen RLU/CO-Wert im Bereich des Assay-Cut-offs ergibt.

- Wenn die Entnahme der zervikalen Abstrichprobe und Überführung in PreservCyt Lösung für die Probenverarbeitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit in Gegenwart hoher Konzentrationen an antimykotischer Creme, vaginalem Gleitgel oder Blut erfolgt, besteht die Wahrscheinlichkeit für ein falsch-negatives Ergebnis, falls die Probe eine hohe Menge an HPV-DNA enthält, die einen RLU/CO-Wert im Bereich des Assay-Cut-offs ergibt.
- Falls die Entnahme einer zervikalen Abstrichprobe und Überführung in SurePath Medium für die Probenverarbeitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit in Gegenwart eines gelartigen Kontrazeptivums erfolgt, könnte es zu einem falsch-negativen Testergebnis kommen
- Wenn ein empfängnisverhütendes Gel, eine antimykotische Creme oder eine entzündungshemmende Creme bei der Entnahme Zervixproben in SurePath zur Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit vorhanden sind, kann ein falsch-negatives Testergebnis auftreten.
- Eine Kreuzreaktivität zwischen der Hochrisiko-HPV-Sonde und dem Plasmid pBR322 ist möglich. Über die Anwesenheit von pBR322-homologen Sequenzen in humanen Genital-Abstrichproben liegen publizierte wissenschaftliche Untersuchungen vor. In Gegenwart hoher Mengen bakterieller Plasmide könnte es daher zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.
- Wenn bei der automatisierten Testdurchführung mit dem RCS die Hybridisierungsmikrotestplatte nicht beobachtet wird, um den ordnungsgemäßen Probentransfer zu kontrollieren, und ein eventueller fehlerhafter Probentransfer nicht korrigiert wird, dann könnte dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen.

Leistungscharakteristik

Leistungsfähigkeit beim Screening klinischer Proben von Patientinnen mit normalem Pap-Abstrichbefund als Hilfsmittel bei der Risikobeurteilung für das Patientenmanagement

Im Folgenden werden die Ergebnisse von acht unabhängigen klinischen Studien beschrieben, die von renommierten medizinischen, wissenschaftlichen und Regierungseinrichtungen in Forschungszentren in den USA und anderen Ländern durchgeführt wurden. In diesen Studien wurden die im jeweiligen Land etablierten Pap-Testmethoden angewendet. In allen bis auf zwei Fälle wurde zur Interpretation der Pap-Test-Ergebnisse das Bethesda-Grading-System verwendet. Die für das Zervixkarzinom-Screening entsprechende Terminologie in der Europäischen Union ist in den "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening" („Europäische Leitlinien für die Qualitätssicherung beim Zervixkarzinom-Screening“) einzusehen (36). Außerdem wurden bei jeder der Studien die hochgradigen Zervixerkrankungen mittels kolposkopisch gesteuerter Biopsie diagnostiziert. Bei diesen Studien wurde der klinische Nutzen des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests im Vergleich zum Pap-Abstrich für ältere Frauen (generell im Alter von über 30 Jahren) beurteilt. Außer in einer, wurden in allen Studien auch prospektive HPV-Tests unter Verwendung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests durchgeführt.

Bei den Studien handelte es sich um Screening-Studien an einem Querschnitt der Allgemeinbevölkerung unter Verwendung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests, sofern nachstehend keine anderweitigen Angaben gemacht werden. Zwei der acht Studien wurden in den USA, zwei in Europa, zwei in Lateinamerika, eine in Afrika und eine in Asien durchgeführt.

Die bei sechs Querschnittsstudien festgestellten Leistungskennzahlen des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests bei Frauen im Alter von 30 Jahren oder älter und mit einer histologisch bestätigten Diagnose einer hochgradigen zervikalen Neoplasie (definiert als zervikale intraepitheliale Neoplasie 3), oder schwerwiegender Diagnose, sind in den folgenden Tabellen 11 und 12 zusammengefasst.

Tabelle 11. Leistungskennzahlen – Sensitivität und Spezifität

Population	n	Sensitivity (%)				Spezifität (%)	
		(n/N)				(n/N)	
		95% Confidence Interval(CI)				95%-KI	
		nur Pap-Test	nur Pap-Test	nur Pap-Test	nur Pap-Test	nur HPV-Test	HPV + Pap-Test
Westeuropa 1	7592	51.6 (14/27) 32.0–71.3	96.3 (26/27) 81.0–99.9	100.0 (27/27) 87.2–100.0	98.5 (7453/7565) 98.2–98.8	96.2 (7275/7565) 95.7–96.6	95.1 (7193/7565) 94.6–95.6
Latein-amerika 1	6115	58.4 (45/77) 46.68–69.6	94.8 (73/77) 87.2–98.6	97.4 (75/77) 90.9–99.7	98.7 (5962/6038) 98.4–99.0	93.9 (5669/6038) 93.3–94.5	93.4 (5637/6038) 92.7–94.0
Latein-amerika 2*	6176	77.9 (53/68) 66.2–87.1	89.7 (61/68) 79.9–95.8	94.1 (64/68) 85.6–98.4	94.1 (5745/6108) 93.4–94.6	94.0 (5742/6108) 93.4–94.6	89.9 (5490/6108) 89.1–90.6
Afrika	2925	84.1 (90/107) 75.8–90.5	89.7 (96/107) 82.4–94.8	92.5 (99/107) 85.8–96.7	86.4 (2436/2818) 85.1–87.7	80.0 (2253/2818) 78.4–81.4	76.4 (2152/2818) 74.8–77.9
Asien	1936	97.6 (41/42) 87.4–99.9	100.0 (42/42) 91.6–100.0	100.0 (42/42) 91.6–100.0	76.3 (1445/1894) 74.3–78.2	83.0 (1572/1894) 81.2–85.0	68.0 (1287/1894) 65.8–70.1
USA 1	1040	50.0 (1/2) 1.26–98.7	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	97.6 (1013/1038) 96.5–98.4	96.2 (999/1038) 94.9–97.3	95.5 (991/1038) 94.0–96.7

* Sofern verfügbar, *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testdaten, andernfalls wurden HCS-Daten verwendet; kombinierte Daten.

Tabelle 12. Leistungskennzahlen – positiver und negativer prädiktiver Wert

Population	n	Prävalenz (%)	Positiver prädiktiver Wert (%)			Negativer prädiktiver Wert (%)		
			CIN 3	nur Pap-Test	nur HPV-Test	HPV- + Pap-Test	nur Pap-Test	nur HPV-Test
Westeuropa 1	7592	0.36	11.1	8.23	6.77	99.83	99.99	100.0
		(27/7592)	(14/126)	(26/316)	(27/399)	(7453/7466)	(7275/7276)	(7193/7193)
		0.23–0.52	6.2–17.9	5.5–11.8	4.5–9.7	99.7–99.9	99.9–100.0	99.9–100.0
Lateinamerika 1	6115	1.26	37.2	16.5	15.8	99.47	99.93	99.96
		(77/6115)	(45/121)	(73/442)	(75/476)	(5962/5994)	(5669/5673)	(5637/5639)
		0.99–1.57	28.6–46.4	13.2–20.3	12.6–19.4	99.3–99.6	99.8–100.0	99.9–100.0
Lateinamerika 2*	6176	1.10	12.7	14.3	9.4	99.74	99.88	99.93
		(68/6176)	(53/416)	(61/427)	(64/682)	(5745/5760)	(5742/5749)	(5490/5494)
		0.86–1.39	9.7–16.3	11.1–18.0	7.3–11.8	99.6–99.9	99.8–100.0	99.8–100.0
Afrika	2925	3.66	19.1	14.5	12.9	99.31	99.51	99.63
		(107/2925)	(90/472)	(96/661)	(99/765)	(2436/2453)	(2253/2264)	(2152/2160)
		3.01–4.40	15.6–22.9	11.9–17.4	10.6–15.5	98.9–99.6	99.1–99.8	99.3–99.8
Asien	1936	2.17	8.37	11.5	6.47	99.93	100.0	100.0
		(42/1936)	(41/490)	(42/364)	(42/649)	(1445/1446)	(1572/1572)	(1287/1287)
		1.57–2.92	6.1–11.2	8.4–15.3	4.7–8.7	99.6–100.0	99.8–100.0	99.7–100.0
USA 1	1040	0.19	3.85	4.88	4.08	99.90	100.0	100.0
		(2/1040)	(1/26)	(2/41)	(2/49)	(1013/1014)	(999/999)	(991/991)
		0.02–0.69	0.1–19.6	0.6–16.5	0.5–14.0	99.5–100.0	99.6–100.0	99.6–100.0

* Sofern verfügbar, *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Testdaten, andernfalls wurden HCS-Daten verwendet; kombinierte Daten.

Bei allen Studien ergab sich eine gleichmäßige, und häufig sehr bedeutende Verbesserung der Empfindlichkeit des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests im Vergleich zum Pap-Test allein. Wie bereits bei der Sensitivität festgestellt, übertrifft auch der negative prädiktive Wert des HPV-Tests in allen Fällen den des alleinigen Pap-Tests und erreicht nahezu 100 %. Dieser negative prädiktive Wert belegt die hohe Wahrscheinlichkeit der Abwesenheit einer hochgradigen zervikalen Erkrankung oder eines Zervixkarzinoms bei Frauen mit normalem zytologischen Befund, bei denen keine HPV-Infektion besteht.

Obwohl die Spezifität des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests geringer ist als für den Pap-Test allein, hat die Analyse des Wahrscheinlichkeitsverhältnisses gezeigt, dass die beobachtete geringere Spezifität nicht signifikant genug ist, um den klinischen Nutzen der Anwendung des Tests zu mindern. Dieser Nutzen besteht in der Identifikation der Frauen, bei denen ein geringes oder kein Risiko für die Entwicklung einer zervikalen Erkrankung besteht. Dennoch ist es wichtig, dass bei der Entscheidung, eine Patientin zur Kolposkopie zu überweisen, sämtliche klinischen

und risikorelevanten Informationen sowie die dem Arzt vorliegende Anamnese der jeweiligen Patientin berücksichtigt werden. Wichtige Faktoren sind u. a. eine anamnestisch bekannte HPV-Infektion und/oder anormale Pap-Abstrich-Ergebnisse, das Alter beim ersten Koitus, die Anzahl der Geschlechtspartner und gleichzeitig bestehende sexuell übertragene Krankheiten (37, 38).

Auch wenn die Prävalenz einer hochgradigen Erkrankung bei den Studien, anhand derer die Leistungskennzahlen ermittelt wurden, nicht signifikant variiert, kann sich die Prävalenz einer HPV-Infektion in einer Population auf die Leistungsfähigkeit auswirken und typischerweise mit der Patientenpopulation variieren. Außerdem wurde gezeigt, dass die Prävalenz einer HPV-Infektion mit zunehmendem Alter sehr stark abnimmt (17, 24–29, 38–40). Die positiven prädiktiven Werte sind geringer, wenn Populationen mit niedriger Prävalenz oder Personen mit geringem Infektionsrisiko getestet werden.

Unter Verwendung der Ergebnisse zweier Studien – einer in den USA von dem National Cancer Institute (NCI) in Portland (Oregon) und der anderen in Frankreich, im Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims durchgeführten – wurden Longitudinalanalysen durchgeführt. Diese Longitudinalanalysen sollten den Nachweis erbringen, dass bei Pap-negativen/HPV-negativen Patientinnen ein geringeres Risiko für eine Zervixerkrankung besteht als bei Frauen, für die mittels herkömmlicher Methoden ein niedriges Risiko besteht und deren HPV-Status unbekannt ist (siehe folgende Tabellen 13 und 14).

Tabelle 13. Longitudinalanalyse – relatives Risiko für hochgradige Erkrankung

Studiengruppe	Alter	Niedrigrisiko-Klassifizierung	n	Fälle von CIN 3+	Rate (pro 100 Patientenjahre)	Relatives Risiko
NCI	30 Jahre oder älter	Pap-Test normal, HPV-Test negativ	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Konsequente normale Pap-Tests*	9429	19	0.048	1.000
	Alle	Pap-Test normal, HPV-Test negativ	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Konsequente normale Pap-Tests*	13,392	44	0.082	1.000
Frankreich	30 Jahre oder älter	Pap-Test normal, HPV-Test negativ	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Konsequente normale Pap-Tests†	2026	4	0.099	1.000
	Alle	Pap-Test normal, HPV-Test negativ	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Konsequente normale Pap-Tests†	2650	7	0.136	1.000

* Drei normale Pap-Tests im Verlauf von ca. zwei Jahren.

† Zwei normale Pap-Tests im Verlauf von ca. zwei Jahren.

Tabelle 14. Longitudinalanalyse – Erkrankungsraten, stratifiziert nach HPV-Status bei Studienbeginn (Baseline)

Studiengruppe	Alter	Status bei Studienbeginn	n	Fälle von CIN 3+	Rate (pro 100 Patientenjahre)	Relatives Risiko 95%-KI
NCI	30 Jahre oder älter	Pap-Test normal, HPV-Test positiv	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Pap-Test normal, HPV-Test negativ	12,054	28	0.043	1.00
	Alle	Pap-Test normal, HPV-Test positiv	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Pap-Test normal, HPV-Test negativ	17,594	48	0.056	1.00
France	30 Jahre oder älter	Pap-Test normal, HPV-Test positiv	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Pap-Test normal, HPV-Test negativ	1696	3	0.084	1.00
	Alle	Pap-Test normal, HPV-Test positiv	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Pap-Test normal, HPV-Test negativ	2180	3	0.066	1.00

Der klinische Nutzen des HPV-Testergebnisses zeigt sich des Weiteren darin, dass das Risiko für eine Zervixerkkrankung bei HPV-positiven Frauen im Vergleich zu HPV-negativen Frauen erhöht ist.

Leistungsfähigkeit beim Screening klinischer Proben von Patientinnen mit dem Pap-Abstrichbefund „ASC-US“ zur Ermittlung der Notwendigkeit einer Überweisung zur Kolposkopie

In den USA wurde 1996 unter der Leitung des Kaiser Foundation Research Institute und der Kaiser Permanente Medical Group eine Studie mit dem Titel „Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears“ („Nutzen der HPV-DNA-Testung für eine Triage von Frauen mit grenzwertigen Pap-Abstrichergebnissen“) durchgeführt. Dabei wurden den Frauen, die an verschiedenen klinischen Kaiser-Einrichtungen an der Studie teilnahmen, zervikale Proben für einen Routine-Pap-Abstrichtest und den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test entnommen. Die Bewertung der Pap-Erstabstriche erfolgte nach der Bethesda-Klassifikation. Die für das Zervixkarzinom-Screening entsprechende Terminologie in der Europäischen Union ist in den „European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening“ („Europäische

Leitlinien für die Qualitätssicherung beim Zervixkarzinom-Screening“) einzusehen (42). Frauen (im Alter von 15 Jahren oder älter) mit dem nicht eindeutig klassifizierbaren Pap-Abstrichergebnis „ASC-US“ (= „*atypical squamous cells of undetermined significance*“; dt.: „atypische Plattenepithelzellen unklarer Signifikanz“) wurden zur Kolposkopie und Biopsie erneut einbestellt. Die Befundung der kolposkopisch gewonnenen histologischen Proben zur initialen Diagnosestellung erfolgte durch Pathologen. Jede histologische Probe wurde zusätzlich von einem unabhängigen Pathologen überprüft, und etwaige Diskrepanzen zwischen der Erstbefundung und der unabhängigen Überprüfung wurden abschließend von einem dritten Pathologen beurteilt.

Die initiale Abstrichprobe wurde mit einem Prototyp des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests analysiert, der Sonden für 11 der 13 High-Risk-HPV-Typen – aber keine für die HPV-Typen 59 und 68 – enthielt. Es ist nicht zu erwarten, dass dieser Unterschied zu signifikant unterschiedlichen Leistungsprofilen der beiden Assays führt

Die initiale Abstrichprobe wurde mit einem Prototyp des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests analysiert, der Sonden für 11 der 13 High-Risk-HPV-Typen – aber keine für die HPV-Typen 59 und 68 – enthielt. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Leistungsmerkmalen des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests für STM und PreservCyt Solution wird nur die Assay-Leistung für PreservCyt Solution vorgestellt.

Von 885 Frauen mit dem Pap-Abstrichergebnis „ASC-US“ wurden High-Risk-HPV-DNA-Testergebnisse und histologische Diagnosen erhalten. Bei den meisten Patientinnen wurden die Tests mit Proben durchgeführt, die sowohl in STM als auch in PreservCyt Lösung überführt wurden. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Leistungscharakteristik des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests für beide Medien wird im Folgenden nur die Assay-Leistungsfähigkeit für die PreservCyt Lösung dargestellt.

Tabelle 15. Vergleich des digene HC2 High-Risk HPV DNA Tests mit der Konsens-Histologie bei einer Population mit ASC-US-Pap-Abstrichbefund bei Überweisung (Kaiser-Studie; Abstrichproben in PreservCyt Lösung)

		HSIL oder hochgradiger zum Zeitpunkt der Kolposkopie		Total
		+	-	
digene HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Gesamt		71	814	885

Sensitivität $[TP/(TP + FN)] = 93,0\%$ (66/71)
 95%-KI = 84,3–97,7
 Spezifität $[TN/(TN + FP)] = 61,1\%$ (497/814)
 95%-KI = 57,7–64,4
 Prävalenz der Erkrankung = 8,0 % (71/885)
 Positiver prädiktiver Wert des Assays = 17,2 % (66/383)
 Negativer prädiktiver Wert des Assays = 99,0 % (497/502)

Die theoretischen positiven und negativen Vorhersagewerte basierend auf den verschiedenen Prävalenzen für einen initialen ASC-US-Befund, der sich anhand des High-Risk-HPV-Testergebnisses als HSIL oder hochgradiger herausstellte, ergaben sich wie folgt (siehe folgende Tabelle 16).

