

digene[®] HC2 HPV DNA Test

Gebrauchsanweisung

IVD



In-vitro-Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay mit Signalverstärkung mittels Mikrotiterplatten-Chemilumineszenz zum qualitativen Nachweis von 18 Low-Risk- und High-Risk-Typen der humanen Papillomavirus-DNA (HPV-DNA) in Zervixproben

Zum Gebrauch mit:

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



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN-Straße 1
40724 Hilden
DEUTSCHLAND
L2126de Rev. 4



Sample & Assay Technologies

INHALTSVERZEICHNIS

NAME UND VERWENDUNGSZWECK	1
ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG	2
VERFAHRENSPRINZIP	3
MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	4
NICHT MITGELIEFERTE ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN	5
WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN	7
SICHERHEITSMASßNAHMEN	7
SICHERHEITS- UND RISIKOHINWEISE FÜR REAGENZIEN	7
VORSICHTSMASßNAHMEN	9
VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	10
PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG	14
ZERVIXPROBEN IN STM	14
ZERVIXBIOPSIEN	14
ZERVIXPROBEN IN PRESERVCYT SOLUTION	14
ZERVIXPROBEN IN SUREPATH PRESERVATIVE FLUID	15
TESTVERFAHREN	16
TESTS MIT GROßEM PROBENDURCHSATZ MIT DEM RAPID CAPTURE SYSTEM	16
MANUELLES VERFAHREN	16
DENATURIERUNG	18
MISCHEN UND DENATURIEREN	21
HYBRIDISIERUNG: KOMBINATIONSSONDEN-COCKTAIL-(CPC)- UND DUAL-SONDENVERFAHREN	24
HYBRID CAPTURE	26
HYBRIDNACHWEIS	27
SPÜLEN	28
SIGNALVERSTÄRKUNG	29
VERIFIKATIONSKRITERIEN FÜR DIE ASSAY-KALIBRIERUNG	30
GRENZWERTBERECHNUNG	33
QUALITÄTSKONTROLLE	34
INTERPRETATION DER PROBENERGEBNISSE	35
LEISTUNGSMERKMALE	36
DATEN ZUR UNTERSTÜTZUNG DER LOW-RISK- UND HIGH-RISK-HPV-INDIKATION	36
DATEN ZUR UNTERSTÜTZUNG DER PRIMÄREN SCREENING-INDIKATION AUF HIGH-RISK-HPV	40
ANALYTISCHE SENSITIVITÄT	43
LEISTUNG DES KOMBINATIONSSONDEN-COCKTAILS (CPC)	44
ÄQUIVALENZ ZWISCHEN PROBEN IN STM UND PRESERVCYT SOLUTION	44
KORRELATION ZWISCHEN ERGEBNISSEN VON PROBEN IN SUREPATH UND PROBEN IN STM IN EINER KLINISCHEN POPULATION	44
REPRODUZIERBARKEIT	45
HIGH-RISK-HPV-SONDE	45
KREUZREAKTIVITÄT	47
KREUZREAKTIVITÄTS-PANEL	47
KREUZHYBRIDISIERUNG	48
EINFLUSS VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN STM	48
EINFLUSS VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN PRESERVCYT SOLUTION	48
REPRODUZIERBARKEIT DES <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA TESTS MIT IN STM ENTNOMMENEN KLINISCHEN PROBEN	48
RLU/CO	49
REPRODUZIERBARKEIT DES <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA TESTS MIT IN PRESERVCYT SOLUTION ENTNOMMENEN KLINISCHEN PROBEN	49
RLU/CO	50
REPRODUZIERBARKEIT DES <i>DIGENE</i> HC2 HIGH RISK HPV DNA TEST MIT IN SUREPATH- KONSERVIERUNGSFLÜSSIGKEIT ENTNOMMENEN PROBEN	51
REPRODUZIERBARKEIT DER ERGEBNISSE VON PROBEN IN SUREPATH UNTER VERWENDUNG DES RAPID CAPTURE SYSTEMS ZUR ASSAY-VERARBEITUNG	51

GRENZEN DES VERFAHRENS.....	53
LITERATUR.....	54
HILFE ZUR FEHLERSUCHE.....	57
KONTAMINATIONSTEST.....	63
QIAGEN KONTAKTDATEN	65

NAME UND VERWENDUNGSZWECK

In-vitro-Diagnostikum.

Der *digene* HC2 HPV DNA Test unter Verwendung der Hybrid Capture[®] 2 (HC2) Technologie ist ein Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay mit Signalverstärkung mittels Mikrotiterplatten-Chemilumineszenz zum qualitativen Nachweis der HPV-DNA von 18 Low-Risk- und High-Risk-Typen in Zervixproben.

Folgende Zervixproben können mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test getestet werden:

- Mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommene Proben
- Mit einem besenartigen Entnahmegerät oder mit einer Bürsten-/Spatelkombination entnommene und in PreservCyt Solution gegebene Proben (umfassende Einzelheiten sind der Gebrauchsanweisung des *digene* HC2 Sample Conversion Kits zu entnehmen)
- Proben in SurePath Preservative Fluid (NUR für High-Risk-HPV-DNA-Tests)
- In *digene* Specimen Transport Medium (STM) gegebene Biopsien

Dieser Test ist bei Anwendung der Low-Risk- und High-Risk-HPV-Sonden angezeigt:

- Zur Unterstützung bei der Diagnose sexuell übertragener HPV-Infektionen mit den HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68.
- Zur Differenzierung zwischen zwei HPV-DNA-Gruppen: Low-Risk-HPV-Typen 6, 11, 42, 43 und 44 sowie High-Risk-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68. Der vorliegende spezifische HPV-Typ kann jedoch nicht bestimmt werden.

Der Test ist bei Anwendung der High-Risk-HPV-Sonde angezeigt:

- Zum Nachweis der High-Risk-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68, von denen gezeigt wurde, dass sie den primären kausalen Faktor bei der Entwicklung des Zervixkarzinoms darstellen.
- Als erste Vorsorgeuntersuchung der Allgemeinbevölkerung, zur Verwendung mit oder ohne Pap-Abstrich, um Frauen mit erhöhtem Risiko der Entwicklung eines Zervixkarzinoms oder dem Vorliegen einer hochgradigen Zervixerkrankung zu identifizieren. Die HPV-Diagnose ist mit zunehmendem Alter für eine Zervixerkrankung zunehmend indikativ.
- Als Nachkontrolle für Patientinnen nach abnormen Pap-Abstrichergebnissen oder einer Zervixerkrankung zur Ermittlung, ob eine Überweisung zur Kolposkopie oder anderen Folgebehandlungen erforderlich ist.
- Als Nachkontrolle für Patientinnen mit geringgradiger Dysplasie (d. h. einer Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) oder mit hochgradiger Dysplasie (d. h. High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL) nach den Pap-Abstrichergebnissen vor der Kolposkopie. Bei diesen Patientinnen unterstützt ein Ergebnis durch den *digene* HC2 HPV DNA Test den Arzt bei der Behandlung durch eine Risikobeurteilung der Frauen, um ein Vorliegen einer hochgradigen Erkrankung auszuschließen.