Tabelle 16. Theoretischer positiver und negativer prädiktiver Wert der High-Risk-HPV-Testung von Pap-Abstrichen mit ASC-US-Befund

Theoretische Prävalenz für HSIL	Initialer ASC-US-Pap-Abstrichbefund	
	Positiver prädiktiver Wert des Assays	Negativer prädiktiver Wert des Assays
5	11.2	99.4
10	21.0	98.7
15	29.7	98.0
20	37.4	97.2
25	44.3	96.3
30	50.6	95.3

Die Varianzen zwischen den verschiedenen Altersgruppen der teilnehmenden Patientinnen dieser Studie sind in der folgenden Tabelle 17 wiedergegeben.

Tabelle 17. Daten der Kaiser-Studie: Leistungsfähigkeit des digene HC2 High-Risk HPV DNA Tests im Vergleich zu bestätigten histologischen Ergebnissen (HSIL) – altersspezifische Kennzahlen

	Alter < 30 J.	Alter 30–39 J.	Alter > 39 J.
n	287	233	365
Prävalenz der Erkrankung (%)	12.2	11.2	2.7
Sensitivität (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95%-KI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Spezifität (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95%-KI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Negativer prädiktiver Wert (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Positiver prädiktiver Wert (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Klinische Sensitivität und Spezifität bei der Bestimmung des Risikos für eine hochgradige Erkrankung bei Frauen mit dem Pap-Abstrichbefund „LSIL“ oder „HSIL“

Es wurde eine multizentrische klinische Studie unter Verwendung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests an Abstrichproben durchgeführt, die in mehreren großen Kolposkopie-Kliniken (drei Zentren) an einem Krankenhaus und medizinischen Zentren mit einer hohen Prävalenz zervikaler Erkrankungen und HPV im Westen und Süden der USA entnommen wurden. Die HPV-Tests wurden in Studienzentren durchgeführt, die nicht an die Kolposkopie-Kliniken, in denen die Probenentnahme stattgefunden hatte, angeschlossen waren. Die Population für diese klinische Studie bestand aus Frauen, bei denen auf Grundlage eines kurz zuvor durchgeführten Pap-Abstrichtests die Diagnose „LSIL“ oder „HSIL“ gestellt worden war und die zur Bestätigung zur Kolposkopie überwiesen wurden. Bei 327 der 702 in die Studie eingeschlossenen Patientinnen waren die Pap-Abstrichergebnisse schwerwiegender als ASC-US, und es lagen adäquate Informationen vor; 96 von ihnen hatten einen Enderkrankungsstatus von HSIL oder hochgradiger.

Exfolierte zervikale Zellproben wurden entweder mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommen und in STM überführt oder mit einer Abstrichbürste entnommen und dann in PreservCyt Lösung gespült. Die Abstrichproben wurden zum Zeitpunkt der Kolposkopie entnommen. Die Proben wurden mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test analysiert und die Ergebnisse wurden mit dem für jede Patientin bestimmten Krankheitsstatus verglichen. Der Krankheitsstatus basierte auf den Ergebnissen des histologischen Befunds. Bei negativem oder fehlendem Histologiebefund jedoch wurde der Krankheitsstatus mittels zytologischer Untersuchung zum Zeitpunkt der Kolposkopie bestimmt (siehe folgende Tabelle 18).

Der *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test wurde an drei großen medizinischen Schwerpunktzentren durchgeführt; diese waren nicht an die Zentren angeschlossen, an denen die Proben während der Kolposkopie entnommen worden waren. Die zytologischen Untersuchungen wurden in einem pathologischen Referenzlabor und die histologischen Untersuchungen in den Einrichtungen, in denen die Kolposkopie stattfand, durchgeführt. Die Testergebnisse wurden mit dem Krankheitsstatus verglichen, um Empfindlichkeit, Spezifität sowie negativen und positiven Vorhersagewert des Tests beim Nachweis einer hochgradigen zervikalen Neoplasie zu beurteilen. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Leistungscharakteristik des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests für beide Medien wird im Folgenden nur die Assay-Leistungsfähigkeit für Proben in PreservCyt Lösung dargestellt. Zwischen den Ergebnissen des High-Risk-HPV-Tests von Proben in STM und Proben in PreservCyt Lösung wurde kein Unterschied festgestellt.

Tabelle 18. Algorithmus für den Krankheitsstatus der Patientinnen

Zytologiebefund	Histologiebefund	Krankheitsstatus
Negativ	Negativ oder nicht bestimmt*	Negativ
LSIL	Negativ	LSIL
HSIL	Negativ	HSIL
Karzinom	Negativ	HSIL+
Negativ	LSIL	LSIL
LSIL	Nicht bestimmt*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Karzinom	LSIL	LSIL
Negativ	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Nicht bestimmt*	HSIL
Karzinom	HSIL	HSIL
Negativ	Karzinom	HSIL+
LSIL	Karzinom	HSIL+
HSIL	Karzinom	HSIL+
Karzinom	Nicht bestimmt*	HSIL+
Karzinom	Karzinom	HSIL+

* Biopsie und/oder endozervikale Kürettage wurde(n) nicht durchgeführt, weil bei der Kolposkopie keine Auffälligkeiten festgestellt wurden oder der histologische Befund nicht verfügbar war.

Die Leistung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests wurde anhand von 327 in PreservCyt Lösung befindlichen Proben bestimmt; 96 dieser Proben wurden bei Frauen entnommen, bei denen eine hochgradige zervikale Erkrankung diagnostiziert worden war (siehe die folgenden Tabellen 19 und 20). Die Vergleiche wurden bei allen an der Studie teilnehmenden Patientinnen mit anormalem Befund beim Pap-Abstrichtest bei der Überweisung durchgeführt.

Tabelle 19. Ergebnisse der High-Risk-HPV-DNA-Tests

		Ergebnisse High-Risk-HPV-DNA-Test		Endgültiger Krankheitsstatus HSIL		Endgültiger Krankheitsstatus LSIL		Endgültiger Krankheitsstatus negativ		Gesamt
		+	-	+	-	+	-			
Pap-Test-Befund bei Überweisung	LSIL	44	4	78	33	28	37			224
	HSIL	45	3	29	14	5	7			103
	Gesamt	89	7	107	47	33	44			327
Gesamt		96		154		77				327

Der digene HC2 High-Risk HPV DNA Test wies bei einer Population von Patientinnen, die auf der Basis einer LSIL-, HSIL- oder ähnlichen Diagnose anhand des Pap-Abstrichs zur Kolposkopie überwiesen wurden, eine Gesamtempfindlichkeit von ca. 93 % bei der Identifizierung von Frauen mit einer hochgradigen Neoplasie auf (siehe folgende Tabelle 20). Darüber hinaus ergab sich für den Test ein negativer Vorhersagewert von nahezu 95 % bei dieser Patientinnenpopulation

Tabelle 20. Leistungsmerkmale der High-Risk-HPV-DNA-Testung bei Patientinnen mit Pap-Abstrichbefund „LSIL“ oder hochgradiger und dem endgültigen Krankheitsstatus „HSIL“

		Endgültiger Krankheitsstatus		Total
		HSIL	LSIL oder negativ	
Ergebnis beim High-Risk-HPV-DNA-Test	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Gesamt	96	231	327

Sensitivität $[TP/(TP + FN)] = 92,7\% (89/96)$
 95%-KI = 85,6–97,0
 Spezifität $[TN/(TN + FP)] = 39,4\% (91/231)$
 95%-KI = 33,1–46,0
 Krankheitsprävalenz bei Überweisung nach LSIL mit endgültiger HSIL = 21,4 %
 Krankheitsprävalenz bei Überweisung nach HSIL mit endgültiger HSIL = 46,6 %
 Positiver prädiktiver Wert (Gesamt) = 38,9 % (89/229)
 Negativer prädiktiver Wert (Gesamt) = 92,8 % (91/98)

Auch wenn die Spezifität des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests etwas niedrig erscheint, kann eine strikte Korrelation zwischen dem Nichtvorhandensein einer Neoplasie und einem negativen HPV-Testergebnis nicht erwartet werden. HPV-DNA kann bei Frauen vorhanden sein, bei denen es noch nicht zur Progression zu höheren Krankheitsgraden gekommen ist. Tatsächlich wurden bei HPV-Tests mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion – einem nur für Forschungszwecke vorgesehenen PCR-Assay – an Proben mit positiven Ergebnissen des *digene* HC2 High-Risk HPV

DNA Tests und bei denen der entsprechende Krankheitsstatus geringer als geringgradige Neoplasie war, fast 75 % der Proben positiv getestet.

Die theoretischen positiven und negativen Vorhersagewerte des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests bei einem initialen LSIL- oder HSIL-Befund des Pap-Abstrichtests, die sich nach Kolposkopie als HSIL oder hochgradiger herausstellten, sind in der folgenden Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21. Theoretischer positiver und negativer prädiktiver Wert des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests bei initialem LSIL- oder HSIL-Pap-Abstrichbefund

Theoretische Prävalenz für HSIL	Initialer LSIL- oder HSIL-Pap-Abstrichbefund	
	Positiver prädiktiver Wert des Assays	Negativer prädiktiver Wert des Assays
5	7.4	99.0
10	14.5	97.9
15	21.2	96.8
20	27.6	95.5
25	33.7	94.1
30	39.6	92.6
35	45.1	90.9
40	50.4	89.0
45	55.5	86.8
50	60.4	84.3

Leistungsfähigkeit bei Vaginal- oder selbst entnommenen Abstrichproben

Bei den Tests in der zur Leistung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests bei selbst entnommenen Vaginalproben zitierten Literatur haben über 141.000 Frauen im Alter von 16 bis 54 Jahren teilgenommen. Die Studienkohorten umfassten Frauen aus China (41, 42), Mexiko (43, 44) sowie Großbritannien (45). Die Auslegung der Studien wich geringfügig voneinander ab, aber generell wurde Frauen mit einem positiven Testergebnis eine weitere Untersuchung durch Kolposkopie angeboten und Ergebnisse wurden bezüglich der Sensitivität und Spezifität gegenüber dem Vergleichsverfahren berichtet.

Bei zwei Studien, bei denen Daten zum Vergleich von selbst entnommenen gegenüber vom Arzt entnommenen Proben verfügbar waren, zeigen die Ergebnisse mit 81 bis 85 % für selbst entnommene Proben gegenüber 96 bis 100 % für vom Arzt entnommene Proben eine hohe Sensitivität für CIN 2+ bei beiden Verfahren an. Ergebnisse der Spezifität waren mit 81 bis 82 % für selbst entnommene Proben gegenüber 83 bis 85 % für vom Arzt entnommene Proben für CIN

2+ bei beiden Verfahren (42, 45) ähnlich. Bei anderen Studien, bei denen nur Leistungsdaten bei selbst entnommenen Proben vorlagen, war Sensitivitätsleistung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests für CIN 2+ um das 3,4-fache höher als die Zytologie (43), und die Sensitivität betrug 98 % vor Adjustierung der Untersuchungsverzerrung (44).

Analytische Sensitivität

Ein nicht klinisches Panel klonierter HPV-Plasmid-DNA wurde getestet, um festzustellen, ob jeder der 13 HPV-Typen mittels des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests nachweisbar ist, und um die analytische Sensitivität des Assays für jeden der HPV-Typen zu bestimmen. Dabei wurde jede HPV-Zielkonzentration (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml und 0,2 pg/ml) der 13 HPV-DNA-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68) in Dreifachbestimmung getestet. Das mittlere Signal (in RLU) für jede Konzentration der HPV-Typen wurde berechnet und mit dem positiven Kalibrator verglichen.

Die Nachweisgrenzen der einzelnen HPV-Typen in STM sind in der folgenden Tabelle 22 zusammengefasst. Die Nachweisgrenzen variierten, abhängig vom getesteten HPV-Typ, zwischen 0,62 pg/ml und 1,39 pg/ml. Die mittlere Nachweisgrenze aller 13 HPV-DNA-Typen betrug 1,08 pg/ml mit einer Standardabweichung von 0,05 pg/ml.

Tabelle 22. Zusammenfassung der nachweisbaren Sensitivitätsgrenzen für jeden HPV-DNA-Typ in STM

HPV-DNA-Typ	Nachweisbare HPV-DNA-Konzentration (pg/ml)	Standardabweichung	95%-KI
16	1.09	0.06	0.94–1.29
18	1.05	0.05	0.88–1.29
31	1.01	0.05	0.91–1.15
33	1.35	0.02	1.26–1.45
35	1.11	0.05	0.95–1.31
39	1.39	0.09	1.16–1.71
45	1.14	0.04	0.99–1.35
51	0.78	0.10	0.70–0.88
52	1.37	0.06	1.21–1.58
56	0.62	0.04	0.58–0.67
58	0.82	0.04	0.73–0.94
59	1.10	0.06	1.00–1.21
68	1.19	0.04	1.03–1.39
Mittelwert (alle Typen)	1.08	0.05	0.95–1.25

Äquivalenz zwischen Probentypen

Äquivalenz zwischen Proben in STM und Proben in PreservCyt Lösung

Die Äquivalenz zwischen STM- und PreservCyt Abstrichproben wurde anhand der Wiederfindung der HPV-18-DNA untersucht. Dazu wurden negative Zellpools in STM bzw. in PreservCyt Lösung mit ca. 10^6 positiven HeLa-Zellen mit integrierten HPV-18-Genomen versetzt („gespiked“). Jeder Probenotyp wurde gemäß den entsprechenden Verfahren der Probenvorbereitung und Denaturierung verarbeitet, wie in der zutreffenden Gebrauchsanweisung beschrieben, und unter Verwendung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Wiederfindung der HPV-18-DNA aus humanen Karzinomzellen bei beiden untersuchten Medien vergleichbar ist und dass die Probenvorbereitung in PreservCyt Lösung die analytische Sensitivität des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests nicht beeinträchtigt.

Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von PreservCyt Proben und automatisierter Probenvorbereitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits

Es wurden Studien mit Abstrichproben, die bei einer Subpopulation von Frauen mit normalem Zytologiebefund (n = 1276) und einer Subpopulation von Frauen mit dem Zytologiebefund „ASC-US“ oder darüber (n = 402) entnommen und in PreservCyt Lösung überführt wurden, durchgeführt. Die manuelle Probenvorbereitung und die Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits wurden für jede Abstrichprobe durchgeführt, anschließend erfolgte die automatisierte Testung mit dem RCS und dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (siehe folgende Tabelle 23).

Tabelle 23. Ergebnisübereinstimmung bei PreservCyt Proben zwischen manueller Probenvorbereitung und Probenverarbeitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits (n = 1678)

Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI	
Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO \geq 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO < 0,8)
96.0	97.6	96.2	99.1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

Die relative Assay-Sensitivität und -Spezifität bei Proben in PreservCyt Lösung, die unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits verarbeitet wurden, korrelieren stark mit den Ergebnissen, die nach manueller Probenvorbereitung erhalten wurden, wie die unteren Grenzwerte des 95%-Konfidenzintervalls sowohl bei der positiven als auch der negativen Übereinstimmung zeigen.

Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von PreservCyt Proben und automatisierter Probenvorbereitung von PreservCyt Proben unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits

Es wurden Studien mit Abstrichproben, die bei einer Subpopulation von Frauen im Alter von 30 Jahren oder älter entnommen und in PreservCyt Lösung überführt wurden, durchgeführt. Die Frauen hatten entweder einen normalen Befund (n = 1901) oder einen ASC-US-Befund bei der zytologischen Untersuchung (n = 398). Die manuelle Probenvorbereitung und die Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits wurden für jede Abstrichprobe

durchgeführt, anschließend erfolgte die Testung mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test (siehe folgende Tabelle 24).

Tabelle 24. Ergebnisübereinstimmung bei PreservCyt Proben zwischen manueller Probenvorbereitung und Probenverarbeitung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits (n = 2299)

Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI	
Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO \geq 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO $<$ 0,8)
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

Die relative Assay-Sensitivität und -Spezifität bei Proben in PreservCyt Lösung, die unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits verarbeitet wurden, korrelieren stark mit den Ergebnissen, die nach manueller Probenvorbereitung erhalten wurden, wie die unteren Grenzwerte des 95%-Konfidenzintervalls sowohl bei der positiven als auch der negativen Übereinstimmung zeigen.

Äquivalenz zwischen STM und manueller Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath

In den USA wurde eine zweiphasige klinische Evaluierung unter Beteiligung von sechs Zentren, in denen die Proben entnommen wurden, und drei Prüflabors durchgeführt. Patientinnen, die eine Fachabteilung für sexuell übertragbare Erkrankungen (STD = sexually transmitted diseases), eine gynäkologische oder Geburtshilfe-Klinik, eine Kolposkopie-Ambulanz, ein Krankenhaus oder eine Familienberatungsstelle besuchten, kamen für den Einschluss in die Studie gemäß den vorher festgelegten Einschluss- und Ausschlusskriterien infrage. An der Machbarkeitsphase, bei der ein zutreffender Grenzwert des digene HC2 High-Risk HPV DNA Tests zur Verwendung bei Postgradient-Zellpelletproben in SurePath bestimmt werden sollte, haben ca. 400 Patientinnen teilgenommen. Die klinische Validierungsphase zum Validieren des gewählten Grenzwertes, an der ca. 1.500 Patientinnen teilgenommen haben, begann, nachdem eine Interimanalyse der Machbarkeitsphase gezeigt hatte, dass ein Grenzwert von 1,0 RLU/CO bei Postgradient-Zellpelletproben in SurePath eine akzeptable Übereinstimmung mit den Ergebnissen von STM-Proben ergab.

In beiden Evaluierungsphasen wurden paarweise SurePath und STM-Zervixproben bei allen einwilligenden Patientinnen genommen. Anschließend wurde die Probe in SurePath zur Herstellung des Präparats an ein zytologisches Labor geschickt. Nach der zytologischen Präparation wurden die verbliebenen Postgradient-Zellpelletproben in SurePath und die entsprechenden STM-Proben mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test unter Verwendung eines Grenzwertes von 1,0 RLU/CO getestet (siehe nachfolgende Tabelle 25).

Tabelle 25. Ergebnisübereinstimmung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit STM-Proben (alle Altersgruppen und zytologische Klassifikationen) (n = 1.490)

Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI	
Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO \geq 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO < 0,8)
93.5	96.4	95.3	96.0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

Die relative Assay-Sensitivität und -Spezifität beim Testen von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath korrelieren stark mit den beim Testen von STM-Proben erzielten Ergebnissen, wie der untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls sowohl für positive als auch negative Übereinstimmung zeigt.

Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath und Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Diese Studien wurden mit SurePath Proben durchgeführt, die bei folgenden Subpopulationen entnommen wurden:

- Frauen mit normalem Zytologiebefund (n = 1189)
- Frauen mit Zytologiebefund ASC-US oder darüber (n = 199)

Für jede Probe in SurePath wurde eine Probenvorbereitung der Probe in SurePath mit QIASymphony DSP HPV Media Kit und eine manuelle Probenvorbereitung der Postgradient-Zellpelletprobe durchgeführt. Für jede der vorbereiteten Proben wurde automatisches Testen durch ein RCS mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchgeführt (siehe nachfolgende Tabelle 26).

Tabelle 26. Ergebnisäquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von Proben in SurePath und Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1.388)

Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI	
Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO \geq 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO $<$ 0,8)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

Die relative Assay-Sensitivität und -Spezifität bei Proben in SurePath Medium, die unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits verarbeitet wurden, korrelieren stark mit den Ergebnissen, die nach manueller Probenvorbereitung erhalten wurden, wie die unteren Grenzwerte des 95%-Konfidenzintervalls sowohl bei der positiven als auch der negativen Übereinstimmung zeigen.

Äquivalenz zwischen manueller Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath und Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Studien wurden durchgeführt mit Proben in SurePath, die von folgenden Subpopulationen entnommen wurden:

- Frauen mit normaler Zytologie (n = 1.200)
- Frauen mit einer Zytologie von ASC-US oder höher als ASC-US (n = 183)

Eine manuelle Probenvorbereitung und eine Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit wurden für alle Postgradient-Zellpelletproben in SurePath durchgeführt, worauf automatisches Testen durch ein RCS mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test folgte (siehe nachfolgende Tabelle 27).

Tabelle 27. Ergebnisübereinstimmung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath zwischen manueller Probenvorbereitung und Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1.383)

Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95 % KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95 % KI	
Alle positiven Ergebnisse	Bereich deutlich positiver Ergebnisse RLU/CO \geq 2,5	Alle negativen Ergebnisse	Bereich deutlich negativer Ergebnisse RLU/CO < 0,8
92,6 (188/203)	97,4 (147/151)	94,4 (1.114/1.180)	99,3 (1.078/1.086)
88,2 bis 95,5	93,4 bis 99,0	92,9 bis 95,6	98,6 bis 99,6

Die relative Assay-Sensitivität und -Spezifität von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath, die mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit vorbereitet wurden, korrelieren stark mit den Ergebnissen, die mit dem manuellen Probenvorbereitungsverfahren erzielt wurden, wie der untere Grenzwert des 95%-Konfidenzintervalls sowohl für positive als auch negative Übereinstimmung zeigt.

Übereinstimmung zwischen Testmethoden

Zur Evaluierung der Ergebnisse, die beim Testen klinischer Proben mit dem RCS erhalten wurden, im Vergleich zu den Testergebnissen bei Anwendung der manuellen Methode wurde eine multizentrische Studie (n = 2270) durchgeführt. Die Testung erfolgte in drei externen Prüflabors, außerhalb von QIAGEN; die verwendeten Proben waren von fünf beteiligten Einrichtungen bei den Patientinnen entnommen worden. Insgesamt bestand das Datenmaterial aus 1269 zervikalen Abstrichen, die nach Entnahme in PreservCyt Lösung und 1001 Abstrichen, die in STM aufgenommen worden waren.

Die statistischen Übereinstimmungen zwischen den paarweise genommenen Proben, die mit dem RCS bzw. nach der manuellen Testmethode verarbeitet wurden, wurden für diese Patientinnenpopulation berechnet (siehe folgende Tabellen 28 und 29).

Tabelle 28. Zusammenfassung der Übereinstimmung zwischen automatisiertem RCS-Testverfahren und der manuellen Testmethode – STM-Proben (n = 1001)

Zytologische Beurteilung	HPV- Prävalenz (%)	Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95-%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95-%-KI	
		Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO > 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 Jahre	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥ 30 Jahre	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US (Pap IIw)	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Sonstige	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Alle STM-Proben	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = im Normbereich (engl.: *within normal limits*).

Tabelle 29. Zusammenfassung der Übereinstimmung zwischen automatisiertem RCS-Verfahren und der manuellen Testmethode – PreservCyt Proben (n = 1269)

Zytologische Beurteilung	HPV Prävalenz (%)	Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI	
		Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO > 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO < 0,8)
WNL < 30 Jahre	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL ≥ 30 Jahre	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US (Pap IIw)	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Sonstige zytologische Befunde	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Alle PreservCyt Proben[†]	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

* WNL = im Normbereich (within normal limits).

[†]Von vier Patientinnen waren keine zytologischen Untersuchungsergebnisse verfügbar.

Eine ergänzende klinische Studie wurde an archivierten restlichen PreservCyt Proben, die bei einer Teilpopulation von Frauen im Alter von ≥ 30 Jahren und mit normalem zytologischem Befund und einer HPV-Prävalenz von 4,8 % entnommen worden waren, durchgeführt (siehe folgende Tabelle 30).

Tabelle 30. Zusammenfassung der Übereinstimmung zwischen automatisiertem RCS-Verfahren und der manuellen Testmethode – Frauen im Alter von ≥ 30 Jahren mit Testergebnis im Normbereich (WNL) (n = 2077)

Positive Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI		Negative Übereinstimmung (%) (n/N) 95%-KI	
Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO > 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO < 0,8)
92.0	91.8	99.3	99.7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

Es wurden sieben abweichende Ergebnisse zwischen der manuellen und der automatisierten RCS-Testmethode im stark positiven Bereich erhalten. Die ursprünglichen manuellen Testergebnisse bei diesen sieben Proben lagen außerhalb des für PreservCyt Proben empfohlenen Algorithmus für einen Wiederholtest; da das Studiendesign jedoch eine Dreifachbestimmung für alle Abstrichproben vorsah, lagen Ergebnisse von Wiederholproben zur Abklärung der Abweichungen vor.

Die Daten der Test-Wiederholung für jede der sieben abweichenden Proben deuten darauf hin, dass alle abweichenden Proben negativ für HPV-DNA waren (siehe folgende Tabelle 31). Aufgrund der für beide Wiederholproben erhaltenen negativen Ergebnisse bei der Test-Wiederholung handelte es sich bei jedem der ursprünglich positiven Ergebnisse beim manuellen Test wahrscheinlich um ein falsch-positives Ergebnis.

Tabelle 31. Abweichungen bei Analyse der PreservCyt Proben von Frauen im Alter von ≥ 30 Jahren mit Testergebnis im Normbereich (WNL) (n = 7)

Probe	Prüflabor	Manuelle Testung (RLU/CO)			Automatisierte Testung mit RCS (RLU/CO)		
		Ursprünglich	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Ursprünglich	Wiederholung 1	Wiederholung 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Die Ergebnisse dieser klinischen Studie deuten insgesamt auf eine Übereinstimmung zwischen RCS-automatisierter und manueller Testung hin, sowohl bei Verwendung von STM-Proben als auch bei PreservCyt Proben

Reproduzierbarkeit

Gesamtreproduzierbarkeit bei manueller Testung

Um die Reproduzierbarkeit bezüglich unterschiedlicher Tage und Labors und der Gesamtreproduzierbarkeit des digene HC2 High-Risk HPV DNA Tests zu bestimmen, wurde eine multizentrische Reproduzierbarkeitsstudie durchgeführt. Dabei wurde ein Panel bestehend aus HPV-DNA-Targets sowie HPV-positiven und HPV-negativen klinischen Abstrichproben, die nach Entnahme in STM aufgenommen worden waren, getestet.

Drei externe Laboratorien führten die Tests mit Kits der gleichen Charge des digene HC2 High-Risk HPV DNA Tests an drei verschiedenen Tagen mit einem identischen Reproduzierbarkeitspanel durch. Das Reproduzierbarkeitspanel bestand aus folgenden Proben:

- 12 denaturierte klinische Proben-Pools in STM
- 3 nicht denaturierte klinische Proben-Pools in PreservCyt Lösung
- Negativkalibrator
- Positiver Hochrisiko-HPV-Kalibrator mit Konzentrationen von 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml und 10 pg/ml.

Alle Panelproben wurden täglich in Dreifachbestimmung mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reproduzierbarkeit des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests bei Analyse von klinischen Proben in STM sehr gut ist (siehe folgende Tabelle 32).

Tabelle 32. Gesamtreproduzierbarkeit – multizentrische Reproduzier-barkeitsstudie (alle Läufe in allen Prüflabors)

Statistisches Maß	Ergebnis
Erwartete Positivproben mit gemessenem positivem Ergebnis (95%-KI)	100.0% (99.0–100.0)
Erwartete Negativproben mit gemessenem negativem Ergebnis (95%-KI)	99.0% (97.49–99.73)
Übereinstimmung (95%-KI)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Reproduzierbarkeit bei Analyse klinischer Proben in STM

Manuelle Testdurchführung

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit bei manueller Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests wurde eine Studie mit klinischen Proben, die in STM aufgenommen worden waren, durchgeführt. Dabei wurde ein Panel bestehend aus 20 gepoolten klinischen Proben (10 positive und 10 negative) getestet, die durch Kombination von zuvor getesteten Abstrichproben in STM präpariert wurden. Die Proben wurden jeweils als Vierfachbestimmung an fünf Tagen analysiert, sodass insgesamt 20 Wiederholungsmessungen pro Probe erhalten wurden. Die Tests wurden unter Verwendung eines kombinierten Sonden-Mix durchgeführt, der aus der High-Risk-HPV-Sonde und einer Niedrigrisiko-HPV-Sonde bestand. Es ist nicht zu erwarten, dass sich die Reproduzierbarkeit des Assays unterscheidet, wenn nur der Sonden-Mix beim *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test verwendet würde. Die berechneten Mittelwerte des RLU/CO-Verhältnisses mit 95%-Konfidenzintervall um den Mittelwert sind in Tabelle 33 wiedergegeben (siehe unten).

Tabelle 33. Reproduzierbarkeit bei Analyse von STM-Proben – manuelle Testdurchführung (Proben in absteigender Reihenfolge nach RLU/CO-Mittelwert)

Probenkennung	RLU/CO-Mittelwert	95%-KI	Positives Testergebnis (%) (n/N)
10	3.18	3.02–3.35	100 (20/20)
20	1.43	1.36–1.50	100 (20/20)
11	1.25	1.20–1.28	100 (20/20)
12	1.21	1.15–1.27	100 (20/20)
15	1.20	1.14–1.25	100 (20/20)
13	1.07	1.01–1.11	80 (16/20)
16	1.06	1.01–1.09	75 (15/20)
17	1.04	1.00–1.06	80 (16/20)
14	0.98	0.92–1.02	45 (9/20)
18	0.92	0.87–0.96	20 (4/20)
19	0.72	0.68–0.75	0 (0/20)
7	0.40	0.33–0.46	0 (0/20)
4	0.38	0.35–0.39	0 (0/20)
9	0.37	0.32–0.41	0 (0/20)
1	0.35	0.32–0.36	0 (0/20)
2	0.35	0.31–0.37	0 (0/20)
8	0.32	0.29–0.34	0 (0/20)
3	0.30	0.27–0.31	0 (0/20)
6	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
5	0.26	0.23–0.28	0 (0/20)

Bei den fünf Proben mit einem mittleren RLU/CO bei 20 % oder mehr über dem Cut-off ergaben alle 100 der insgesamt 100 Wiederholungsmessungen (100 %) ein positives Ergebnis. Bei den fünf Proben mit einem mittleren RLU/CO von weniger als 20 % über bzw. unter dem Cut-off waren 60 der insgesamt 100 Wiederholproben positiv (60 %; 95%-KI = 49,7–69,6) und 40 von 100 (40 %) negativ. Bei den zehn Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr unter dem Cut-off ergaben alle 200 der insgesamt 200 Wiederholungsmessungen (100 %) ein positives Ergebnis.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für Proben, deren Testergebnis um mindestens 20 % über oder unter dem Cut-off-Wert liegt, konsistente Ergebnisse erwartet werden können. Bei Proben mit einem Ergebnis nahe am Cut-off wurden in etwa vergleichbare Anzahlen positiver und negativer Testergebnisse erhalten. Diese Daten zeigen, dass bei STM-Proben die manuelle Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Automatisierte Testdurchführung mit RCS

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit innerhalb eines Laufs, von Tag zu Tag sowie der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bei der automatisierten Testdurchführung mit dem RCS wurde eine weitere Studie unter Verwendung von Proben in STM mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchgeführt. Dabei wurde ein Panel bestehend aus 16 gepoolten klinischen Proben (siehe folgende Tabelle 34) mit einer Reagenzien-Charge getestet, und zwar zweimal pro Tag an drei verschiedenen Tagen. Jedes Panel-Element wurde als Vierfachbestimmung getestet.

Tabelle 33. Reproduzierbarkeit bei Analyse von STM-Proben – Verwendetes Testpanel bei automatisierter Testdurchführung mit dem RCS

Panel-Element	RLU/CO (approximiert)	Erwartetes Testergebnis
1N	<0.4	negativ
2N	0.4–0.8	negativ
3P	0.8–1.2	stark negativ / schwach positiv
4P	0.8–1.2	stark negativ / schwach positiv
5P	0.8–1.2	stark negativ / schwach positiv
6P	1.2–2.0	schwach positiv
7P	1.2–2.0	schwach positiv
8P	1.2–2.0	schwach positiv
9P	2.0–5.0	schwach positiv
10P	5.0–10.0	moderat positiv
11N	<0.4	negativ
12N	<0.4	negativ
13N	<0.4	negativ
14XR	Niedrigrisiko-HPV-DNA-positives klinisches Material in negativem klinischem STM-Proben-Pool	stark negativ / schwach positiv
15XR	Niedrigrisiko-HPV-DNA-Plasmid in negativem klinischem STM-Proben-Pool	stark negativ / schwach positiv
16XR	Plasmidvektor-DNA-Kontrolle in negativem klinischem STM-Proben-Pool	stark negativ / schwach positiv

Zwei der Proben des Panels (14XR und 15XR) wurden mitgeführt, um die Möglichkeit einer Kreuzhybridisierung des Sonden-Mix des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests mit Proben, die nur die Niedrigrisiko-HPV-DNA-Typen 6, 11, 42, 43 und 44 enthalten, zu evaluieren. Die Probe 16XR des Panels bestand aus pGEM® DNA in einer Konzentration von 1,49 ng/ml und diente als Vektorkontrolle für Probe 15XR des Panels. Die Ergebnisse dieser Testreihe zeigten, dass es nicht zu falsch-positiven Testergebnissen aufgrund des Vorhandenseins von Niedrigrisiko-HPV-DNA-Typen in

klinischen Proben kommt. Diese Ergebnisse sind mit denen bei manueller Testdurchführung konsistent.

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäß der in der Norm NCCLS E5-A* beschriebenen Methode berechnet (siehe folgende Tabelle 35). Diese Methode erfordert die Berechnung der Varianz-Komponenten für jede der Ursachen der Variabilität: Labor, Tag, Lauf und Fehler (auch als Inter-Assay- oder "Between-Assay"-Varianz definiert).

Table 35. Reproduzierbarkeit bei Analyse von STM-Proben – automa-tisierte Testdurchführung mit dem RCS; quantitative Reproduzierbarkeit

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung				Gesamt	Gesamt-CV (%)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Läufen	Zwischen Tagen	Zwischen Labors		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P†	70	1.95	N/A‡	N/A‡	N/A‡	N/A‡	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Negative Varianz-Komponenten werden gleich null gesetzt.

† Durch zwei ungültige Wiederholproben bei Probe 8P des Panels war eine Analyse der Varianz-Komponenten aufgrund der ungleichen Größe der verglichenen Gruppen unmöglich.

‡ Varianzanalyse unmöglich, da weniger Wiederholproben als bei anderen Proben des Panels.

Reproduzierbarkeit bei Analyse klinischer Proben in PreservCyt Lösung

Manuelle Testdurchführung.

Die Reproduzierbarkeit bei der manuellen Testung von PreservCyt Proben mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test wurde in einer Studie ermittelt, bei der 24 Pseudo-Abstrichproben

(“mock specimens”) mit verschiedenen HPV-DNA-Konzentrationen analysiert wurden. Die Proben bestanden aus PreservCyt Lösung und Leukozyten, mit bzw. ohne Bakterien, die HPV-16-Plasmid-DNA enthielten.

Diese Pseudo-Abstrichproben wurden jeweils als Vierfachbestimmung an fünf Tagen analysiert, sodass insgesamt 20 Wiederholungsmessungen pro Probe erhalten wurden. An jedem der fünf Studientage wurde eine 8-ml-Probe von jeder Pseudo-Abstrichprobe gemäß der Gebrauchsanweisung des *digene* HC2 Sample Conversion Kit vorbereitet und dann getestet. Die berechneten Mittelwerte mit 95%-KI sind in Tabelle 35 wiedergegeben.