Der *digene* HC2 HPV DNA Test sollte zusammen mit anderen aus diagnostischen Tests und aus Vorsorgeuntersuchungen abgeleiteten klinischen Informationen, ärztlichen Untersuchungen und einer vollständigen Aufnahme der Anamnese im Rahmen einer angemessenen Patientenbetreuung eingesetzt werden. Die Ergebnisse des *digene* HC2 HPV DNA Test **dürfen nicht** als alleinige Basis der klinischen Beurteilung und Behandlung von Patientinnen eingesetzt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das Vorliegen bestimmter HPV-Typen im weiblichen Genitaltrakt ist von einer Reihe verschiedener Erkrankungen begleitet, einschließlich Kondylomen, bowenoider Papulose, zervikaler, vaginaler und vulvarer intraepithelialer Neoplasien und Karzinomen.^{1 bis 3} Es ist allgemein anerkannt, dass die Übertragung dieser Viren überwiegend sexuell erfolgt und dass es sich bei den High-Risk-HPV-Typen um den wichtigsten anerkannten Risikofaktor für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms handelt.^{4 bis 8}

Humane Papillomaviren sind aus einem Ikosaeder-Viruspartikel (Virion) aufgebaut, der ein doppelsträngiges zirkulares DNA-Molekül mit 8.000 Basenpaaren enthält, das von einem Proteinkapsid umgeben ist. Nach einer Infektion der Epithelzellen breitet sich die virale DNA über die gesamte Dicke des Epithels aus, während intakte Virionen nur in den oberen Gewebeschichten zu finden sind. Deshalb kann virale DNA, abhängig vom Typ und Läsionsgrad, entweder in Virionen oder als episomale oder integrierte HPV-Sequenzen vorliegen.

Bisher ist die Kultivierung von HPV in vitro nicht gelungen, und die immunologischen Tests sind unzulänglich, um das Vorliegen einer zervikalen HPV-Infektion nachzuweisen. Indirekte Hinweise auf eine anogenitale HPV-Infektion ergeben sich allerdings aus der körperlichen Untersuchung sowie durch die Anwesenheit der mit der viralen Replikation einhergehenden charakteristischen Zellveränderungen im Pap-Abstrich oder in Biopsieproben. Als Alternative können Biopsien mittels Nukleinsäure-Hybridisierung analysiert werden, um das Vorliegen von HPV-DNA unmittelbar nachzuweisen.

Historisch wurden HPV 16 und HPV 18 als mit hohem Karzinomrisiko assoziierte HPV-Typen und die HPV-Typen 6 und 11 als HPV mit geringem Risiko eingestuft.^{8 bis 10} Später wurde gezeigt, dass die HPV-Typen 31, 33 und 35 einen intermediären Zusammenhang mit Karzinomen aufweisen.^{2, 11 bis 14} Trotz dieses nützlichen konzeptuellen Rahmens sind diese 7 HPV-Typen nur für ca. 70 % der Zervixneoplasien verantwortlich.⁹⁻¹¹ Weitere HPV-Typen, einschließlich der Typen 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68, wurden in den übrigen Läsionen als die wichtigsten nachweisbaren HPV-Typen identifiziert.^{15 bis 20, 32 bis 36} Diese HPV-Typen lassen sich basierend auf ihrer relativen Verteilung auf verschiedene histopathologische Diagnosekategorien außerdem auch in Gruppen mit geringem, mittlerem und hohem Risiko kategorisieren.^{21, 32 bis 37}

Es wurde gezeigt, dass HPV-DNA bei ca. 10 % der Frauen mit normalem Zervixepithel vorhanden ist, obwohl die tatsächliche Prävalenz bei Frauen spezifischer Gruppen stark vom Alter und anderen demografischen Variablen beeinflusst wird.^{2, 10, 21, 31} Prospektive Studien ergaben, dass im Vergleich zu nur 1 bis 3 % HPV-DNA-negativer Frauen 15 bis 28 % HPV-DNA-positiver Frauen innerhalb von 2 Jahren squamöse intraepitheliale Neoplasien (Squamous Intraepithelial Lesions, SIL) entwickelten.^{22, 23} Im Vergleich war insbesondere das Progressionsrisiko für die HPV-Typen 16 und 18 größer (ca. 40 %) als für andere HPV-Typen.²²

VERFAHRENSPRINZIP

Der *digene* HC2 HPV DNA Test unter Verwendung der HC2-Technologie ist ein Antikörper-Capture-Assay mit signalverstärkter Hybridisierung, der einen Mikrotiterplatten-Chemilumineszenznachweis einsetzt. Proben mit Ziel-DNA hybridisieren mit einer spezifischen HPV-RNA-Sonde. Die sich ergebenden RNA:DNA-Hybride werden auf der Oberfläche einer mit für die RNA:DNA-Hybride spezifischen Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatten-Vertiefung fixiert (Capture). Die immobilisierten Hybride werden dann mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern umgesetzt, die für die RNA:DNA-Hybride spezifisch sind, und mit einem Chemilumineszenz-Substrat nachgewiesen. An jeden Antikörper werden jeweils mehrere alkalische Phosphatase-Moleküle konjugiert. Mehrfach konjugierte Antikörper binden an jedes fixierte RNA:DNA-Hybrid, was zu einer erheblichen Signalverstärkung führt. Beim Spalten des Substrats durch die gebundene alkalische Phosphatase wird Licht emittiert, das als relative Lumineszenzeinheiten (RLU) in einem Luminometer gemessen wird. Die Intensität des emittierten Lichts zeigt die An- oder Abwesenheit von Ziel-DNA in der Probe an.

Eine RLU-Messung, die gleich oder größer als der Grenzwert ist, zeigt das Vorliegen von HPV-DNA-Sequenzen in der Probe an. Eine unter dem Grenzwert liegende RLU-Messung zeigt die Abwesenheit der getesteten spezifischen HPV-DNA-Sequenzen oder HPV-DNA-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze des Assays an.

Tests mit großem Probendurchsatz können mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test unter Verwendung des Rapid Capture® Systems (RCS) durchgeführt werden. Dieses Instrument verarbeitet bis zu 352 Proben in acht Stunden. Zur Durchführung von Tests mit großem Probendurchsatz werden alle Verfahrensschritte des Assays vom RCS übernommen, mit Ausnahme des Probendenaturierung, des Signalnachweises der Chemilumineszenz und dem Berichten der Ergebnisse.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Ein digene HC2 HPV DNA Test Kit (Kat.-Nr. 5196-1330) ist ausreichend für die Durchführung von 96 Tests. Die Anzahl der Patientenergebnisse variiert abhängig von der Anzahl der Verwendungen pro Kit:

- 1 Verwendung = 40 Patientenergebnisse (Low-Risk und High-Risk)
- 2 Verwendungen = 32 Patientenergebnisse (Low-Risk und High-Risk)

- 1 x 0,35 ml **Indikatorfarbstoff**
Enthält 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 50 ml **Denaturierungsreagenz**
Verdünnte Natriumhydroxid-(NaOH)-Lösung.
- 1 x 5 ml **Sondenverdünnungsmittel**
Gepufferte Lösung mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 150 µl **Low-Risk-HPV-Sonde**
HPV-6/11/42/43/44-RNA-Sonde in gepufferter Lösung (grüner Verschlussdeckel).
- 1 x 100 µl **High-Risk-HPV-Sonde**
HPV-16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68-RNA-Sonde in gepufferter Lösung (roter Verschlussdeckel).
- 1 x 1 ml **Low-Risk-HPV-Qualitätskontrolle**
5 pg/ml (500.000 Kopien/ml) klonierte HPV-6-DNA und Carrier-DNA in STM mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 1 ml **High-Risk-HPV-Qualitätskontrolle**
5 pg/ml (500.000 Kopien/ml) klonierte HPV-16-DNA und Carrier-DNA in STM mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 2,0 ml **Negativkalibrator**
Carrier-DNA in Specimen Transport Medium mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 1,0 ml **Low-Risk-HPV-Kalibrator**
1 pg/ml klonierte HPV-11-DNA und Carrier-DNA in STM mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 1,0 ml **High-Risk-HPV-Kalibrator**
1 pg/ml klonierte HPV-16-DNA und Carrier-DNA in STM mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 1 **Capture-Mikrotiterplatte**
Beschichtet mit Anti-RNA:DNA-Hybrid-Antikörpern.
- 1 x 12 ml **Nachweisreagenz 1**
Mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper für RNA:DNA-Hybride in gepufferter Lösung mit 0,05 % (m/V) Natriumazid.
- 1 x 12 ml **Nachweisreagenz 2**
CDP-Star[®] mit Smaragdgrün II (Chemilumineszenzsubstrat).
- 1 x 100 ml **Waschpufferkonzentrat**
Enthält 1,5 % (m/V) Natriumazid.

NICHT MITGELIEFERTE ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN

In-vitro-Diagnostika - Geräte und Zubehör für das Hybrid Capture System ^A

digene Hybrid Capture 2 System ("digene HC2 System"), bestehend aus einem von QIAGEN zugelassenen Luminometer ("DML-Instrument"), von QIAGEN zugelassener PC und Peripheriegeräte (Bildschirm, Tastatur, Maus, Drucker und Drucker Kabel), *digene* HC2 System Software ("digene Assay-Analysesoftware"), *digene* HC2 System Assay Protocols für HPV, LumiCheck Plate Software und *digene* HC2 System Software User Manual
Hybrid Capture System Rotary Shaker I (Kreisschüttler I)
Hybrid Capture System Microplate Heater I (Mikrotiterplatten-Inkubator I)
Hybrid Capture System Automated Plate Washer (Automatischer Plattenspüler)
Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (optional)^B
Konversionsgestell und Gestelldeckel (optional)
digene Specimen Rack and Rack lid (Probengestell und Gestelldeckel) (optional)
EXPAND-4 Dispenser und Stativ (optional)^C
digene HC2 DNA Collection Device ^D
Spender für Röhrchenverschlussfolie und Schneidegerät (optional, zur Verwendung mit dem MST-Vortexer 2)

Geräte und Zubehör für den allgemeinen Laborgebrauch

65 ± 2 °C Wasserbad mit einer ausreichenden Größe für entweder ein Konversionsgestell (36 x 21 x 9 cm) oder Probenstative
Mikrozentrifuge (optional zum Zentrifugieren der Sondenfläschchen zum Erlangen des maximalen Sondenvolumens)
Vortexmischer mit Becheraufsatz
Einkanal-Mikrodispenser; variabel einstellbar für Volumen von 20 bis 200 µl und 200 bis 1.000 µl
Direktverdrängungssystem-Dispenser, wie z. B. die Eppendorf® Repeater® Pipette oder ein entsprechender Dispenser
8-Kanal-Dispenser; variabel einstellbar für Volumen von 25 bis 200 µl
Zeitschaltuhr
Natriumhypochlorit-Lösung, 5 % (v/v) (oder Haushaltsbleiche)
Parafilm® oder entsprechende Folie
Einmal-Filterspitzen mit Aerosolsperre für den Einkanal-Dispenser (20 bis 200 µl und 200 bis 1.000 µl)
Einmal-Spitzen für die Eppendorf Repeater Pipette (25 und 500 µl)
Einmal-Spitzen für den 8-Kanal-Dispenser (25 bis 200 µl)
Kimtowels®-Wischtücher oder entsprechende fusselfreie Papiertücher
Einmal-Arbeitstischabdeckung
Puderfreie Handschuhe
5-ml- und/oder 15-ml-Polypropylen-Röhrchen mit Schnappdeckel und Rundboden (für die Sondenverdünnung)
2,0-ml-Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen mit Verschlussdeckeln

Zusätzliche Geräte und Zubehörteile für die Behandlung von Proben in Surepath Preservative Fluid

Ausschwingrotor-Zentrifuge bis zu 800 ± 15 x g, geeignet für konische 15-ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen
digene HC2 Sample Conversion Tubes (konische 15-ml-Probenkonversionsröhrchen)^F
7-ml-Transferpipetten mit Standardspitze oder entsprechende Pipetten
QIAGEN Specimen Transport Medium
Einmal-Spitzen für die Eppendorf Repeater Pipette (100 µl)