Tabelle 36. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – manuelle Testdurchführung nach manueller Probenvorbereitung (Proben in absteigender Reihenfolge nach RLU/CO-Mittelwert)

Probenkennung	RLU/CO-Mittelwert	95%-KI	Positives Testergebnis (%) (n/N)
21	3.51	3.19–3.83	100 (20/20)
12	1.58	1.48–1.69	100 (20/20)
13	1.42	1.32–1.52	100 (20/20)
17	1.38	1.23–1.53	90 (18/20)
18	1.36	1.23–1.48	95 (19/20)
15	1.32	1.16–1.49	85 (17/20)
23	1.17	1.06–1.27	75 (15/20)
16	1.14	1.07–1.20	75 (15/20)
20	1.10	0.96–1.21	85 (17/20)
19	1.06	0.95–1.17	45 (9/19)
22	1.05	0.99–1.10	70 (14/20)
11	1.04	0.96–1.11	65 (13/20)
14	0.94	0.86–1.01	25 (5/20)
24	0.77	0.73–0.81	0 (0/20)
3	0.28	0.25–0.30	0 (0/20)
1	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
7	0.27	0.25–0.30	0 (0/20)
2	0.27	0.25–0.28	0 (0/20)
5	0.26	0.24–0.28	0 (0/20)
4	0.24	0.22–0.25	0 (0/20)
9	0.23	0.21–0.25	0 (0/20)
8	0.22	0.18–0.27	0 (0/20)
10	0.22	0.20–0.25	0 (0/20)
6	0.19	0.17–0.21	0 (0/20)

Bei den sechs Proben mit einem mittleren RLU/CO bei 20 % oder mehr über dem Cut-off ergaben 114 der insgesamt 120 Wiederholungsmessungen (95 %) ein positives Ergebnis. Bei den sieben Proben mit einem mittleren RLU/CO von weniger als 20 % über bzw. unter dem Cut-off waren 88 der insgesamt 139 Wiederholproben positiv (63,3 %; 95%-KI = 54,3–70,9) und 51 von 139 (36,7 %) negativ. Bei den vier Proben, deren Ergebnis innerhalb des Bereichs zwischen 10 % unter und 10 % über dem Cut-off lag, ergaben 41 der 79 Wiederholungsmessungen (51,9 %) ein positives Ergebnis und 38 von 79 (48,1 %) waren negativ. Bei den 11 Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr unter dem Cut-off ergaben alle 220 der insgesamt 220 Wiederholungsmessungen (100 %) ein negatives Ergebnis.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für Proben, deren Testergebnis um mindestens 20 % über oder unter dem Cut-off-Wert liegt, konsistente Ergebnisse erwartet werden können. Bei Proben mit einem Ergebnis nahe am Cut-off wurden in etwa vergleichbare Anzahlen positiver und negativer Testergebnisse erhalten. Diese Daten zeigen, dass bei PreservCyt Proben die manuelle Durchführung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Automatisierte Testdurchführung mit RCS nach manueller Probenvorbereitung

Es wurde eine interne Untersuchung mittels automatisierter Testdurchführung mit dem RCS durchgeführt, bei der klinische Abstrichproben in PreservCyt analysiert wurden, die überwiegend bei Frauen mit einem Zytologiebefund „ASC-US“ oder höheren Grades entnommen worden waren (HPV-Prävalenz 57 %). Die Proben wurden in zwei Aliquots aufgeteilt und jedes Aliquot dann einzeln unter Verwendung des *digene* HC2 Sample Conversion Kits verarbeitet und anschließend als Doppelbestimmung mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test analysiert.

Wie bei anderen qualitativen in-vitro-diagnostischen Tests ist die Variabilität der Ergebnisse, die bei der Analyse klinischer Proben mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test erhalten werden, hauptsächlich mit einem der folgenden Teilprozesse, oder einer Kombination von ihnen, verbunden: Entnahme der Abstrichprobe, Probenvorbereitung für den Test und die Durchführung des Tests. Da die verglichenen Testergebnisse mit derselben klinischen Probe gewonnen wurden, wurde mit dem experimentellen Design die Variabilität aufgrund der Probenentnahme erfasst. Die Wiederholpräzision der Ergebnisse, die mit zwei einzeln vorbereiteten Aliquots aus derselben klinischen Abstrichprobe erhalten wurden (im Folgenden als „Präzision zwischen vorbereiteten Aliquots“ bezeichnet), spiegelt die Streuung aufgrund der gewählten Kombination aus Probenvorbereitung und dem Testverfahren wider. Die Wiederholpräzision der Ergebnisse, die mit demselben Aliquot erhalten wurden (im Folgenden „Intra-Assay-Präzision bei einem vorbereiteten Aliquot“ bezeichnet) spiegelt lediglich die Streuung bei dem gewählten Testverfahren wider (siehe folgende Tabelle 37).

Tabelle 37. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – automatisierte Testdurchführung mit RCS nach manueller Proben-vorbereitung; qualitative Wiederholpräzision

Analyse	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamt-Übereinstimmung (%)	
	(n/N) 95%-KI	(n/N) 95%-KI	(n/N) 95%-KI	
Intra-Assay-Präzision bei einem vorbereiteten Aliquot	Alle Daten	99.62 (261/262)	94.7 (160/169)	97.7 (421/431)
		97.9–100.0	90.1–97.5	95.8–98.9
	Stark positiver und stark negativer Bereich	100.0 (249/249)	98.2 (160/163)	99.3 (409/412)
		98.5–100.0	94.7–99.6	97.9–99.9
Präzision zwischen vorbereiteten Aliquots	Alle Daten	99.6 (264/265)	98.2 (163/166)	99.1 (427/431)
		97.9–100.0	94.8–99.6	97.6–99.8
	Stark positiver und stark negativer Bereich	100.0 (249/249)	99.4 (161/162)	99.8 (410/411)
		98.5–100.0	96.6–100.0	98.7–100.0

Um die quantitative Wiederholpräzision der erhaltenen Ergebnisse bei automatisierter RCS-Testdurchführung mit Pseudo-Abstrichproben in PreservCyt Lösung evaluieren zu können, wurde eine weitere Studie durchgeführt. An dieser nahmen drei Testlabors teil, eines davon bei QIAGEN.

Jedes Testlabor führte den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test sowohl automatisiert mit dem RCS als auch manuell durch, und zwar jeweils 2-mal pro Tag, an fünf verschiedenen Tagen und unter Verwendung eines zur Verfügung gestellten Reproduzierbarkeitspanels bestehend aus sechs Proben. Jedes Panel-Element bestand aus PreservCyt Lösung, in die kultivierte Zellen pipettiert („gespiked“) wurden, sodass sich ein ungefähr entsprechender (approximierter) RLU/CO-Wert ergab (siehe folgende Tabelle 38).

Die HPV-DNA-positiven Panel-Proben wurden angesetzt, indem verschiedene Mengen HPV-DNA-positiver SiHa-Zellen (aus einer laboreigenen Zelllinie) hinzugegeben wurden. Bei der negativen Panel-Probe wurden HPV-negative Jurkat-Zellen (aus einer anderen laboreigenen Zelllinie) hinzugegeben. Die Endkonzentration an Zellen betrug bei allen sechs Proben des Testpanels ca. 5×10^4 Zellen/ml.

Tabelle 38. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – automatisierte Testdurchführung mit RCS nach manueller Probenvorbereitung; Proben des Testpanels für Bestimmung der quantitativen Wiederholpräzision

Panel-Element	Zelltyp	RLU/CO (approximiert)	Erwartetes Ergebnis
1N	Jurkat	< 1,0	negativ
2N	Jurkat	< 1,0	negativ
3P	SiHa und Jurkat	5,0–8,0	schwach positiv
4P	SiHa und Jurkat	5,0–8,0	schwach positiv
5P	SiHa	30,0–50,0	moderat positiv
6P	SiHa	200,0	stark positiv

Die Reproduzierbarkeit wurde gemäß der in der Norm NCCLS E5-A (46) beschriebenen Methode berechnet (siehe folgende Tabelle 39). Diese Methode erfordert die Berechnung der Varianz-Komponenten für jede der Ursachen der Variabilität: Labor, Tag, Lauf und Fehler (auch als Inter-Assay- oder "Between-Assay"-Varianz definiert). Jedes Panel-Element wurde bei jedem der zehn Läufe (jeweils zwei Läufe pro Tag an den fünf Tagen der Testung) von jedem der drei Testlabors als Vierfachbestimmung analysiert.

Tabelle 39. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – automatisierte Testdurchführung mit RCS nach manueller Probenvorbereitung; quantitative Wiederholpräzision

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung				Gesamt	Gesamt-CV (%)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Läufen	Zwischen Tagen	Zwischen Labors		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

* Negative Varianz-Komponenten werden gleich null gesetzt.

Zur Ergänzung dieser anfänglichen Reproduzierbarkeitsstudie um Daten von Proben, deren Ergebnis im Bereich des Assay-Cut-off-Werts liegen, wurde zusätzlich in einem externen Labor eine Studie zur Präzision unter Verwendung des RCS durchgeführt.

Das Testpanel bestand aus einer negativen, zwei negativen oder schwach positiven und zwei schwach positiven Proben. Jedes Panel-Element wurde durch Aufdotierung („Spiken“) kultivierter Jurkat- und SiHa-Zellen in PreservCyt Lösung so angesetzt, dass die in Tabelle 40 (siehe unten) angegebenen Ziel-RLU/CO-Werte resultierten.

Das externe Testlabor führte die RCS-automatisierten Analysen mit einer einzigen Reagenzien-Charge des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests bei jedem Test-Lauf durch; es wurden jeweils zwei Tests pro Tag an drei verschiedenen Tagen mit dem zur Verfügung gestellten Testpanel bestehend aus fünf Pseudo-Abstrichproben in PreservCyt Lösung durchgeführt. Jedes Panel-Element wurde in vier Teilproben aliquotiert und alle vier Aliquots wurden auf derselben Mikrotestplatte getestet (siehe unten, Tabelle 41).

Tabelle 40. Reproduzierbarkeit von Proben in PreservCyt – automatischer Test mit RCS nach manueller Probenvorbereitung; quantitative Reproduzierbarkeit nahe am Assay-Grenzwert mit Proben des Testpanels

Panel-Element	RLU/CO-Wert (approximiert)	Erwartetes Ergebnis
1N	0,2	negativ
2P	0,8–1,2	stark negativ / schwach positiv
3P	0,8–1,2	stark negativ / schwach positiv
4P	1,2–2,0	schwach positiv
5P	1,2–2,0	schwach positiv

Tabelle 41. Reproduzierbarkeit von Proben in PreservCyt – automatischer Test mit RCS nach manueller Probenvorbereitung; quantitative Reproduzierbarkeit nahe am Assay-Grenzwert

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung				Gesamt	CV (%)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Läufen	Zwischen Tagen			
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12	
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84	
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70	
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73	
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63	

* Negative Varianz-Komponenten werden gleich null gesetzt.

Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits

In einer internen Studie zur Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits wurden klinische PreservCyt Abstrichproben, die bei Frauen mit einem der beiden folgenden Zytologiebefunde genommen worden waren, analysiert:

- ASC-US oder darüber
- negativ in Bezug auf intraepitheliale Läsion oder bösartigen Tumor (NILM = intraepithelial lesion or malignancy)

Von jeder Abstrichprobe wurden zwei Teilproben für die Probenvorbereitung entnommen. Jede Probe wurde einzeln unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits verarbeitet und die Ergebnisse durch Analyse nach dem RCS-automatisierten Testverfahren mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test bestimmt.

Wie bei anderen qualitativen in-vitro-diagnostischen Tests ist die Variabilität der Ergebnisse, die bei der Analyse klinischer Proben mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test erhalten werden, hauptsächlich mit einem der folgenden Teilprozesse, oder einer Kombination von ihnen, verbunden: Entnahme der Abstrichprobe, Probenvorbereitung für den Test und die Durchführung des Tests. Da die verglichenen Testergebnisse mit derselben klinischen Abstrichprobe gewonnen wurden, wurde mit dem experimentellen Design die Variabilität aufgrund der Probenentnahme erfasst (auch als „Wiederholpräzision zwischen Proben“ bezeichnet). Die Wiederholpräzision der Ergebnisse (siehe folgende Tabelle 42), die mit zwei einzeln vorbereiteten Proben aus derselben klinischen Abstrichprobe erhalten wurden, spiegelt die Streuung aufgrund der Probenvorbereitung und des Testverfahrens wider.

Tabelle 42. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits; qualitative Wiederholpräzision zwischen Proben

Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamt-Übereinstimmung
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95%-KI	95%-KI	95%-KI
99.0	96.4	97.3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94.3–99.8	92.4–98.3	94.6–98.7

Eine weitere Studie wurde durchgeführt, um die Wiederholpräzision der Ergebnisse bei Analyse von Pseudo-Abstrichproben in PreservCyt Lösung zu evaluieren. Dazu wurde im Anschluss an die Probenverarbeitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits die automatisierte Testung mit dem RCS und dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchgeführt. Die acht Positivproben des Testpanels wurden durch Zugabe von HPV-DNA-positiven SiHa- oder HeLa-Zellen zu HPV-DNA-negativen C-33-A-Zellen in PreservCyt Lösung hergestellt; die zwei HPV-DNA-negativen Proben des Panels enthielten dagegen nur die HPV-DNA-negativen C-33-A-Zellen.

Drei Laboranten führten an einem Tag die Testung mit den Panel-Elementen 2N, 3E, 5P, 7P und 9P durch, wobei sie drei verschiedene QIASymphony SP Geräte sowie drei unterschiedliche Chargen des QIASymphony DSP HPV Media Kits verwendeten. Von den Panel-Elementen 2N, 3E, 5P und 7P wurden 18 Wiederholproben (Replikate), verteilt auf drei verschiedene Läufe getestet, sodass 54 Datenpunkte für jedes Panel-Element erhalten wurden. Vom Panel-Element 9P wurden 16 Replikate, verteilt auf drei Läufe, getestet, sodass in diesem Fall 48 Datenpunkte erhalten wurden.

Ein Laborant führte den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test an drei verschiedenen Tagen mit den Panel-Elementen 1N, 4E, 6P, 8P und 10P durch; dabei wurden drei verschiedene QIASymphony SP Geräte und eine Charge des QIASymphony DSP HPV Media Kits verwendet. Von den Panel-Elementen 1N, 4E, 6P und 8P wurden 18 Replikate, verteilt auf acht verschiedene Läufe getestet, sodass 144 Datenpunkte für jedes dieser Panel-Elemente erhalten wurden. Vom Panel-Element 10P wurden 16 Replikate, verteilt auf acht Läufe, getestet, sodass in diesem Fall 128 Datenpunkte erhalten wurden.

Bei den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von mindestens 20 % über dem Cut-off ergaben 572 von 572 (100,0 %) ein positives Ergebnis. Von den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von weniger als 20 % über bzw. unter dem Cut-off waren 98 von 198 (49,5 %) positiv und 100 von 198 (50,5 %) negativ. Bei den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von mindestens 20 % unter dem Cut-off ergaben 198 von 198 (100,0 %) ein negatives Ergebnis (siehe folgende Tabelle 43).

Tabelle 43. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits; qualitative Wiederholpräzision

Panel-Element	Zelltyp	RLU/CO-Mittelwert	Standard-abweichung	Positives Testergebnis (%) (n/N)
1N	C-33 A	0,37	0,05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0,41	0,06	0 (0/54)
3E	HeLa und C-33 A	0,81	0,11	6 (3/54)
4E	SiHa und C-33 A	1,09	0,18	66 (95/144)
5P	HeLa und C-33 A	3,17	0,46	100 (54/54)
6P	SiHa und C-33 A	4,81	0,74	100 (144/144)
7P	HeLa und C-33 A	6,77	0,97	100 (54/54)
8P	SiHa und C-33 A	9,41	1,39	100 (144/144)
9P	HeLa und C-33 A	13,72	2,81	100 (48/48)
10P	SiHa und C-33 A	28,13	5,08	100 (128/128)

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für Proben, deren Testergebnis um mindestens 20 % über oder unter dem Cut-off-Wert liegt, konsistente Ergebnisse erwartet werden können. Bei Proben mit einem Ergebnis nahe am Cut-off wurden nahezu vergleichbare Anzahlen positiver und negativer Testergebnisse erhalten. Diese Daten zeigen, dass die Verarbeitung von Abstrichproben in PreservCyt Lösung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits und die

anschließend durchgeführte Testung mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Die Ergebnisse dieser internen Studie dienen auch dazu, die quantitative Wiederholpräzision der Ergebnisse, die nach der Verarbeitung von PreservCyt Abstrichproben unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits erhalten wurden, zu evaluieren (siehe die folgenden Tabellen 44 und 45).

Tabelle 44. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits; quantitative Wiederholpräzision bei demselben Laboranten

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung			Gesamt-Standardabweichung (berechnet)	Gesamt-CV (% , berechnet)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Läufen	Zwischen Kombinationen*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Bedeutet zwischen Kombinationen aus QIASymphony SP Geräten und verschiedenen Tagen.

Tabelle 45. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP HPV Media Kits; quantitative Wiederholpräzision am selben Tag

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung		Gesamt-Standardabweichung (berechnet)	Gesamt-CV (% , berechnet)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Läufen†		
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

† Bei einem Lauf wird eine Kombination bestehend aus einem QIASymphony DSP HPV Media Kit und einem QIASymphony SP Gerät von jeweils einem Laboranten verwendet.

Die quantitative Wiederholpräzision ist sehr hoch; dies zeigt sich dadurch, dass alle CV-Werte unter 25 % liegen. Die Standardabweichungen zwischen Läufen sind mit dem entsprechenden

Wert innerhalb eines Laufs vergleichbar, was darauf hindeutet, dass unabhängig von verwendetem Gerät oder verwendeter Kit-Charge konsistente Ergebnisse erhalten werden.

Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

In einer internen Studie zur Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits wurden klinische PreservCyt Abstrichproben, die bei Frauen mit dem Zytologiebefund „ASC-US“ oder „NILM“ genommen worden waren, analysiert. Von jeder Abstrichprobe wurden zwei Teilproben für die Probenvorbereitung entnommen. Jede Probe wurde einzeln unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits verarbeitet und die Ergebnisse durch Analyse nach dem RCS-automatisierten Testverfahren mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test bestimmt.

Wie bei anderen qualitativen in-vitro-diagnostischen Tests ist die Variabilität der Ergebnisse, die bei der Analyse klinischer Proben mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test erhalten werden, hauptsächlich mit einem der folgenden Teilprozesse, oder einer Kombination von ihnen, verbunden: Entnahme der Abstrichprobe, Probenvorbereitung für den Test und die Durchführung des Tests. Da die verglichenen Testergebnisse mit derselben klinischen Abstrichprobe gewonnen wurden, wurde mit dem experimentellen Design die Variabilität aufgrund der Probenentnahme erfasst (auch als „Wiederholpräzision zwischen Proben“ bezeichnet). Die Wiederholpräzision der Ergebnisse (siehe folgende Tabelle 46), die mit zwei einzeln vorbereiteten Proben aus derselben klinischen Abstrichprobe erhalten wurden, spiegelt die Streuung aufgrund der Probenvorbereitung und des Testverfahrens wider.