Rapid Capture System (optional für Tests mit großem Probendurchsatz)^E
Spülapparat
Mikrotiterplatten zur Hybridisierung
Mikrotiterplattendeckel
Leere Mikrotiterplattenreihen (erhältlich von Costar, Modellnr. 2581); optional zum Gebrauch mit dem automatischen Plattenspüler
Extralange Pipettenspitzen zum Probentransfer
Probenentnahmeröhrchen
Gestell für Probenentnahmeröhrchen
Schraubdeckel für Probenentnahmeröhrchen
Einmal-Reagenzbehälter
DuraSeal™ Röhrchenverschlussfolie
Mikroröhrchen zur Hybridisierung
Mikroröhrchengestelle
Plattenabdeckungen

Zusätzliche Geräte und Zubehörteile für die Behandlung von Proben in PreservCyt Solution

Ausschwingrotor-Zentrifuge bis zu 2.900 ± 150 x g, geeignet für konische 10-ml- oder 15-ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen
5-ml- serologische Pipetten oder Vollpipetten
digene HC2 Sample Conversion Kit^A
Einmal-Spitzen für die Eppendorf Repeater Pipette (50 und 100 µl)
Für manuelles Vortex-Verfahren:
digene HC2 Sample Conversion Tubes (konische 15-ml-Probenkonversionsröhrchen)^F, konische 10-ml-Sarstedt-Röhrchen mit Deckeln oder 15-ml Polypropylen-Rundboden-Zentrifugenröhrchen mit Deckeln von VWR® oder Corning®
Röhrchengestell für konische 10-ml- oder 15-ml-Röhrchen

Für Verfahren mit Multi-Specimen Tube Vortexer 2

digene HC2 Sample Conversion Tubes (konische 15-ml-Probenkonversionsröhrchen)^F
Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
Konversionsgestell und Deckel (für konische 15-ml-Röhrchen)
Spender für Röhrchenverschlussfolie und Schneidevorrichtung
DuraSeal-Röhrchenverschlussfolie (zur Verwendung mit MST-Vortexer 2)

- ^A Bei QIAGEN sind nur Ausrüstungsgegenstände und Zubehörteile erhältlich, die mit *digene* HC2 HPV DNA Tests validiert wurden.
- ^B Ist bei halbautomatischer RCS-Anwendung ebenfalls erforderlich.
- ^C Kundenanfertigung. Andere kundenspezifische expandierbare Mehrkanalpipetten können verwendet werden, sofern im expandierten Zustand ein Abstand von 3,2 cm zwischen den Spitzen möglich ist. Alternativ kann eine Einkanalpipette mit einem Pipettiervolumen von 75 µl eingesetzt werden.
- ^D Die Leistungsmerkmale des *digene* HC2 HPV DNA Tests wurden ausschließlich mit den beiden genannten Entnahme-Kits ermittelt.
- ^E Anweisungen zum Einsatz dieses Systems für Tests mit großem Probendurchsatz mit diesem Assay finden Sie im *Rapid Capture System Benutzerhandbuch*.
- ^F Die bei QIAGEN erhältlichen *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (Probenkonversionsröhrchen von VWR oder Corning®) müssen benutzt werden, damit bei Anwendung des Verfahrens mit Multi-Specimen Tube Vortexer 2 eine saubere Assay-Durchführung gewährleistet ist.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

VOR ANWENDUNG DIESES TESTS ALLE ANLEITUNGEN SORGFÄLTIG DURCHLESEN.

SICHERHEITSMASßNAHMEN

ALLE PROBEN sind als potenziell infektiös anzusehen. Keine bekannte Testmethode kann absolute Gewähr dafür bieten, dass die Proben keine Infektion übertragen können. Es wird empfohlen, dass Humanproben unter Beachtung der entsprechenden nationalen/lokalen Sicherheitsrichtlinien für den Umgang mit biologischem Material gehandhabt werden. Befolgen Sie diese Sicherheitsrichtlinien beim Umgang mit biologischem Material, das infektiöse oder vermutlich infektiöse Materialien enthält. Diese Vorsichtsmaßnahmen umfassen u. a. Folgendes:

1. Nicht mit dem Mund pipettieren.
2. In Bereichen, in denen Reagenzien oder Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen oder trinken.
3. Bei der Handhabung von Reagenzien oder Proben puderfreie Einmal-Handschuhe tragen. Nach Durchführung des Tests die Hände gründlich waschen.
4. Verschüttete Proben unter Verwendung eines tuberkuloziden Desinfektionsmittels, wie zum Beispiel 0,5 % (V/V) Natriumhypochlorit oder einem anderen geeigneten Desinfektionsmittel reinigen und desinfizieren.^{42, 43}
5. Alle Proben, Reagenzien und andere potenziell kontaminierte Materialien unter Einhaltung nationaler und lokaler Bestimmungen dekontaminieren und entsorgen.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid. Natriumazid kann Berichten zufolge in den Laborrohrleitungen Blei- und Kupferazid bilden. Diese Azide können bei Erschütterung, wie z. B. Hämmern usw., explodieren. Zur Verhinderung der Bildung von Blei- oder Kupferazid sind die Ausgüsse nach der Entsorgung Natriumazid-haltiger Lösungen gründlich mit Wasser zu spülen. Zur Entfernung von Kontamination aus alten Abflüssen mit vermuteter Azid-Ansammlung empfiehlt die US-amerikanische Occupational Safety and Health Institution (OSHI) Folgendes: (1) Flüssigkeit vollständig mit einem Gummi- oder Kunststoffschlauch aus dem Siphon heben, (2) mit 10%-iger v/v Natriumhydroxid-Lösung füllen, (3) 16 Stunden stehen lassen und (4) mit reichlich Wasser ausspülen.

RCS-automatisierte Tests

Bei Tests mit großem Probendurchsatz beachten Sie die zusätzlichen Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen im *Rapid Capture System Benutzerhandbuch*.

SICHERHEITS- UND RISIKOHINWEISE FÜR REAGENZIEN

Die folgenden Risiko- und Sicherheitssätze gelten für die Reagenzien des *digene* HC2 HPV DNA Test Kits:

Waschpufferkonzentrat



Enthält: Natriumazid. Warnung! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Schädlich für Wasserorganismen mit langfristigen Auswirkungen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Inhalt/ Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen.

Denaturierungsreagenz



Enthält: Natriumhydroxid. Gefahr! Verursacht schwere Hautverätzungen und Augenschäden. Kann auf Metalle korrosiv wirken. Inhalt/ Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen. IM AUGE: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit

Wasser spülen. Falls vorhanden und leicht möglich, Kontaktlinsen entfernen. Spülen fortsetzen. AUF DER HAUT (oder im Haar): Kontaminierte Kleidung sofort entfernen/ ausziehen. Haut mit Wasser spülen/ duschen. Sofort GIFTNOTRUF anrufen oder Arzt hinzuziehen. Unter Verschluss aufbewahren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung/ Schutzhandschuhe/ Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen.

Sondenverdünnungsmittel



Enthält Essigsäure, Polyacrylsäure. Gefahr! Verursacht schwere Hautverätzungen und Augenschäden. Inhalt/ Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen. IM AUGE: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Falls vorhanden und leicht möglich, Kontaktlinsen entfernen. Spülen fortsetzen. AUF DER HAUT (oder im Haar): Kontaminierte Kleidung sofort entfernen/ ausziehen. Haut mit Wasser spülen/ duschen. Sofort GIFTNOTRUF anrufen oder Arzt hinzuziehen. Unter Verschluss aufbewahren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung/ Schutzhandschuhe/ Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen.

High-Risk-HPV-Kalibrator

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

Low-Risk-HPV-Kalibrator

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

High-Risk-HPV-Qualitätskontrolle

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

Low-Risk-HPV-Qualitätskontrolle

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


Negativkalibrator

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


Weitere Informationen

Sicherheitsdatenblätter: www.qiagen.com/safety

VORSICHTSMAßNAHMEN

1. In-vitro-Diagnostikum.
2. Die Zervixbürste ist nur zum Gebrauch bei nicht schwangeren Frauen bestimmt.
3. Die Reagenzien nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden, das neben dem Symbol  auf dem Etikett der Außenverpackung angegeben ist.
4. Das Durchführen des Assays außerhalb der vorgesehenen Zeit- und Temperaturbereiche kann zu ungültigen Ergebnissen führen. Assays, die nicht in die festgelegten Zeit- und Temperaturbereiche fallen, sind ungültig und müssen wiederholt werden.
5. Das Verfahren, die Verifikationskriterien für die Assay-Kalibrierung, die Qualitätskontrolle und die Interpretation der Probenergebnisse des *digene* HC2 HPV DNA Tests sind zum Erlangen zuverlässiger Testergebnisse genau zu befolgen.
6. Es ist wichtig, das genaue Reagenzvolumen zu pipettieren und nach jeder Reagenzzugabe gründlich zu mischen. Nichtbeachtung kann zu fehlerhaften Testergebnissen führen. Die Gewähr, dass die angegebenen Farbumschläge auftreten, dient der Bestätigung, dass diesen Bedingungen entsprochen wurde.
7. Die Kit-Bestandteile wurden als eine Einheit getestet. Bestandteile anderer Herkunft oder aus anderen Chargen **dürfen nicht** verwendet werden.
8. Nukleinsäuren sind sehr empfindlich gegenüber umweltbedingtem Nuklease-Abbau. Nukleasen kommen auf der menschlichen Haut und auf Oberflächen oder Materialien vor, die von Personen gehandhabt werden. Arbeitsflächen reinigen und mit Einmal-Arbeitstischabdeckungen abdecken **und bei der Durchführung aller Assay-Schritte puderfreie Handschuhe tragen**.
9. Darauf achten, dass eine Kontamination von Capture-Mikrotiterplatte und Nachweisreagenz 2 mit exogener alkalischer Phosphatase während der Assay-Durchführung vermieden wird. Zu Substanzen, die gegebenenfalls alkalische Phosphatase enthalten können, zählen das Nachweisreagenz 1, Bakterien, Speichel, Haar und Öle der Haut. **Das Abdecken der Capture-Mikrotiterplatte nach dem Spülschritt und während der Inkubation mit Nachweisreagenz 2 ist besonders wichtig, da exogene alkalische Phosphatase mit dem Nachweisreagenz 2 reagieren und zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.**
10. Das Nachweisreagenz 2 vor längerer direkter Lichteinwirkung schützen. Das Nachweisreagenz 2 sofort nach Aufteilung in Aliquote verwenden und direktes Sonnenlicht vermeiden.
11. Der Direktverdrängungssystem-Dispenser sollte vor der Reagenzabgabe angesaugt und periodisch auf das Auftreten großer Luftbläschen kontrolliert werden. Exzessive Mengen großer Luftbläschen in der Dispenser-Spitze können zur ungenauen Abgabe führen. Dies lässt sich durch das Füllen des Dispensers, die Abgabe der gesamten Flüssigkeit und erneutes Befüllen vermeiden. Spezifische Hinweise zur Anwendung sind der Dispenser-Gebrauchsanweisung des Lieferanten zu entnehmen.
12. Das Mehrkanal-Pipettieren sollte unter Verwendung der reversen Pipettiertechnik (siehe *Hybridnachweis*) zur Abgabe der Nachweisreagenzien 1 und 2 durchgeführt werden. Jede Pipettenspitze auf vorschriftsmäßigen Sitz auf dem Mehrkanal-Dispenser und Füllung prüfen.
13. Darauf achten, dass jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gründlich gespült wird, wie in den Spülanweisungen angegeben. Unzureichendes Spülen führt zu einem erhöhten Hintergrund und kann folglich zu falsch-positiven Ergebnissen führen. In den Vertiefungen zurückbleibende Waschpufferreste können zu reduzierten Signalen oder schlechter Reproduzierbarkeit führen.
14. Den Mikrotiterplatten-Inkubator I vom Kaltstart an mindestens 60 Minuten auf $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ äquilibrieren lassen. Nichteinhaltung dieser Anwärmperiode kann zum Schmelzen der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung führen. Nähere Einzelheiten sind im *Microplate Heater I Benutzerhandbuch* zu finden.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

1. Kit nach Erhalt bei 2 bis 8 °C lagern. Waschpufferkonzentrat, Denaturierungsreagenz und der Indikatorfarbstoff können gegebenenfalls bei 2 bis 30 °C gelagert werden.
2. Nicht über das neben dem Symbol  auf dem Verpackungsetikett angegebene Verfallsdatum oder das Verfallsdatum der vorbereiteten Reagenzien hinaus verwenden (siehe nachstehend).
3. Alle Reagenzien, außer Denaturierungsreagenz, Low-Risk- und High-Risk-HPV-Sonden und Waschpufferkonzentrat, sind gebrauchsfertig.

Zum Testen von Proben auf das Vorliegen einer der 18 HPV-Typen wurde ein Kombinationssonden-Cocktail-(CPC)-Verfahren bereitgestellt. Bei Wahl dieser Testoption muss vor der Durchführung des *digene* HC2 HPV DNA Tests durch Zusammenmischen von verdünntem Low-Risk-HPV-Sondengemisch und verdünntem High-Risk-HPV-Sondengemisch ein Kombinationssonden-Cocktail vorbereitet werden. Für das Dual-Sondenverfahren werden getrennte Low-Risk- und High-Risk-HPV-Sondengemische verwendet. Siehe nachstehende Anleitungen.