Tabelle 46. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits; qualitative Wiederholpräzision zwischen Proben

Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamt-Übereinstimmung
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95%-KI	95%-KI	95%-KI
95.3	96.7	96.2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89.4–98.0	92.3–98.5	93.3–97.9

Eine weitere Studie wurde durchgeführt, um die Wiederholpräzision der Ergebnisse bei Analyse von Pseudo-Abstrichproben in PreservCyt Lösung zu evaluieren. Dazu wurde im Anschluss an die Probenverarbeitung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits die automatisierte Testung mit dem RCS und dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchgeführt.

Dazu führten drei Laboranten an drei verschiedenen Tagen den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test unter Verwendung unterschiedlicher Geräte und verschiedener Reagenzien-Chargen mit

einem Testpanel aus neun Proben durch. Jedes Panel-Element wurde jeweils als Doppelbestimmung in 24 verschiedenen Läufen analysiert, sodass insgesamt 48 Datenpunkte für jedes Panel-Element erhalten wurden. Die acht Positivproben des Testpanels wurden durch Zugabe von HPV-DNA-positiven SiHa- oder HeLa-Zellen zu HPV-DNA-negativen H9-Zellen in PreservCyt Lösung hergestellt; die HPV-DNA-negativen Proben des Panels enthielten dagegen nur die HPV-DNA-negativen H9-Zellen.

Bei den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von mindestens 20 % über dem Cut-off ergaben 237 von 240 (98,8 %) ein positives Ergebnis. Von den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von weniger als 20 % über bzw. unter dem Cut-off waren 95 von 144 (66,0 %) positiv und 49 von 144 (34,0 %) negativ. Bei den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von mindestens 20 % unter dem Cut-off ergaben 48 von 48 (100,0 %) ein negatives Ergebnis (siehe folgende Tabelle 47).

Tabelle 47. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits; qualitative Wiederholpräzision

Panel-Element	Zelltyp	RLU/CO-Mittelwert	Standard-abweichung	Positives Testergebnis (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 und HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 und HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 und SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 und SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 und HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 und SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 und HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 und SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für Proben, deren Testergebnis um mindestens 20 % über oder unter dem Cut-off-Wert liegt, konsistente Ergebnisse erwartet werden können. Bei Proben mit einem Ergebnis nahe am Cut-off wurden nahezu vergleichbare Anzahlen positiver und negativer Testergebnisse erhalten. Diese Daten zeigen, dass die Verarbeitung von Abstrichproben in PreservCyt Lösung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits und die anschließend durchgeführte Testung mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Die Ergebnisse dieser internen Studie dienen auch dazu, die quantitative Wiederholpräzision der Ergebnisse, die nach Verarbeitung der PreservCyt Proben mit dem QIASymphony DSP AXpH DNA Kit erhalten wurden, zu evaluieren (siehe folgende Tabelle 48).

Tabelle 48. Reproduzierbarkeit bei Analyse von PreservCyt Proben – Probenvorbereitung mithilfe des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits; quantitative Wiederholpräzision

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung			Gesamt-Standardabweichung (berechnet)	Gesamt-CV (%; berechnet)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Läufen	Zwischen Kombinationen*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

* Bedeutet zwischen Kombinationen bestehend aus *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test-Kit, QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, verwendetem RCS und QIASymphony SP Gerät sowie dem jeweiligen Laboranten.

Reproduzierbarkeit bei Analyse klinischer Proben in SurePath Konservierungsmedium

Manuelle Testdurchführung

Die Reproduzierbarkeit des manuellen Testens von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests wurde in einer Studie mit drei verschiedenen Labors untersucht. Die Proben des Testpanels wurden unter Anwendung eines Grenzwerts von 1,0 RLU/CO an verschiedenen Tagen und in verschiedenen Läufen getestet; es wurde jeweils ein identischer Satz von Proben mit bekanntem positiven oder negativen HPV-Status verwendet. Das Testpanel bestand aus 5 positiven, 2 deutlich negativen/schwach positiven und 5 negativen Proben.

Jede Probe des Testpanels wurde durch Kombination einzelner klinischer Abstrichproben, die in SurePath Konservierungsmedium aufgenommen worden waren und deren negativer bzw. positiver HPV-Status bekannt war, angesetzt, und zwar so, dass die gewünschten Ziel-RLU/CO-Werte eingestellt wurden. Jede Panel-Probe wurde als Doppelbestimmung, zweimal pro Tag, über

einen Zeitraum von fünf Tagen in jedem der drei teilnehmenden Labors getestet (siehe folgende Tabelle 49).

Tabelle 49. Reproduzierbarkeit von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath – manuelles Testen; qualitative Reproduzierbarkeit

Panel-Element	RLU/CO-Mittelwert	Positives Testergebnis (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

RCS-automated testing

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath bei automatischem Testen mit dem RCS wurden mit den Ergebnissen verglichen, die beim manuellen Testen erhalten wurden. Dazu wurden zwei separate Aliquote aus derselben verarbeiteten Postgradient-Zellpelletprobe in SurePath (von derselben Abstrichprobe) getestet (siehe nachfolgende Tabelle 50).

Tabelle 50. Reproduzierbarkeit von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath – automatisches Testen mit dem RCS; Ergebnisübereinstimmung zwischen automatischem Testen mit RCS und manuellem Testen

Positive Übereinstimmung (%)		Negative Übereinstimmung (%)	
(n/N)		(n/N)	
95%-KI		95%-KI	
Alle Positiven	Stark positiver Bereich (RLU/CO \geq 2,5)	Alle Negativen	Stark negativer Bereich (RLU/CO < 0,8)
99.0	100.0	97.7	98.7
(417/421)	(375/375)	(1057/1079)	(1050/1064)
97.6–99.7	99.0–100.0	96.9–98.75	97.8–99.28

Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Eine Studie wurde durchgeführt, um die Wiederholpräzision der Ergebnisse bei Analyse von Pseudo-Abstrichproben in SurePath Medium zu evaluieren. Dazu wurde im Anschluss an die Probenverarbeitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits die automatisierte Testung mit dem RCS und dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchgeführt. Die vier Positivproben des Testpanels wurden durch Zugabe von HPV-DNA-positiven SiHa-Zellen zu HPV-DNA-negativen H9-Zellen in SurePath Konservierungsmedium hergestellt; die HPV-DNA-negativen Panel-Elemente enthielten dagegen nur die HPV-DNA-negativen H9-Zellen in SurePath Medium.

Drei Laboranten führten an sechs verschiedenen Tagen die Testung mit den Panel-Elementen 1N, 2E, 3P, 4P und 5P durch, wobei sie drei verschiedene QIASymphony SP Geräte sowie drei unterschiedliche Chargen des QIASymphony DSP HPV Media Kits verwendeten. Von den Panel-Elementen 1N, 2E, 3P und 4P wurden 18 Replikate in 37 verschiedenen Läufen getestet; insgesamt wurden 666 Datenpunkte für die Panel-Elemente 2E und 3P bzw. 665 Datenpunkte für die Panel-Elemente 1N und 4P erhalten. Vom Panel-Element 5P wurden 16 Replikate in 37 Läufen getestet; insgesamt wurden für dieses Panel-Element 590 Datenpunkte erhalten. Vier Datenpunkte wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da die zugehörigen Proben während der Probenverarbeitung vom QIASymphony SP aufgrund unzureichenden Volumens mit einem entsprechenden Flag gekennzeichnet wurden.

Bei den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von mindestens 20 % über dem Cut-off ergaben 1921 von 1921 (100,0 %) ein positives Ergebnis. Von den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von weniger als 20 % über bzw. unter dem Cut-off waren 410 von 666 (61,6 %) positiv und 256 von 666 (38,4 %) negativ. Bei den Panel-Elementen mit einem RLU/CO-Mittelwert von mindestens 20 % unter dem Cut-off ergaben 664 von 665 (99,8 %) ein negatives Ergebnis (siehe folgende Tabelle 51).

Tabelle 51. Reproduzierbarkeit bei Analyse von SurePath Proben – Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits; qualitative Wiederholpräzision

Panel-Element	Zelltyp	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung	Positives Testergebnis (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa and H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa and H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa and H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa and H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Die Ergebnisse zeigen, dass für Proben in SurePath, deren Testergebnis um mindestens 20 % vom Grenzwert entfernt liegt, konsistente Ergebnisse erwartet werden können. Proben in SurePath nahe am Grenzwert ergaben annähernd gleiche Zahlen positiver und negativer Ergebnisse. Bei Proben mit einem Ergebnis nahe am Cut-off wurden nahezu vergleichbare Anzahlen positiver und negativer Testergebnisse erhalten. Diese Daten zeigen, dass die Verarbeitung von Abstrichproben in SurePath Medium unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits und die anschließend durchgeführte Testung mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Die Ergebnisse dieser internen Studie dienten auch dazu, die quantitative Wiederholpräzision der Ergebnisse, die nach Verarbeitung der SurePath Proben mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit erhalten wurden, zu evaluieren (siehe folgende Tabelle 51).

Drei Laboranten führten an sechs verschiedenen Tagen die Testung mit den Panel-Elementen 1N, 2E, 3P, 4P und 5P durch, wobei sie drei verschiedene QIASymphony SP Geräte sowie drei unterschiedliche Chargen des QIASymphony DSP HPV Media Kits verwendeten. Von den Panel-Elementen 1N, 2E, 3P und 4P wurden 18 Replikate getestet; insgesamt wurden 162 Datenpunkte für jedes dieser Panel-Elemente erhalten. Vom Panel-Element 5P wurden 16 Replikate in Läufen getestet; insgesamt wurden für dieses Panel-Element 144 Datenpunkte erhalten (siehe folgende Tabelle 52).

Tabelle 52. Reproduzierbarkeit bei Analyse von SurePath Proben – Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits; quantitative Wiederholpräzision

Panel-Element	n	RLU/CO-Mittelwert	Standardabweichung			Gesamt-Standardabweichung (berechnet)	Gesamt-CV (%; berechnet)
			Innerhalb eines Laufs	Zwischen Tagen	Zwischen Kombinationen*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

* Bei einem Lauf wird eine Kombination bestehend aus einem QIASymphony DSP HPV Media Kit und einem QIASymphony SP Gerät von jeweils einem Laboranten an einem bestimmten Tag verwendet.

Die quantitative Wiederholpräzision ist sehr hoch; dies zeigt sich dadurch, dass alle CV-Werte unter 26 % liegen. Die Standardabweichungen zwischen Läufen sind mit dem entsprechenden Wert innerhalb eines Laufs vergleichbar, was darauf hindeutet, dass unabhängig von verwendetem Gerät oder verwendeter Kit-Charge konsistente Ergebnisse erhalten werden

Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Eine Studie wurde durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen mit simulierten Postgradient-Zellpelletproben in SurePath zu evaluieren. Einer Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit folgte ein automatisches Testen durch ein RCS mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Zellkulturmaterial in 70 % SurePath Preservative Fluid wurde verwendet, um Postgradient-Zellpelletproben in SurePath zu imitieren. Die 4 positiven Proben des Testpanels wurden durch Zugabe von HPV-DNA-positiven SiHa-Zellen zu HPV-DNA-negativen H-9-Zellen in SurePath Preservative Fluid vorbereitet, während die HPV-DNA-negative Probe des Testpanels nur HPV-DNA-negative H-9-Zellen in SurePath Preservative Fluid enthielt.

Vier verschiedene Personen führten das Testen an 6 verschiedenen Tagen unter Verwendung von 3 verschiedenen QIASymphony SP Geräten und QIASymphony DSP HPV Media Kits aus 3 verschiedenen Chargen mit den Proben 1, 2, 3, 4 und 5 des Testpanels aus. Die Proben 1, 2, 3 und 4 des Testpanels wurden in 18 Replikaten über 37 verschiedene Läufe getestet, wobei 666 Datenpunkte für die Proben 1 und 3 des Testpanels und 665 Datenpunkte für die Proben 2 und 4 des Testpanels erhalten wurden. Zwei Datenpunkte wurden verworfen, da nicht genügend Volumen vorhanden war, wie das QIASymphony SP bei der Probenvorbereitung angezeigt hat. Die Probe 5 des Testpanels wurde in 16 Replikaten über 37 verschiedene Läufe getestet, wobei 592 Datenpunkte erhalten wurden.

Bei Proben des Testpanels mit einem mittleren RLU/CO-Wert von mindestens 20 % über dem Grenzwert waren 1.923 von 1.923 (100,0 %) positiv. Bei Proben des Testpanels mit einem mittleren RLU/CO-Wert innerhalb von 20 % über oder unter dem Grenzwert waren 416 von 665 (62,6 %) positiv und 249 von 665 (37,4 %) waren negativ. Bei Proben des Testpanels mit einem mittleren RLU/CO-Wert von mindestens 20 % unter dem Grenzwert waren 666 von 666 (100 %) negativ (siehe nachfolgende Tabelle 53).

Tabelle 53. Reproduzierbarkeit von Postgradient-Zellpelletproben – Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit; qualitative Reproduzierbarkeit

Probe des Testpanels	Zelltyp	Mittlerer RLU/CO-Wert	Standardabweichung	VK (%)	Positives Testergebnis (%) (n/N)
1	H-9	0,12	0,02	18,77	0,0 (0/666)
2	SiHa und H-9	0,96	0,11	11,15	62,6 (416/665)
3	SiHa und H-9	4,72	0,56	11,89	100,0 (666/666)
4	SiHa und H-9	9,34	0,98	10,46	100,0 (665/665)
5	SiHa und H-9	24,9	3,37	13,55	100,0 (592/592)

Die Ergebnisse zeigen, dass für Postgradient-Zellpelletproben in SurePath, deren Testergebnis um mindestens 20 % vom Grenzwert entfernt liegt, konsistente Ergebnisse erwartet werden können. Postgradient-Zellpelletproben in SurePath nahe am Grenzwert ergaben annähernd gleiche Zahlen positiver und negativer Ergebnisse. Diese Daten zeigen, dass eine Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit gefolgt von Testen mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test reproduzierbare Ergebnisse ergibt.

Die Ergebnisse der internen Studie wurden auch verwendet, um die quantitative Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu evaluieren, die mit einer Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit erhalten wurden.

Vier verschiedene Personen führten das Testen an 6 verschiedenen Tagen unter Verwendung von 3 verschiedenen QIASymphony SP Geräten und QIASymphony DSP HPV Media Kits aus 3 verschiedenen Chargen mit den Proben 1, 2, 3, 4 und 5 des Testpanels aus. Die Proben 1, 2, 3 und 4 des Testpanels wurden in 18 Replikaten getestet, wobei 162 Datenpunkte für jede Probe des Testpanels erhalten wurden. Die Probe 5 des Testpanels wurde in 16 Replikaten getestet, wobei 144 Datenpunkte erhalten wurden (siehe nachfolgende Tabelle 54).

Tabelle 54. Reproduzierbarkeit von Postgradient-Zellpelletproben – Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit; quantitative Reproduzierbarkeit

Probe des Testpanels	n	Mittlerer RLU/CO-Wert	Standardabweichung			Abgeschätzte Gesamtstandardabweichung	Abgeschätzter Gesamt-VK (%)
			Innerhalb von Läufen	Zwischen Tagen	Zwischen Kombinationen*		
1	162	0,12	0,02	0,00	0,01	0,02	19,80
2	162	1,00	0,08	0,02	0,06	0,10	10,27
3	162	4,99	0,37	0,13	0,38	0,55	11,00
4	162	9,78	0,61	0,23	0,54	0,85	8,72
5	144	26,40	2,19	0,70	1,51	2,75	10,41

* Zwischen Kombinationen verschiedener Tage, Personen, Chargen des QIASymphony DSP HPV Media Kits und QIASymphony SP Geräte.

Die quantitative Reproduzierbarkeit ist sehr hoch, wie durch VK-Werte angezeigt wird, die unter 20 % bleiben. Die Standardabweichungen zwischen Läufen sind vergleichbar mit dem entsprechenden Wert innerhalb von Läufen, was ungeachtet des verwendeten Geräts oder der verwendeten Kit-Charge konsistente Ergebnisse anzeigt.

Kreuzreaktivität

Eine Reihe von Bakterien, Viren und Plasmiden, die häufig im weiblichen Anogenitaltrakt vorkommen, sowie eine Sammlung kutaneotroper HPV-Typen, für die Klone zur Verfügung standen, wurden getestet, um festzustellen, ob es mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test zu einer Kreuzreaktivität mit diesen kommen würde. Alle Mikroorganismen wurden in Konzentrationen von 1×10^5 und 1×10^7 Organismen pro ml getestet. Gereinigte Viren- bzw. Plasmid-DNA wurde jeweils in einer Konzentration von 4 ng/ml im Test eingesetzt.

Die folgenden Bakterien wurden getestet; bei allen wurde mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ein negatives Ergebnis erhalten:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 oder 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*

- Escherichia coli (HB101) *
- Escherichia coli*
- Fusobacterium nucleatum
- Gardnerella vaginalis
- Haemophilus ducreyi
- Klebsiella pneumoniae
- Lactobacillus acidophilus
- Mobiluncus curtisii
- Mobiluncus mulieris
- Mycoplasma hominis
- Mycoplasma hyorhinitis
- Neisseria gonorrhoeae (ATCC 19424)
- Neisseria lactamica (NRL 2118)
- Neisseria meningitidis (ATCC 13077)
- Neisseria sicca (ATCC 29256)
- Peptostreptococcus anaerobius
- Proteus vulgaris (ATCC 21117, 8427, 33420)
- Serratia marcescens
- Staphylococcus aureus (Cowan-Stamm)
- Staphylococcus epidermidis
- Streptococcus faecalis (ATCC 14508)
- Streptococcus pyogenes (ATCC 27762)
- Treponema pallidum
- Trichomonas vaginalis

Die folgenden Virus- oder Plasmid-DNA-Arten bzw. Humanseren wurden getestet; bei allen wurde mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ein negatives Ergebnis erhalten:

- Adenovirus 2
- Cytomegalovirus
- Epstein-Barr-Virus
- Hepatitis B (Oberflächenantigen-positives Serum)
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II

* Sowohl der zum Propagieren der Plasmide (HB101) verwendete *E.-coli*-Stamm als auch ein klinisches Isolat von *E. coli* wurden untersucht.