Zur Vorbereitung der(des) HPV-Sondengemische(s), des Waschpuffers, sowie der Nachweisreagenzien 1 und 2 das *Rapid Capture System Benutzerhandbuch zu Rate* ziehen, da die darin enthaltenen Anweisungen speziell für den Einsatz dieses Systems bei Tests mit großem Probendurchsatz abgestimmt sind.

REAGENZ	VORBEREITUNGSVERFAHREN
Denaturierungsreagenz	<p>Zuerst vorbereiten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Der Flasche mit dem Denaturierungsreagenz 5 Tropfen Indikatorfarbstoff zufügen und gründlich mischen. Das Denaturierungsreagenz sollte eine gleichmäßige, dunkle purpurrote Farbe aufweisen. • Nach der Vorbereitung ist das Denaturierungsreagenz bei einer Lagerung von 2 bis 8 °C drei Monate stabil. Das Reagenz mit dem neuen Verfallsdatum kennzeichnen. Bei Verblässen der Farbe vor Gebrauch 3 Tropfen Indikatorfarbstoff zufügen und gründlich mischen. <p>Warnhinweis: Das Denaturierungsreagenz ist ätzend. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe, Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei der Handhabung vorsichtig vorgehen.</p>
Low-Risk-HPV-Sondengemisch (Angesetzt aus Low-Risk-HPV-Sonde und Sondenverdünnungsreagenzien)	<p>Während der Probendenaturierungsinkubation ansetzen:</p> <p>Wichtig: Manchmal befindet sich die Sonde in dem Verschlussdeckel des Fläschchens.</p> <p>Hinweis: Kontamination der Sonde und der Sondenmischung mit RNase unbedingt vermeiden. Zum Pipettieren der Sonde Filterspitzen mit Aerosolsperre verwenden. Das Sondenverdünnungsmittel ist viskos.</p> <p>Bei der Vorbereitung von HPV-Sonden ist unbedingt auf gründliches Mischen zu achten. Während des Mischschrittes muss sich ein sichtbarer Wirbel bilden. Unvollständiges Mischen kann zu einem reduzierten Signal führen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Das Fläschchen mit der Low-Risk-HPV-Sonde kurz zentrifugieren, damit die Flüssigkeit auf den Boden des Fläschchens gebracht wird. Durch vorsichtiges Klopfen mischen. • Die Menge der erforderlichen Sondenmischung (25 µl/Test) ermitteln. Es wird empfohlen, zur Kompensation für das in den Pipettenspitzen oder an den Seiten des Fläschchens verloren gegangene Volumen etwas mehr Sondenmischung anzusetzen. Vorgeschlagene Volumen sind nachstehend aufgeführt. Die für jede Anwendung empfohlene kleinste Anzahl an Vertiefungen ist 24. Sind weniger als 24 Vertiefungen pro Assay erwünscht, kann die Gesamttestzahl pro Kit aufgrund der begrenzten Volumen an Sonde und Sondenverdünnungsmittel reduziert sein.

	<ul style="list-style-type: none"> Die erforderliche Menge Sondenverdünnungsmittel in einen neuen Einmal-Behälter überführen. Abhängig von der Anzahl der Tests wird entweder ein 5-ml- oder 15-ml-Polypropylenröhrchen mit Schnappdeckel und rundem Boden empfohlen. Zur Vorbereitung der Sondenmischung eine Verdünnung von 1:25 aus Low-Risk-HPV-Sonde in Sondenverdünnungsmittel ansetzen. <table border="1" data-bbox="695 344 1430 506"> <thead> <tr> <th>Anzahl Tests/Reihen</th> <th>Volumen Sondenverdünnungsmittel*</th> <th>Volumen Sonde*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>pro Vertiefung</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Diese Werte enthalten das empfohlene zusätzliche Volumen.</p> <ul style="list-style-type: none"> Low-Risk-HPV-Sonde in das Sondenverdünnungsmittel pipettieren, indem die Pipettenspitze gegen die Innenwand des Röhrchens knapp über dem Meniskus platziert und der Inhalt abgegeben wird. Die Spitze nicht in das Sondenverdünnungsmittel eintauchen. Mindestens 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit des Vortexers gründlich vermischen. Es muss ein sichtbarer Wirbel gebildet werden. Mit „Low-Risk-HPV-Sondengemisch“ kennzeichnen und bis zum Gebrauch in einem sauberen, geschlossenen Behälter aufbewahren. Nicht aufgebrauchtes Sondengemisch verwerfen. 	Anzahl Tests/Reihen	Volumen Sondenverdünnungsmittel*	Volumen Sonde*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	pro Vertiefung	0,045 ml	1,8 µl
Anzahl Tests/Reihen	Volumen Sondenverdünnungsmittel*	Volumen Sonde*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
pro Vertiefung	0,045 ml	1,8 µl											
High-Risk-HPV-Sondengemisch	<p>Vorbereitung wie vorstehend für das Low-Risk-HPV-Sondengemisch. Mit „High-Risk-HPV-Sondengemisch“ kennzeichnen. Nicht aufgebrauchtes Sondengemisch verwerfen.</p>												
Kombinationssonden-Cocktail	<p>Die Vorbereitung des Low-Risk-HPV-Sondengemischs und des High-Risk-HPV-Sondengemischs erfolgt wie vorstehend beschrieben. Den gesamten Inhalt des verdünnten Low-Risk-HPV-Sondengemischs dem Röhrchen mit verdünntem High-Risk-HPV-Sondengemisch zufügen. Mindestens 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit des Vortexers gründlich vermischen. Es muss ein sichtbarer Wirbel gebildet werden. Mit „Kombinationssonden-Cocktail“ kennzeichnen. Nicht aufgebrauchtes Sondengemisch verwerfen.</p>												

Waschpuffer**Während des Capture-Schrittes ansetzen:**

Für das Hybrid Capture System mit dem automatischen Plattenspüler kann der Waschpuffer wie nachstehend beschrieben vorbereitet und in einem abgedeckten Behälter gelagert oder zur Vorbereitung von jeweils 1 l und Füllen in die Waschbehälter des automatischen Plattenspülers hergestellt werden. Aus der nachstehenden Tabelle gehen die Mischvolumen hervor:

Weitere Pflege- und Wartungsanleitungen sind den Automated Plate Washer Benutzerhandbuch zu entnehmen.

Warnung: Das Waschpufferkonzentrat ist bei Verschlucken toxisch. Es sind geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe sowie Schutzbrille/Gesichtsschutz zu tragen. Um die Exposition so gering wie möglich zu halten, ist das Waschpufferkonzentrat bei der Vorbereitung mit Wasser zu verdünnen.

Menge Waschpufferkonzentrat	Menge destilliertes oder entionisiertes Wasser	Endvolumen des Waschpuffers
33,3 ml	966,7 ml	1 l
66,6 ml	1.933,4 ml	2 l
100,0 ml	2.900,0 ml	3 l

Hinweis: Es ist sehr wichtig, dass der automatische Plattenspüler ständig eingeschaltet bleibt. Hierdurch wird die Durchführung der Wartungsspülung ermöglicht, wenn das Gerät acht Stunden nicht in Gebrauch war.

Vor jedem Assay-Durchlauf sicherstellen, dass der Abwassertank leer und der Spülwassertank mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gefüllt ist.

Manuelles Plattenspülverfahren:

- Das Waschpufferkonzentrat gut vermischen.
- 100 ml Waschpufferkonzentrat mit 2,9 l destilliertem oder entionisiertem Wasser in dem Spülapparat verdünnen und gut mischen (Endvolumen: 3 l).
- Den Behälter zum Vermeiden von Kontamination oder Verdunstung fest verschließen.

Nach der Vorbereitung ist der Waschpuffer drei Monate bei 2 bis 30 °C stabil. Mit dem neuen Verfallsdatum kennzeichnen. Wenn der Waschpuffer im Kühlschrank aufbewahrt wurde, ist er vor Gebrauch auf 20 bis 25 °C zu bringen.

Es wird empfohlen, dass der Spülapparat und die Schläuche zum Vermeiden möglicher Kontamination durch alkalische Phosphatase aus Bakterien und Schimmelpilzen alle drei Monate mit 0,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung gereinigt und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gründlich gespült werden.

VOLUMEN FÜR GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN**Nachweisreagenz
1 und
Nachweisreagenz
2****Unmittelbar vor Gebrauch:**

Reagenz gründlich mischen, dann das entsprechende Volumen Nachweisreagenz 1 oder Nachweisreagenz 2 unter Beachtung des nachstehenden Leitfadens vorschriftsmäßig in einen sauberen Reagenzbehälter abmessen. Diese Reagenzien **DÜRFEN NICHT** in die Originalflaschen zurückgegeben werden, um Kontamination zu vermeiden. **Nicht aufgebrauchtes Material nach Gebrauch verwerfen**. Anstelle eines 8-Kanal-Dispensers kann auch ein geeigneter Direktverdrängungssystem-Dispenser verwendet werden. In diesem Fall sollten in einem Polypropylen-Röhrchen von ausreichender Größe zur Aufnahme des wie unten angegebenen erforderlichen Volumens Aliquote hergestellt werden.

Anzahl Tests/Reihen	Volumen Nachweisreagenz 1 oder 2
96/12	Flascheninhalt
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 Test	0,125 ml

PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Zur Verwendung mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test empfohlen sind nur Zervixproben, die mithilfe des *digene* HC2 DNA Collection Device (bestehend aus Zervixbürste und *digene* Specimen Transport Medium) entnommen und transportiert wurden, oder Proben, die mit einem besenähnlichen Entnahmegesetz oder einer Bürsten/Spatel-Kombination entnommen und in PreservCyt Solution gegeben wurden, oder Zervixproben, die in Surepath Preservative Fluid entnommen wurden. Mit anderen Entnahmegeräten entnommene oder in anderen Transportmedien transportierte Proben sind zur Verwendung mit diesem Assay nicht geeignet. Die Leistungsmerkmale dieses Kits wurden ausschließlich auf Grundlage der genannten Entnahmekits aufgestellt. Bei Durchführung einer kolposkopischen Untersuchung muss die Entnahme von Zervixproben vor der Applikation von Essigsäure oder Jod erfolgen. Weitere Informationen zur Entnahme und Handhabung der Proben finden Sie in der *digene* HC2 DNA Collection Device Gebrauchsanweisung.

ZERVIXPROBEN IN STM

STM-Proben können bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt und ohne Kühlung zum Testen in das Labor transportiert werden. Die Proben sollten mittels eines Kurierdienstes in einem isolierten Behälter entweder über Nacht oder zur Lieferung innerhalb von 2 Tagen versandt werden. Bei Durchführung des Assays innerhalb einer Woche sind die Proben im Testlabor bei 2 bis 8 °C zu lagern. Erfolgt die Durchführung des Assays mehr als eine Woche später, können die Proben bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden (vor dem Einfrieren siehe *Hinweise* unter *Zervixbiopsien*). Zur Verzögerung von Bakterienwachstum und zur Erhaltung der DNA-Integrität wurde dem STM ein Konservierungsmittel zugesetzt. Die Erhaltung der Lebensfähigkeit von Organismen oder Zellen ist jedoch **nicht beabsichtigt**. Das *digene* HC2 DNA Collection Device darf nicht zur Probenentnahme an schwangeren Frauen verwendet werden.

ZERVIXBIOPSIEN

Frisch entnommene Zervixbiopsien (Querschnitt: 2 bis 5 mm) lassen sich auch mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test analysieren. Die Biopsieprobe muss sofort in 1,0 ml STM gegeben und eingefroren bei -20 °C gelagert werden. Die Biopsieproben können zur Lieferung an das Testlabor über Nacht bei 2 bis 30 °C versandt und bis zur Verarbeitung bei -20 °C gelagert werden. Biopsien mit einem Durchmesser von weniger als 2 mm sollten nicht verwendet werden.

Hinweis: Um zu verhindern, dass die Verschlussdeckel während des Versands oder der Lagerung im eingefrorenen Zustand abspringen:

- Die Verschlussdeckel vor dem Versand der zuvor eingefrorenen Probenröhrchen mit Parafilm abdecken. Die Proben können im gefrorenen Zustand oder bei 20 bis 25 °C versandt werden.
- Wenn die Proben zum Testen aus dem Gefrierschrank genommen werden, die Verschlussdeckel sofort durch Schraubdeckel für Probenentnahmeröhrchen ersetzen.

ZERVIXPROBEN IN PRESERVCYT SOLUTION

Mit einem besenartigen Entnahmegesetz oder einer Bürsten/Spatel-Kombination entnommene und in PreservCyt Solution gegebene Proben zur Herstellung von ThinPrep® Pap-Testpräparaten sind zur Verwendung im *digene* HC2 HPV DNA Test geeignet. Die Proben sind wie üblich zu entnehmen, und die Vorbereitung der ThinPrep-Pap-Testpräparate erfolgt gemäß den Hologic Anleitungen.