- Humanes Immundefizienz-Virus (HIV, RT-DNA)
- HPV-Typen 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 und 30
- Simian-Virus 40 (SV40)

Das einzige Plasmid, bei dem es zu einer Kreuzreaktivität im *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kam, war pBR322. Die Kreuzreaktivität zwischen pBR322 und der Sonden-Mischung ist nicht überraschend, da die vollständige Entfernung der Vektor-pBR322-DNA bei Isolierung des HPV-Inserts schwierig ist. Über die Anwesenheit von pBR322-homologen Sequenzen in humanen Genital-Abstrichproben liegen wissenschaftliche Untersuchungen vor. In Gegenwart hoher Mengen bakterieller Plasmide könnte es demnach zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Allerdings ergab sich für keine der 298 klinischen Proben, die mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test positiv getestet worden waren, ein positives Ergebnis bei Analyse auf pBR322, wenn mit einer pBR322-spezifischen Sonde getestet wurde. Folglich scheint die Wahrscheinlichkeit, bei Analyse von klinischen Proben mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test falsch-positive Ergebnisse aufgrund von homologen pBR322-Sequenzen zu erhalten, gering zu sein.

Kreuzhybridisierung

Mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test wurden 18 verschiedene HPV-Typen (Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Typen) jeweils bei einer Konzentration von 4 ng/ml HPV-DNA getestet. Alle Hochrisiko-HPV-Targets ergaben ein positives Ergebnis. Bei dieser Untersuchung ergab sich außerdem, dass es in geringem Ausmaß zu einer Kreuzhybridisierung zwischen den HPV-Typen 6 und 42 und der High-Risk-HPV-Sonde des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests kommt. Patientinnenproben mit hohem HPV-6- oder HPV-42-DNA-Gehalt (4 ng/ml oder höher) können demnach zu falsch-positiven Ergebnissen mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test führen. Die klinische Relevanz besteht darin, dass Patientinnen mit 4 ng/ml oder mehr HPV-6- oder HPV-42-DNA unnötigerweise zur Kolposkopie überwiesen werden könnten.

Für den *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ergab sich zudem eine Kreuzreaktion mit den HPV-Typen 40, 53 und 66. Diese Typen kommen selten vor, und es liegen nicht genügend Hinweise vor, um die genaue Korrelation zwischen einer Infektion mit diesen Typen und der Entstehung einer hochgradigen Erkrankung zu bestimmen (15). In der wissenschaftlichen Fachliteratur wurde zudem berichtet, dass komplexe Sonden – ähnlich den in diesem Test verwendeten – aufgrund von Kreuzhybridisierung mit den HPV-Typen 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 oder MM9 zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten (35). Obwohl mehrere dieser HPV-Typen selten sind bzw. neue HPV-Typen nur selten bei hochgradigen Erkrankungen nachweisbar sind, könnten Patientinnen, in deren Proben hohe Konzentrationen dieser HPV-DNA-Typen vorhanden sind, unnötigerweise zur Kolposkopie überwiesen werden.

Einfluss von Blut und anderen Substanzen beim Testen von STM-Abstrichproben

Der Einfluss von Blut und anderen potenziell störenden bestimmten oder unbestimmten Substanzen auf den HPV-Nachweis mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test wurde untersucht. Zu diesem Zweck wurden Vollblut, Duschbad, antimykotische Creme und gelartiges Kontrazeptivum (Agenzien, die häufig in zervikalen Abstrichproben gefunden werden können) jeweils zu negativen und positiven Proben in STM (gepoolte klinische sowie nicht klinische Abstrichproben) gegeben, und zwar in Konzentrationen, die typisch für zervikale Abstrichproben sind.

Bei keinem der vier untersuchten Agenzien kam es bei den getesteten Konzentrationen zu einem falsch-positiven Testergebnis. Es könnte allerdings bei klinischen Proben, deren HPV-DNA-Konzentrationen nahe am Assay-Cut-off (1 pg/ml) liegen, zu einem falsch-negativen Ergebnis kommen, wenn hohe Konzentrationen einer antimykotischen Creme oder eines empfängnisverhütenden Gels vorhanden sind. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine klinische Abstrichprobe fast vollständig aus einer dieser Substanzen besteht, weil die Zervix routinemäßig gereinigt wird, bevor Abstrichproben für einen Pap-Test und den Test auf HPV genommen werden.

Einfluss von Blut und anderen Substanzen beim Testen von PreservCyt Abstrichproben

Manuelle Probenvorbereitung

Der Einfluss von Blut und anderen potenziell störenden bestimmten oder unbestimmten Substanzen, die möglicherweise in PreservCyt Proben vorhanden sind, auf den HPV-Nachweis mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test wurde untersucht. Zu diesem Zweck wurden Vollblut, Duschbad, antimykotische Creme und gelartiges Kontrazeptivum (Agenzien, die häufig in zervikalen Abstrichproben gefunden werden können) jeweils zu negativen und positiven Proben in PreservCyt Lösung (gepoolte klinische Abstrichproben) gegeben, und zwar in Konzentrationen, die typisch für zervikale Abstrichproben sind. Bei keinem der vier untersuchten Agenzien kam es bei den getesteten Konzentrationen zu einem falsch-positiven oder falsch-negativen Testergebnis. Darüber hinaus kommt es durch Substanzen, die in einigen klinischen Proben inhärent vorhanden sind, nicht zu einer Inhibition des HPV-DNA-Nachweises mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Bei der Evaluierung der Effekte von Blut und anderen potenziell störenden Substanzen, die möglicherweise in PreservCyt Proben vorhanden sind, wurde der QIASymphony DSP HPV Media

Kit für die Probenvorbereitung verwendet und die automatisierte Testung mit dem RCS und dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test durchgeführt. Der Einfluss der folgenden potenziell störenden Substanzen/Agenzien wurde untersucht:

- antimykotische Creme
- entzündungshemmende Creme
- Blut
- gelartiges Kontrazeptivum
- Duschbad
- desodorierende Vaginalsuppositorien
- Gleitmittel
- Spermizid

Jede Substanz wurde zu gepoolten negativen oder positiven Zellsuspensionen hinzupipettiert. Bei keiner der untersuchten Substanzen kam es bei den getesteten Konzentrationen, die in zervikalen Abstrichproben vorkommen können, zu einem falsch-positiven oder falsch-negativen Testergebnis. Es könnte allerdings bei klinischen Proben, deren HPV-DNA-Konzentrationen nahe am Cut-off-Wert des Tests liegen, zu einem falsch-negativen Ergebnis kommen, wenn hohe Konzentrationen einer antimykotischen Creme, eines vaginalen Gleitgels oder Blut vorhanden sind. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine klinische Abstrichprobe fast vollständig aus einer dieser Substanzen besteht, weil die Zervix routinemäßig gereinigt wird, bevor Abstrichproben für einen Pap-Test und den Test auf HPV genommen werden.

Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Der Einfluss von Vollblut auf die Analyse von PreservCyt Proben mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test wurde nach Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits evaluiert. Dazu wurden sichtbar bluthaltige klinische Abstrichproben getestet, und zwar sowohl nach manueller als auch nach automatisierter Probenvorbereitung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits. Die bei 238 Abstrichproben erhaltenen Ergebnisse wurden verglichen und ergaben eine Gesamtübereinstimmung von 94,12 % sowie einen p-Wert von 0,2850 im McNemar-Test. Dies deutet darauf hin, dass kein statistisch signifikanter Unterschied in der klinischen Leistungsfähigkeit zwischen der manuellen Probenvorbereitung und der automatisierten Probenvorbereitungsmethode unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits besteht.

Der Einfluss der folgenden potenziell störenden Substanzen/Agenzien wurde untersucht:

- Duschbad
- antimykotische Creme
- gelartiges Kontrazeptivum
- mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC)
- Gleitmittel
- Intimspray
- Spermizid
- Magnet-Partikel
- TopElute Fluid

Jede Substanz wurde zu gepoolten negativen oder positiven Zellsuspensionen hinzupipettiert, und zwar in Konzentrationen, die in zervikalen Abstrichproben vorkommen oder während der Probenvorbereitung hinzupipettiert werden könnten. Bei keinem der untersuchten Substanzen kam es bei den getesteten Konzentrationen zu einem falsch-positiven Testergebnis. Mit Ausnahme des gelartigen Kontrazeptivums wurden auch keine falsch-negativen Ergebnisse erhalten. Überführen Sie eine Zervix-Abstrichprobe für die automatisierte Probenverarbeitung unter Verwendung des QIASymphony DSP AXpH DNA Kits nicht in PreservCyt Lösung, wenn mit der Anwesenheit eines gelartigen Kontrazeptivums zu rechnen ist.

Einfluss von Blut und anderen Substanzen beim Testen von SurePath Abstrichproben

Probenvorbereitung von Proben in SurePath mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit

Die Effekte von Blut und anderen potenziell störenden Substanzen in den Proben in SurePath wurden unter Verwendung des QIASymphony DSP HPV Media Kits für die Probenvorbereitung und für automatisches Testen durch ein RCS mit dem digene HC2 High-Risk HPV DNA Test evaluiert.

Der Einfluss der folgenden potenziell störenden Substanzen/Agenzien wurde untersucht:

- antimykotische Creme
- entzündungshemmende Creme
- Blut
- gelartiges Kontrazeptivum
- Duschbad
- desodorierende Vaginalsuppositorien
- Gleitmittel
- Spermizid

Jede Substanz wurde zu gepoolten negativen oder positiven Zellsuspensionen hinzupipettiert. Bei keiner der untersuchten Substanzen kam es bei den getesteten Konzentrationen, die in zervikalen Abstrichproben vorkommen können, zu einem falsch-positiven Testergebnis.

Mit Ausnahme der folgenden Substanzen wurden auch keine falsch-negativen Ergebnisse erhalten.

- Das gelartige Kontrazeptivum führte beim Test in sehr geringer Konzentration zu falsch-negativen Ergebnissen.
- Bei klinischen Proben, deren HPV-DNA-Konzentrationen nahe am Cut-off-Wert des Tests liegen, könnte es zu einem falsch-negativen Ergebnis kommen, wenn hohe Konzentrationen einer antimykotischen Creme vorhanden sind. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine klinische Abstrichprobe fast vollständig aus antimykotischer Creme besteht, weil die Zervix routinemäßig gereinigt wird, bevor Abstrichproben für einen Pap-Test und den Test auf HPV genommen werden.

Wenn antimykotische Creme oder empfängnisverhütendes Gel vorhanden ist, dürfen keine Zervixproben in SurePath zur automatischen Probenvorbereitung mit dem QIA Symphony DSP HPV Media Kit entnommen werden.

Probenvorbereitung von Postgradient-Zellpelletproben in SurePath mit dem QIA Symphony DSP HPV Media Kit

Die Effekte von Blut und anderen potenziell störenden Substanzen in den Postgradient-Zellpelletproben in SurePath wurden unter Verwendung des QIA Symphony DSP HPV Media Kits für die Probenvorbereitung und für automatisches Testen durch ein RCS mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test evaluiert.

Die Effekte der folgenden potenziell störenden Substanzen wurden getestet:

- Antimykotische Creme
- Entzündungshemmende Creme
- Blut
- Empfängnisverhütendes Gel
- Duschbad
- Feminine Deodoranzäpfchen
- Gleitgel
- Spermizid

Jede Substanz wurde zu negativen und positiven klinischen Pools hinzugefügt, die dann durch das BD PrepMate System verarbeitet wurden, um eine Postgradient-Zellpelletprobe in SurePath zu imitieren. Ein einzelnes falsch-positives Ergebnis wurde sowohl für Blut als auch für antimykotische

Creme beobachtet; die statistische Analyse zeigte jedoch keine signifikante Störung. Mit keiner der anderen Substanzen bei einer Konzentration, die in Zervixproben vorkommen kann, wurden falsch-positive Ergebnisse beobachtet.

Falsch-negative Ergebnisse wurden für antimykotische Creme, entzündungshemmende Creme und empfängnisverhütendes Gel beobachtet. Wenn antimykotische Creme, entzündungshemmende Creme oder empfängnisverhütendes Gel vorhanden ist, dürfen keine Zervixproben in SurePath zur automatischen Probenvorbereitung mit dem QIASymphony DSP HPV Media Kit entnommen werden.

Verschleppungskontamination

Das RCS wurde entwickelt, um eine Probenkontamination oder Verschleppung von restlicher alkalischer Phosphatase durch die Verwendung von Einmal-Pipettenspitzen für das Aufnehmen bzw. Ansaugen von Reagenz und Probe zu minimieren. Zur Bestätigung dieses konstruktiven Merkmals hat QIAGEN verschiedene Studien durchgeführt, um zu evaluieren, ob bei Verwendung des RCS die Möglichkeit für eine Verschleppung oder Kreuzkontamination von Proben im Vergleich zur manuellen Methode erhöht ist. Zu diesem Zweck wurden mehrere RCS-Geräte benutzt, um die Möglichkeit für eine Verschleppungskontamination von einem System auf ein anderes zu beurteilen

Bei einer der Studien wurden 2 ng und 20 ng eines HPV-DNA-Plasmids zu Negativkontrollen gegeben, um so hoch positive Proben in STM herzustellen. Die Konzentration 20 ng/ml ergab dabei RLU-Werte, die ca. 3- bis 5-mal so hoch sind wie solche, die für die höchsten positiven klinischen Proben bei der klinischen Routinetestung zu erwarten wäre. Derart hergestellte, „simulierte“ hoch positive Proben wurden in schachbrettartiger Anordnung – alternierend mit Wells, die nur Negativkontrolle enthielten – in die Mikrottestplatte pipettiert (Test-Wells). Durch diese Anordnung werden potenzielle additive Effekte von aufeinanderfolgenden hoch positiven Proben berücksichtigt. Die Mikrottestplatten wurden anschließend sowohl nach der manuellen Methode als auch nach dem RCS-automatisierten Testverfahren analysiert. Nach Durchführung des Tests wurden die Anzahlen der Test-Wells mit falsch-positivem Ergebnis verglichen. Bei RCS-automatisierter Testdurchführung wurden mit diesen simulierten STM-Proben nicht mehr falsch-positive Test-Wells erzeugt als bei dem manuellen Testverfahren, selbst wenn sich eine extrem hohe Sequenz von positiven Proben auf der Mikrottestplatte befand..

In einer zweiten Untersuchung zur Verschleppungskontamination wurden HPV-positive Patientinnenproben in PreservCyt Lösung so miteinander kombiniert, dass ein Testpanel an Proben mit unterschiedlichen Chemolumineszenzintensitäten entstanden, die einem repräsentativen Bereich von RLU/CO-Werten entsprachen, der bei klinischen Routinetestungen mit dem RCS zu

erwarten ist. Die Werte der positiven Proben lagen im Wertebereich 200–1800 RLU/CO. Um die Möglichkeit einer Verschleppung, einschließlich der potenziell additiven Effekte aufeinanderfolgender hoch positiver Proben, einzuschätzen, wurden diese positiven Proben des Testpanels in schachbrettartiger Anordnung in die Wells einer Mikrottestplatte, alternierend zu Wells mit Negativkontrolle, pipettiert. Diese Platten wurden nach dem RCS-automatisierten Testverfahren analysiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zur Verschleppungskontamination mit gepoolten Proben von Patientinnen lassen auf eine Rate potenziell falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von Verschleppungseffekten in Höhe von 0,3 % schließen, wenn der *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test nach dem RCS-automatisierten Verfahren durchgeführt wird.

Nach der Erfahrung QIAGENs legen die Tests mit gepoolten PreservCyt Lösung Proben nahe, dass durch das Poolen von Patientinnenproben in PreservCyt Proben erzeugt werden, die nicht den Eigenschaften einer bei einer Patientin entnommenen Einzelprobe entsprechen. Zwar sind die durch das Poolen bedingten Effekte auf die Wahrscheinlichkeit für eine Verschleppungskontamination bei der RCS-automatisierten Testdurchführung noch unbekannt; zusätzliche präklinische Tests mit dem RCS-automatisierten Verfahren haben jedoch keine Zunahme falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von Verschleppung ergeben. Diese Untersuchungen wurden unter Verwendung artifizierlicher Plasmid-Proben durchgeführt, deren DNA-Konzentrationen annähernd 5-mal so hoch waren, wie bei klinischen Proben zu erwarten ist.

Bei einer dritten Untersuchung zur Verschleppungskontamination wurden Test-Proben hergestellt, indem ein Fluoreszenzfarbstoff in Konzentrationen, die für den dynamischen RLU-Wertebereich des Assays repräsentativ sind, in eine Hintergrund-Matrix pipettiert wurde. Dabei entsprach die Viskosität dieser Matrix annähernd der von klinischen Proben und den Reagenzien des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests. Diese Test-Proben wurden anschließend mit drei verschiedenen RCS-Geräten verarbeitet und die Möglichkeit für eine Verschleppung bei jedem der folgenden Hauptschritte des Testverfahrens mit dem RCS evaluiert:

- Probentransfer
- Transfer von Platte zu Platte
- Zugabe der Sonde
- Schütteln der Mikrottestplatte
- Waschen der Mikrottestplatte

Die resultierende Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Die Messung war empfindlich genug, um ein Verschleppungsereignis in der Größenordnung von 1:20.000 erfassen zu können, was einem

falsch-positiven Ergebnis mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (d. h. 1 pg in 20 ng) entsprechen würde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergaben kein Verschleppungsereignis bei einem der Hauptschritte des RCS-Testverfahrens, die zu einem falsch-positiven Ergebnis des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests führen würde.

Reagenzienstabilität im RCS

QIAGEN hat die Leistungscharakteristik beim RCS-automatisierten Testverfahren untersucht, wenn Reagenzien verwendet werden, die über längere Zeiträume auf der Arbeitsplattform des Systems verbleiben. Die Reagenzien, die am wahrscheinlichsten für längere Zeit auf der Arbeitsplattform verbleiben, sind die Sonden-Mischung, die Reagenzien DR1 und DR2 sowie die Capture-Mikrotestplatte.

Die Leistungsfähigkeit des Tests wurde zum einen mit frisch angesetzten Reagenzien und zum anderen mit Reagenzien, die für 16 Stunden bei Raumtemperatur auf der Arbeitsplattform des RCS-Geräts stehen gelassen wurden (um zwei Arbeitsschichten in einer Routinelabor-Umgebung zu simulieren), evaluiert. Für die Testung simulierter klinischer Proben in einer definierten Reagenzien-Matrix wurden zwei RCS-Geräte an zwei verschiedenen Tagen verwendet (siehe folgende Tabelle 55).

Tabelle 55. Studiendesign zur Untersuchung der Reagenzienstabilität auf der RCS-Arbeitsplattform

RCS-Gerät	Tag 1	Tag 2
1	„Gealterte“ Reagenzien	Frische Reagenzien
2	Frische Reagenzien	„Gealterte“ Reagenzien

Ein Diagramm mit allen RLU/CO-Datenpunkten ist in Abbildung 3 (siehe unten) wiedergegeben. Sowohl das Diagramm als auch die Regressionsanalyse der Messwerte für gealterte versus frisch angesetzte Reagenzien zeigen die Übereinstimmung zwischen den gealterten und frischen Reagenzien an.

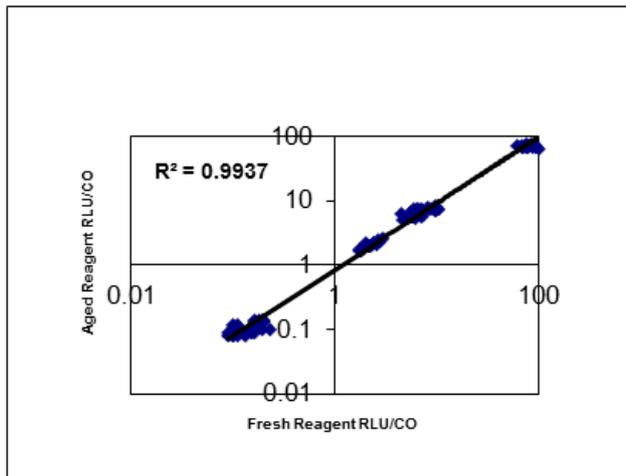


Abbildung 3. Scatter-Diagramm zum Vergleich von Assay-Kalibrator- und Kontrollwerten bei Verwendung gealterter und frisch angesetzter Reagenzien.

Eine weitergehende Untersuchung der Ergebnisübereinstimmung zeigt, dass es bei Verwendung gealterter Reagenzien nicht zu veränderten qualitativen Ergebnissen kommt (siehe folgende Tabelle 56).

Tabelle 56. Ergebnisübereinstimmung bei Verwendung frischer vs. gealterter Reagenzien

Statistisches Maß	Ergebnis
Gesamt-Übereinstimmung	100.0%
(n/N)	(96/96)
95%-KI	97.97–100.0
Positive Übereinstimmung (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
95%-KI	97.97–100.0
Negative Übereinstimmung (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
95%-KI	97.97–100.0
R ²	0.9937
Steigung	0.97
Achsenabschnitt	0.47
Kappa	1.0

Die Datenauswertung zeigt, dass die Ergebnisse bei frischen und gealterten Reagenzien statistisch identisch sind, was darauf hindeutet, dass die Reagenzien ausreichend stabil sind, wenn sie für bis zu 16 Stunden auf der Arbeitsplattform des RCS-Geräts verbleiben.

Literatur

1. Broker, T. R. and Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: Botchan, M., Grodzicker, T., and Sharp, P., eds. *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A.T. and Reid, R. (1989) Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1**, 123.
3. Jenson, A.B., Kurman, R.J., and Lancaster, W.D. (1984) Human papillomaviruses. In: Belshe, R.B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG Wright, p 951.
4. Becker, T.M., Stone, K.M., and Alexander, E.R. (1987) Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **14**, 389.
5. McCance, D.J., Walker, P.G., Dyson, J.L., Coleman, D.V., and Singer, A. (1983) Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br. Med. J.* **287**, 784.
6. Naghashfar, Z. et al. (1985) Identification of genital tract papillomaviruses HPV 6 and HPV 16 in warts of the oral cavity. *J. Med. Virol.* **17**, 313.
7. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 560.
8. Munoz, N., Bosch, F.X., Shah, K.V., and Meheus, A., eds. (1992) *IARC Scientific Publications no. 119: The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
9. Reid, R. et al. (1987) Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156**, 212.
10. Fuchs, P.G., Girardi, F., and Pfister, H. (1988) Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer* **41**, 41.

11. Lorincz, A.T., Temple, G.F., Kurman, R.J., Jenson, A.B., and Lancaster, W.D. (1987) Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 671.
12. Lorincz, A.T., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1986) Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **58**, 225.
13. Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain Hobson, S., and Orth, G. (1986) A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246.
14. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1987) A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* **159**, 187.
15. Meyer, T. et al., (1998) Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J. Infect. Dis.* **178**, 252.
16. Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328.
17. Longuet, M., Beaudenon, S., and Orth, G. (1996) Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 738.
18. Naghashfar, Z.S., Rosenshein, N.B., Lorincz, A.T., Buscema, J., and Shah, K.V. (1987) Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18 related virus of the genital tract. *J. Gen. Virol.* **68**, 3073.
19. Nuovo, G.J., Crum, C.P., de Villiers, E.M., Levine, R.U., and Silverstein, S.J. (1988) Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virol.* **62**, 1452.
20. Shimoda, K., Lorincz, A.T., Temple, G.F., and Lancaster, W.D. (1988) Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **69**, 2925.

21. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., McAllister, P., and Temple, G.F. (1989) Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J. Gen. Virol.* **70**, 3099.
22. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., Schmidt, B.J., and Temple, G.F. (1989) Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low grade cervical neoplasia. *J. Virol.* **63**, 2829.
23. Beaudenon, S. et al. (1987) Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* **161**, 374.
24. Schiffman, M. (1993) Latest HPV findings: some clinical implications. *Contemp. Ob. Gyn.* **38**, 27.
25. Volpers, C.; and Streeck, R.E. (1991) Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419.
26. Matsukura, T., and Sugase, M. (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* **177**, 833.
27. Rho, J., Roy-Burman, A., Kim, H., de Villiers, E.M., Matsukura, T., and Choe, J. (1994) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* **203**, 158.
28. Bosch, F.X. et al. (1995) International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796.
29. Kahn, T., Schwarz, E., and zur Hausen, H. (1986) Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **51**, 61.
30. Koutsky, L.A. et al. (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1272.
31. Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Stellato, G., Vaheeri, A., Soares, V.R.X., Paavonen, J. (1991) Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA p 77.

32. Centers for Disease Control (1987) Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 36(Suppl 2), 3S.
33. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R., and Melnick, J.L. (1981) Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 762.
34. Martin, L.S., McDougal, J.S., and Loskoski, S.L. (1985) Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. *J. Infect. Dis.* **152**, 400.
35. Vernon, S.D., Unger, E.R., and Williams, D. (2000) Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 651.
36. Coleman, D. et al. (1993) European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Europe against cancer programme. *Eur. J. Cancer* 29A(Suppl. 4), S1.
37. Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Jaffurs, W.J., Marlow, J., Quinn, A.P., and Temple, G.F. (1990) Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **162**, 645.
38. Morrison, E.A.B. et al. (1991) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case control study. *Int. J. Cancer* **49**, 6.
39. Wheeler, C.M., Stewart, A.M., Gravitt, P.E., and Cheng, S. (1995) Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Res.* **5**, 79.
40. Burk R.D. et al. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* **23**, 333.
41. Belinson, J. et al. (2009) Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: implications for vaginal self-collection. *Int. J. of Cancer* **127**, 1151.
42. Zhao, F. et al. (2012) Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J. Natl Cancer Inst.* **104**, 178.

-
43. Lazcano-Ponce, E. et al. (2011) Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomized controlled trial. *Lancet* **378**, 1868.
 44. Lazcano-Ponce, E. et al. (2014) Specimen self-collection and HPV DNA screening in a pilot study of 100,242 women. *Int. J. Cancer* **135**, 109.
 45. Szarewski, A. et al. (2007) Human papillomavirus testing by self-sampling: assessment of accuracy in an unsupervised clinical setting. *J. Med Screen* **14**, 34.
 46. NCCLS (1999) *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices: Approved Guideline*. NCCLS document E5-A.

Symbole

Die Symbole in der folgenden Tabelle werden in dieser Gebrauchsanweisung verwendet.

Symbol	Symbol definition
	Kit enthält Reagenzien für 96 Tests
	Inhalt ausreichend für 384 Tests
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	Katalognummer
	Hersteller
	Autorisierter Repräsentant in der Europäischen Gemeinschaft
	Zur Verwendung bis
	Beachten Sie die Anwendungshinweise
	Internationale Artikelnummer

Hilfe zur Fehlerbehebung

Kommentare und Vorschläge

Nicht ordnungsgemäßer oder kein Farbwechsel während der Denaturierung

- | | |
|---|--|
| a) DNR nicht ordnungsgemäß angesetzt | Vergewissern Sie sich, dass das DNR den Indikatorfarbstoff enthält und eine dunkelviolette Farbe hat. |
| b) DNR nicht hinzugegeben | Vergewissern Sie sich, dass das DNR zur Probe hinzugegeben wurde, indem Sie das Probenvolumen messen (zu erwarten: 1,5 ml). Falls sich bei der Volumenüberprüfung herausstellt, dass DNR nicht pipettiert wurde, geben Sie das korrekte DNR-Volumen hinzu, mischen Sie und fahren Sie mit dem Test fort, wenn ein ordnungsgemäßer Farbwechsel zu beobachten ist. |
| c) Probe enthält Blut oder andere Substanzen/ Agenzien, die den Farbwechsel maskieren | Der deutliche Farbwechsel, so wie beschrieben, ist bei derartigen Proben nicht zu erwarten; die Testergebnisse sollten dadurch allerdings nicht verfälscht werden. |
| d) Proben-pH eventuell ungewöhnlich niedrig (sauer) | Falls keine der anderen Ursachen zutrifft, könnte die Probe ungewöhnlich sauer sein, sodass es nicht zum erwarteten Farbwechsel kommt. Entnehmen Sie eine neue Abstrichprobe vor der Applikation von Essigsäure an der Zervix, denn ein nicht ordnungsgemäßer Proben-pH wirkt sich ungünstig auf die Testergebnisse aus. |

Qualitätskontrollen ergeben falsche Ergebnisse.

- | | |
|--|--|
| a) Falsches Assay-Protokoll für den Test gewählt | Wenn das Assay-Protokoll für den durchzuführenden Test inkorrekt ist, messen Sie die Mikrotiterplatte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe von Nachweisreagenz 2 mit dem korrekten Assay-Protokoll erneut. |
| b) Position von QC1-LR und QC2-HR vertauscht | Wiederholen Sie den Test der Proben. |
| c) Position von HRC und QC2-HR vertauscht | Wiederholen Sie den Test der Proben. |

Kommentare und Vorschläge

Falscher Farbwechsel während der Hybridisierung

- | | |
|--|---|
| a) Nicht ausreichende Durchmischung des Sonden-Mix mit den denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und/oder Proben; oder Sonden-Mix nicht zugegeben oder falsches Volumen Reagenz pipettiert | Schütteln Sie die Hybridisierungs-Mikrotestplatte oder das Rack mit den Mikroreaktionsgefäßen für weitere 2 Minuten. Falls Mikroreaktionsgefäße oder Wells immer noch violett bleiben, pipettieren Sie zusätzliche 25 µl der korrekten Sonden-Mischung hinzu und durchmischen Sie sie erneut gründlich. Sollte nach Zugabe der Sonden-Mischung und erneutem Mischen der ordnungsgemäße Farbwechsel ausbleiben und die Probe kein Blut oder andere Materialien enthalten haben, wiederholen Sie den Test mit der klinischen Probe. |
| b) Probe enthält Blut oder andere Substanzen, die den Farbwechsel maskieren | Der deutliche Farbwechsel, so wie beschrieben, ist bei derartigen Proben nicht zu erwarten; die Testergebnisse sollten dadurch allerdings nicht verfälscht werden. |
| c) Probe enthielt weniger als 1000 µl STM | Überprüfen Sie das Volumen der Ausgangsprobe. Das Volumen sollte $1425 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$ betragen (nach Entnahme eines 75-µl-Aliquots für den Test). Ist das Volumen $< 1425 \mu\text{l}$, enthielt die Ausgangsprobe weniger als 1000 µl STM. Entnehmen Sie eine neue Abstrichprobe. |

Assay-Validierung fehlgeschlagen. Kein Messsignal bei positiven Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder Proben.

- | | |
|---|--|
| a) Keine Sonde zu Sonden-Verdünnungsmittel hinzugegeben | Setzen Sie die Sonden-Mischung an, wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben. Beschriften Sie die Röhrchen sorgfältig. |
| b) Sonde beim Ansetzen mit RNase kontaminiert | Verwenden Sie für das Pipettieren der Sonde Pipettenspitzen mit Filter als Aerosolbarriere und ziehen Sie Laborhandschuhe an. Setzen Sie die Sonden-Mischung in einem sterilen Gefäß an. Verwenden Sie ausschließlich saubere, neue Einweg-Reagenziengefäße. |
| c) Unzureichende Durchmischung der Sonden-Mischung | Mischen Sie nach Zugabe der Sonde zum Sonden-Verdünnungsmittel gründlich für mindestens 5 Sekunden bei hoher Drehzahl auf einem Laborschüttler (Vortex). Dabei muss sich ein sichtbarer Flüssigkeitsstrudel bilden. |

Kommentare und Vorschläge

- | | | |
|----|---|---|
| d) | Unzureichende Durchmischung von Sonden-Mischung und denaturierter Probe | Nach Zugabe der Sonden-Mischung und der Probe in jedes Well der Hybridisierungs-Mikrotestplatte oder in jedes Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäß: Schütteln Sie bei einer Drehzahl von 1100 ± 100 U/min auf dem Rotationsschüttler I (Rotary Shaker I) für 3 ± 2 Minuten. Überprüfen Sie auf stattgefundenen Farbwechsel von Violett zu Gelb in jedem Well der Mikrotestplatte bzw. jedem Mikroreaktionsgefäß. |
| e) | Falsche Zeit oder Temperatur bei Hybridisierungsschritt | Hybridisieren Sie für 60 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C. Überprüfen Sie die Temperatur des Mikrotestplatten-Inkubators I (Microplate Heater I) bzw. des Wasserbads. Stellen Sie sicher, dass der Mikrotestplatten-Inkubator I bzw. das Wasserbad so eingestellt ist, dass die Proben auf die korrekte Temperatur erwärmt werden, und Inkubator bzw. Wasserbad vor Gebrauch 60 Minuten vortemperiert wird. Vergewissern Sie sich, dass der Wasserstand ausreichend hoch ist, um die Proben auf die korrekte Temperatur zu erwärmen. Wasserbäder sollten regelmäßig kalibriert werden. |
| f) | Unzureichende Durchmischung während des Bindungsschritts | Schütteln Sie für 60 ± 5 Minuten bei 20–25 °C auf einem Rotationsschüttler I (Rotary Shaker I), wie in der vorliegenden Gebrauchsanweisung beschrieben. Verifizieren Sie die Drehzahl des Rotationsschüttlers I durch Kalibrierung (siehe dazu das Handbuch Rotary Shaker I User Manual). |
| g) | Nicht die korrekte Menge an DR1 pipettiert oder nicht für die angegebene Zeit inkubiert | Pipettieren Sie mit einer 8-Kanal-Pipette 75 µl des Reagenzes DR1 in jedes Well der Mikrotestplatte. Inkubieren Sie für 30–45 Minuten bei 20–25 °C. |
| h) | Nicht die korrekte Menge an DR2 pipettiert oder nicht für die angegebene Zeit inkubiert | Pipettieren Sie mit einer 8-Kanal-Pipette 75 µl des Reagenzes DR2 in jedes Well der Mikrotestplatte. Inkubieren Sie für 15–30 Minuten bei 20–25 °C. |
| i) | DML-Gerätstörung oder fehlerhafte | Weitere Anweisungen entnehmen Sie bitte dem zugehörigen Benutzer-Handbuch zu dem DML-Luminometer und dem Software-Handbuch, oder |

Kommentare und Vorschläge

Programmierung

kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN.

Erhöhte RLU-Werte bei Kalibratoren, Qualitätskontrollen und/oder Proben (≥ 200 RLU in vielen oder allen Wells der Mikrotestplatte). Die Assay-Validierung des Tests könnte fehlschlagen.

- | | |
|---|--|
| a) Kein DNR oder falsches Volumen Reagenz zugegeben; oder unzureichende Durchmischung des DNR mit Proben, Kalibratoren oder Qualitätskontrollen | Vergewissern Sie sich vor der DNR-Zugabe, dass die Repettier-Pipette exakt das eingestellte Volumen abgibt. Kalibrierte Pipetten zu benutzen, ist von entscheidender Bedeutung. Geben Sie ein halbes Volumen DNR in jedes Mikroreaktionsgefäß bzw. Well der Mikrotestplatte und mischen Sie gründlich. Stellen Sie beim Pipettieren sicher, dass mit der Flüssigkeit die gesamte innere Oberfläche des Röhrchens benetzt wird, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Nach Zugabe des DNR sollte das Gemisch aus Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben eine violette Farbe annehmen. |
| b) Lichteinfall in das DML-Luminometer; Tür nicht verschlossen oder Dichtung um Gerätetür beschädigt | Überprüfen Sie das Hintergrundsignal (Rohdaten-Messung) des DML-Luminometers, indem Sie eine leere Mikrotestplatte messen. Ein Messwert von über 50 RLU deutet darauf hin, dass ein Lichteinfall („Lichtleck“) vorliegen könnte. Weitere Anweisungen entnehmen Sie bitte dem zugehörigen Benutzer-Handbuch zu dem DML-Luminometer, oder kontaktieren Sie den Technischen Service von QIAGEN. |
| c) Kontamination des Reagenzes DR2 oder der Wells der Capture-Mikrotestplatte mit DR1 oder exogener alkalischer Phosphatase | Siehe den Abschnitt „Kontrolle des Reagenzes DR2 auf Kontamination“ auf Seite 142. |
| d) Waschpuffer kontaminiert | Siehe den Abschnitt „Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination“ auf Seite 142. |
| e) Automatisiertes Platten-Waschgerät kontaminiert | Siehe den Abschnitt „Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination“ auf Seite 142. |
| f) Unzureichendes Waschen | Waschen Sie die Wells der Capture-Mikrotestplatte gründlich 6-mal mit Waschpuffer, entweder durch Befüllen |

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|---|--|
| der Wells der Capture-Mikrotestplatte nach der Inkubation mit DR1 | bis zum Überlaufen oder indem Sie das automatisierte Platten-Waschgerät benutzen. Nach dem Waschen darf kein Rest an rosa Farbe in den Wells der Mikrotestplatte zu sehen sein. Hinweise, wie Sie das Gerät auf Vorliegen einer Kontamination oder Störung überprüfen können, finden Sie im Handbuch Automated Plate Washer User Manual. |
| g) Kontamination der Mikrotestplatten-Wells mit DR1 | Stellen Sie sicher, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Handhaben Sie das DR1-Reagenz mit der gebotenen Vorsicht. Vermeiden Sie Aerosolbildung. |
| h) Trockentupfen der Hybridisierungslösung auf demselben Bereich der Kimtowels Wischtücher oder ähnlicher fusselfarmer Papierhandtücher | Tupfen Sie nicht erneut auf denselben zuvor benutzten Kimtowels Wischtüchern oder ähnlichen fusselfarmen Papierhandtüchern trocken. |
| i) Keine geeigneten Tücher zum Trockentupfen verwendet | Verwenden Sie nur fusselfreie Papierhandtücher (Kimtowels Wischtücher o. Ä.) für das Trockentupfen der Platten. |

Niedriges Verhältnis Positiv-/Negativkontrolle oder hohe Anzahl (> 20 %) schwach positiver Proben mit Verhältnissen von < 2,0. Die Assay-Validierung des Tests könnte fehlschlagen.

- | | |
|---|--|
| a) Fehlerhafte Proben-vorbereitung | <p>Pipettieren Sie das korrekte Volumen DNR und mischen Sie gründlich auf einem Laborschüttler (Vortex). Stellen Sie beim Pipettieren sicher, dass mit der Flüssigkeit die gesamte innere Oberfläche des Röhrchens benetzt wird, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.</p> <p>Stellen Sie im Falle von Abstrichproben in PreservCyt Lösung sicher, dass eine ordnungsgemäße Durchmischung und Resuspendierung des Zellpellets vor der Denaturierungsinubation durchgeführt wird.</p> <p>Es sollte ein deutlicher Farbwechsel zu Dunkelviolett zu beobachten sein. Inkubieren Sie für 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C.</p> |
| b) Sonden-Mischung unzureichend durchmischt | Setzen Sie die Sonden-Mischung wie beschrieben an. Mischen Sie gründlich auf einem Laborschüttler (Vortex); |

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|---|
| oder nicht genug Sonden-Mischung zugegeben | vergewissern Sie sich dabei, dass ein sichtbarer Strudel entsteht. Um eine genaue Flüssigkeitsabgabe sicherzustellen, muss die Sonden-Mischung mit einer Direktverdrängungs- oder einer Mehrkanal-Pipette in die Röhren gegeben werden. |
| c) Falsches Volumen Sonden-Mischung in jedes Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäß bzw. Mikrotestplatten-Well pipettiert | Vergewissern Sie sich vor der Zugabe des Sonden-Mix, dass die 8-Kanal-Pipette exakt das eingestellte Volumen abgibt. Pipettieren Sie 25 µl der Sonden-Mischung in jedes Mikroreaktionsgefäß oder Well der Mikrotestplatte, in dem sich bereits die denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrolle und die Probenflüssigkeiten befinden. Nach dieser Zugabe und gründlichem Durchmischen sollte ein Farbwechsel von Dunkelviolet nach Gelb stattfinden. PreservCyt Proben dagegen sollten statt der gelben eine rosa Farbe annehmen. |
| d) Verlust an DR1-Aktivität | Lagern Sie DR1 bei 2–8 °C. Verwenden Sie das Reagenz vor Ablauf des Haltbarkeitsdatums. |
| e) Unzureichende Bindung | Der Bindungsschritt sollte auf einem Rotationsschüttler I (Rotary Shaker I) bei 1100 ± 100 U/min durchgeführt werden. Validieren Sie die Drehzahl des Schüttlers durch Kalibrierung. |
| f) Unzureichendes Waschen | Waschen Sie die Mikrotestplatten-Wells gründlich 6-mal mit Waschpuffer, indem Sie die Wells bis zum Überlaufen befüllen, oder verwenden Sie das automatisierte Platten-Waschgerät (Automated Plate Washer). |
| g) Waschpuffer kontaminiert | Siehe den Abschnitt „Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination“ auf Seite 142. |

Reihen positiver Proben, deren RLU-Werte annähernd gleich sind.

- | | |
|--|---|
| a) Kontamination der Wells der Capture-Mikrotestplatte während des Tests | Decken Sie die Capture-Mikrotestplatte bei allen Inkubationen ab. Vermeiden Sie es, die Röhren während der Durchführung des Assays einer Kontamination durch Aerosole auszusetzen. Tragen Sie beim Umgang mit den Reagenzien pulverfreie Einmal-Handschuhe. |
| b) Kontamination des DR2- | Stellen Sie sicher, dass Sie die Stammlösung nicht |

Kommentare und Vorschläge

Reagenzes	versehentlich kontaminieren, wenn Sie DR2 in die Wells der Capture-Mikrotestplatte pipettieren. Verhindern Sie eine Kontamination des DR2-Reagenzes durch Aerosole aus dem DR1-Reagenz oder durch Laborstaub etc.
c) Störung/Defekt des Platten-Waschgeräts (Automated Plate Washer)	Hinweise, wie Sie das Gerät auf Vorliegen einer Kontamination oder Störung überprüfen können, finden Sie im Abschnitt „Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination“ auf Seite 142 bzw. im zugehörigen Geräte-Handbuch Automated Plate Washer User Manual.

Zu große Streuung zwischen Wiederholproben (zu hohe Variationskoeffizienten).

a) Ungenau pipettieren	Überprüfen Sie die Pipette, um sicherzustellen, dass reproduzierbare Volumina abgegeben werden. Kalibrieren Sie die Pipetten regelmäßig.
b) Unzureichende Durchmischung	Durchmischen Sie die Ansätze bei allen Schritten gründlich. Mischen Sie vor und nach der Denaturierungsinubation und nach Zugabe der Sonden-Mischung auf einem Laborschüttler (Vortex). Vergewissern Sie sich, dass ein sichtbarer Strudel entsteht.
c) Unvollständiger Flüssigkeitstransfer aus den Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäßen bzw. Wells der Hybridisierungs-Mikrotestplatte in die Wells der Capture-Mikrotestplatte	Überzeugen Sie sich während des Transferschritts von der Hybridisierungs-Mikrotestplatte oder von den Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäßen in die Wells der Capture-Mikrotestplatte, dass die Volumina vollständig und reproduzierbar überführt werden.
d) Fehlerhafte Bedingungen bei den Waschschritten	Waschen Sie die Mikrotestplatten-Wells gründlich 6-mal mit Waschpuffer, indem Sie die Wells bis zum Überlaufen befüllen, oder benutzen Sie das automatisierte Platten-Waschgerät (Automated Plate Washer).
e) Kontamination der Mikrotestplatten-Wells mit DR1	Stellen Sie sicher, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Handhaben Sie das DR1-Reagenz mit der gebotenen Vorsicht. Vermeiden Sie Aerosolbildung.

Falsch-positive Ergebnisse bei bekannt negativen Abstrichproben

Kommentare und Vorschläge

- a) DR2 kontaminiert
Stellen Sie sicher, dass es nicht zur Kreuzkontamination zwischen Proben kommt, wenn Sie die DR2-Aliquots in die Proben pipettieren. Wenn Sie nur einen Teil eines Kits brauchen, aliquotieren Sie das für den anstehenden Test erforderliche Volumen in einen sauberen Einmal-Reagenzienbehälter, bevor Sie die Pipette befüllen.
- b) Kontamination der Mikrotestplatten-Wells mit DR1
Waschen Sie die Mikrotestplatten-Wells gründlich 6-mal mit Waschpuffer, indem Sie die Wells bis zum Überlaufen befüllen, oder benutzen Sie das automatisierte Platten-Waschgerät (Automated Plate Washer). Nach dem Waschen darf kein Rest an rosa Farbe in den Wells der Mikrotestplatte zu sehen sein.
- c) Trockentupfen mehrerer Reihen der Mikrotestplatte auf demselben Bereich der Kimtowels Wischtücher oder ähnlicher fusselfreier Papierhandtücher
Tupfen Sie nicht auf einem Bereich der Tücher trocken, der zuvor bereits benutzt worden ist.
- d) Fehlerhafte Probenvorbereitung
tieren Sie das korrekte Volumen DNR und mischen Sie gründlich auf einem Laborschüttler (Vortex). Stellen Sie beim Pipettieren sicher, dass mit der Flüssigkeit die gesamte innere Oberfläche des Röhrchens benetzt wird, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Zur manuellen Vorbereitung von Proben in PreservCyt stellen Sie sicher, dass vor der Denaturierungsinubation vorschriftsmäßig gemischt wird und die erneute Suspension des Zellpellets abgeschlossen ist. Siehe auch die Gebrauchsanweisung des *digene* HC2 Sample Conversion Kits.

Es sollte ein distinkter Farbumschlag von farblos nach dunkelpurpurrot auftreten. Inkubieren Sie für 45 ± 5 Minuten bei $65 \pm 2^\circ \text{C}$. Zur manuellen Vorbereitung von Proben in SurePath müssen die Proben für 90 ± 5 Minuten bei $65 \pm 2^\circ \text{C}$ inkubiert werden.
- e) Fehlerhafte Bedingungen
Waschen Sie die Mikrotestplatten-Wells gründlich 6-mal

Kommentare und Vorschläge

bei den Waschschr	mit Waschpuffer, indem Sie die Wells bis zum Überlaufen befüllen, oder verwenden Sie das automatisierte Platten-Waschgerät (Automated Plate Washer).
f) Kontamination der Pipettenspitze mit nicht denaturiertem Material während des Transfers von denaturierter Probe in das Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäß oder Well der Hybridisierungs-Mikrotestplatte	Der Denaturierungsschritt des Protokolls der Probenverarbeitung muss genau wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben durchgeführt werden. Eine nicht ordnungsgemäße Durchmischung der Proben – durch unzureichendes Schütteln von Hand oder auf einem Vortex bzw. durch nicht ausreichendes Umdrehen der Röhrchen – kann eine unvollständige Denaturierung von nicht spezifischen endogenen DNA:RNA-Hybriden aus der Gebärmutterhals-Abstrichprobe zur Folge haben. Insbesondere bei PreservCyt Abstrichproben ist es wahrscheinlich, dass derartige Hybridmoleküle an den Innenwänden des Proben-Denaturierungsröhrchens anhaften. Um eine Verschleppung von derartigem nicht denaturiertem Material zellulären Ursprungs zu vermeiden, darf beim Probentransfer in das Hybridisierungs-Mikroreaktionsgefäß oder das Well der Hybridisierungs-Mikrotestplatte die Pipettenspitze die Wandungen des Proben-Denaturierungsröhrchens nicht berühren.

Erhöhte RLU-Werte (> 200 RLU) bei Negativkontrolle (NC). Bei den übrigen Proben funktioniert der Test wie erwartet.

a) DR2 bei höherer Temperatur als 20–25 °C inkubiert	Wiederholen Sie den Test und stellen Sie sicher, dass die Reaktionsansätze bei Bindungs- und Nachweisschritt bei 20–25 °C inkubiert werden.
b) DR2 länger als 30 Minuten inkubiert	Messen Sie die Fluoreszenz in der Mikrotestplatte nach 15 Minuten Inkubation bei 20–25 °C (die Inkubation darf auf keinen Fall länger als 30 Minuten dauern).
c) DR2 oder Waschpuffer mit alkalischer Phosphatase oder DR1 kontaminiert	Siehe den Abschnitt „Kontrolle des Reagenzes DR2 auf Kontamination“ auf Seite 142 bzw. „Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination“ auf Seite 142.

Assay-Validierung fehlgeschlagen. Erhöhtes Verhältnis $\overline{PCX}/\overline{NCX}$.

Position von HRC und QC2-	Wiederholen Sie den Test der Proben. Kontrollieren Sie sorgfältig die Beschriftung bzw. die Etiketten auf den
---------------------------	---

Kommentare und Vorschläge

HR vertauscht

Kalibrator- und Qualitätskontroll-Fläschchen, um eine versehentliche Vertauschung der Positionen dieser Reagenzien zu vermeiden.

Kontrolle des Reagenzes DR2 auf Kontamination

1. Pipettieren Sie 75 µl DR2 aus dem Original-Fläschchen oder dem Gefäß mit aliquotiertem oder restlichem DR2 in ein leeres Well der Capture-Mikrotestplatte.

Hinweis: Testen Sie das DR2-Reagenz als Dreifachbestimmung, um dessen Intaktheit/Funktionalität optimal beurteilen zu können.

2. Inkubieren Sie für 15 Minuten bei 20–25 °C. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung.
3. Messen Sie die Mikrotestplatte in einem DML-Luminometer.

Der Wert der DR2-Kontrolle sollte < 50 RLU sein.

Falls die DR2-Werte < 50 RLU sind, kann das DR2-Reagenz verwendet werden, um den Test zu wiederholen.

Sollte das DR2 kontaminiert sein (> 50 RLU), dann verwenden Sie einen neuen Kit, um den Test zu wiederholen.

Kontrolle des Platten-Waschgeräts und/oder der Wasserquelle auf Kontamination

1. Beschriften Sie die Wells 1 bis 4. Pipettieren Sie 75 µl DR2 in die vier Wells der Capture-Mikrotestplatte.

Well 1 dient als DR2-Kontrolle.

2. Pipettieren Sie 10 µl Waschpuffer aus der Waschlösungsflasche in Well 2 der Mikrotestplatte.
3. Lassen Sie den Waschpuffer durch die Schläuche des Waschgeräts laufen. Pipettieren Sie 10 µl des Waschpuffers aus dem Schlauch in das Well 3 der Mikrotestplatte.
4. Nehmen Sie ein Aliquot des Wassers, das zum Ansetzen des Waschpuffers verwendet wurde. Pipettieren Sie 10 µl dieses Wassers in Well 4 der Mikrotestplatte.
5. Inkubieren Sie für 15 Minuten bei 20–25 °C. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung.
6. Messen Sie die Mikrotestplatte in einem DML-Luminometer.

Der Wert der DR2-Kontrolle (in Well 1) sollte < 50 RLU sein.

Vergleichen Sie die RLU-Werte der Wells 2, 3 und 4 mit dem RLU-Wert der DR2-Kontrolle. Die

einzelnen RLU-Werte für die Wells 2, 3 und 4 sollten den (maximalen) Wert 50 RLU für die DR2-Kontrolle nicht überschreiten.

Werte oberhalb von 50 RLU für die DR2-Kontrolle deuten auf eine Kontamination hin. Hinweise zur Reinigung und Wartung des Platten-Waschgeräts finden Sie im Abschnitt „Manuelle Waschmethode“ auf Seite 59.

Kontrolle des Automated Plate Washer auf Kontamination

1. Beschriften Sie die Wells 1 bis 5. Pipettieren Sie 75 µl DR2 in die fünf Wells der Capture-Mikrotestplatte
Well 1 dient als DR2-Kontrolle.
2. Pipettieren Sie 10 µl Waschpuffer aus der Waschlösungsflasche des Automated Plate Washer in Well 2 der Mikrotestplatte.
3. Pipettieren Sie 10 µl Spüllösung aus der Spüllösungsflasche des Automated Plate Washer in Well 3 der Mikrotestplatte.
4. Drücken Sie die Taste **Prime** (Vorfüllen) auf dem Tastenfeld des Plattenspülers, damit Waschpuffer durch die Leitungen fließen kann. Pipettieren Sie 10 µl Waschpuffer aus dem Behälter in Vertiefung 4 der Mikrotiterplatte.
5. Drücken Sie die Taste **Rinse** (Spülen) auf dem Tastenfeld des Plattenspülers, damit die Spülflüssigkeit durch die Leitungen fließen kann. Pipettieren Sie 10 µl Waschpuffer aus dem Behälter in Vertiefung 5 der Mikrotiterplatte.
6. Decken Sie die Wells ab und inkubieren Sie für 15 Minuten bei 20–25 °C. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung.
7. Messen Sie die Mikrotestplatte in einem DML-Luminometer.
Der Wert der DR2-Kontrolle (in Well 1) sollte < 50 RLU sein.

Vergleichen Sie die RLU-Werte der Wells 2, 3, 4 und 5 mit dem RLU-Wert der DR2-Kontrolle. Die einzelnen RLU-Werte für die Wells 2, 3, 4 und 5 sollten den (maximalen) Wert 50 RLU für die DR2-Kontrolle nicht überschreiten.

Werte oberhalb von 50 RLU für die DR2-Kontrolle deuten auf eine Kontamination des Automated Plate Washer hin.

Führen Sie die Dekontaminationsprozedur durch, die im Handbuch Automated Plate Washer User Manual beschrieben ist.

Kontaktinformationen

Benutzen Sie das Blatt mit den QIAGEN Kontaktinformationen, das mit dem Test-Kit geliefert wird, um den für Sie zuständigen QIAGEN Außendienstler zu kontaktieren.

Frei bleibende Seite

Frei bleibende Seite

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, *digene*®, Hybrid Capture®, QIAAsymphony®, 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); PrepMate®, PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in diesem Dokument verwendeten Markennamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind.

Dieses Produkt und das mit ihm verbundene Testverfahren sind durch eines oder mehrere der folgenden Patente geschützt:

Die Hybrid-Capture-Technologie ist durch das europäische Patent mit der Nr. 0 667 918 in folgenden Ländern geschützt: Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Irland, Italien, Liechtenstein, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Schweden, Schweiz, Spanien und Vereinigtes Königreich.

Patent für die Hybrid-Capture-Technologie in den USA:

6.228.578B1

HPV-bezogene Patente in den USA:

5.876.922 • 5.952.487 • 5.958.674 • 5.981.173

© 2012-2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com