Hinweis: Für den *digene* HC2 HPV DNA Test müssen mindestens 4 ml PreservCyt Solution übrig bleiben. Proben mit weniger als 4 ml nach Vorbereitung des Pap-Tests können nicht genügend Material enthalten und im *digene* HC2 HPV DNA Test zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Proben in PreservCyt Solution können bis zu drei Monaten bei Temperaturen zwischen 2 °C und 30 °C nach Entnahme und vor Verarbeitung für den *digene* HC2 HPV DNA Test aufbewahrt werden. Proben in PreservCyt Solution dürfen nicht eingefroren werden. Informationen zur Verarbeitung dieser Proben finden Sie entnehmen Sie dem *PreservCyt Specimen Preparation Procedure*.

ZERVIXPROBEN IN SUREPATH PRESERVATIVE FLUID

(NUR für High-Risk-HPV-DNA-Tests)

Die manuelle Vorbereitung von Proben in SurePath wird mit dem Postgradient-Zellpellet durchgeführt, das aus der Vorbereitung von SurePath-Pap-Testpräparaten entsteht. Die SurePath-Pap-Testpräparate werden gemäß der zutreffenden Anweisungen für den BD PrepStain[®] Slide Processor hergestellt.

Wichtig: Unmittelbar nach der Herstellung des SurePath-Pap-Präparats muss 2,0 ml SurePath Preservative Fluid in das Zentrifugenröhrchen mit dem zurückgebliebenen Zellpellet pipettiert werden. Dies erhält die Integrität des Postgradient-Zellpellets für die Durchführung des *digene* HC2 HPV DNA Tests.

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

Postgradient-Zellpellet-Proben in SurePath werden vorbereitet, wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben. Das Ergebnis der manuellen Probenvorbereitung ist eine denaturierte Probe, die bereit ist für den Hybridisierungsschritt des Tests.

TESTVERFAHREN

Proben können infektiöse Bestandteile enthalten und sind entsprechend zu handhaben. Der *digene* HC2 HPV DNA Test kann manuell, wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben, oder bei Tests mit großem Probendurchsatz mit dem Rapid Capture System Instrument durchgeführt werden.

TESTS MIT GROßEM PROBENDURCHSATZ MIT DEM RAPID CAPTURE SYSTEM

Das Rapid Capture System ist ein universelles automatisches Pipettier- und Verdünnungssystem, das mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test bei Tests mit großem Probendurchsatz eingesetzt werden kann. Dieses System verarbeitet bis zu 352 Proben in acht Stunden, wobei eine Zeitspanne von 3,5 Stunden enthalten ist, während der keine Benutzerintervention erforderlich ist; bis zu 704 Probenergebnisse können so binnen 13 Stunden bereitgestellt werden. Die testvorbereitende Denaturierung der Proben wird unabhängig vom RCS durchgeführt, bevor die Proben auf die RCS-Plattform gegeben werden. Außerdem erfolgen der Chemilumineszenz-Signalnachweis und die Ergebnisberichterstattung mit dem Offline-DML-Instrument, das sowohl beim manuellen als auch beim RCS-Verfahren eingesetzt wird. Die Verfahrensschritte des *digene* HC2 HPV DNA Tests werden in exakt derselben Reihenfolge wie jene beim manuellen Testverfahren ausgeführt. Die RCS-Anwendung ermöglicht eine gestaffelte Verarbeitung von bis zu 4 Mikrotiterplatten, wobei jede der Platten Proben und die erforderlichen Assay-Kalibratoren und Qualitätskontrollen enthält.

Zusätzlich zur dieser Gebrauchsanweisung entnehmen Sie die zur Verwendung des Rapid Capture System erforderliche verfahrensbezogene Beschreibung dem mit dem Instrument mitgelieferten *Rapid Capture System Benutzerhandbuch*.

MANUELLES VERFAHREN

Vorbereitung

1. Wird der Mikrotiterplatten-Inkubator I verwendet, **sollte er vom Kaltstart an mindestens 60 Minuten lang bis auf 65 ± 2 °C äquilibriert werden.** Nähere Einzelheiten finden Sie im *Microplate Heater I Benutzerhandbuch*.
2. Darauf achten, dass sich das Wasserbad auf 65 °C aufheizt und der Wasserspiegel zum Eintauchen des gesamten Volumens in den Probenröhrchen hoch genug ist.
3. Die Proben herausnehmen und **alle** erforderlichen Reagenzien **vor Beginn des Assays** aus dem Kühlschrank nehmen. 15 bis 30 Minuten warten, bis die Reagenzien 20 bis 25 °C erreicht haben.

Hinweis: Proben in PreservCyt Solution oder in SurePath vorbereiten, bevor bereits denaturierte Proben oder Kitreagenzien auf Raumtemperatur äquilibriert werden.

4. Verwenden Sie die *digene* Assay-Analysesoftware, um die Assay-Plattenanordnung zu erstellen. Anleitungen zum Erstellen einer Plattenanordnung sind im entsprechenden Benutzerhandbuch zu finden.
5. Zu testende Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben in der gleichen Ordnung, in der sie getestet werden, in einem Teströhrchengestell anordnen. **Der Negativkalibrator, der Low-Risk-HPV-Kalibrator und der High-Risk HPV-Kalibrator müssen ZUERST getestet werden.** Negativkalibrator (NC), Low-Risk-HPV-Kalibrator (LRC) oder High-Risk-HPV- Kalibrator (HRC), Low-Risk-Qualitätskontrolle (QC1-LR), High-Risk-Qualitätskontrolle (QC2-HR) und Proben müssen in einer Spalte mit 8-Mikrotiterplatten-Vertiefungen angeordnet laufen. Siehe nachstehende *beispielhafte Anordnung*.

Beispielhafte Anordnung für einen Durchlauf mit 24 Mikrotiterplatten-Vertiefungen:			
Reihe	Spalte		
	1	2	3
A	NC	Probe 1	Probe 9
B	NC	Probe 2	Probe 10
C	NC	Probe 3	Probe 11
D	LRC oder HRC	Probe 4	Probe 12
E	LRC oder HRC	Probe 5	Probe 13
F	LRC oder HRC	Probe 6	Probe 14
G	QC1-LR	Probe 7	Probe 15
H	QC2-HR	Probe 8	Probe 16

6. Bei Verwendung des Kombinationssonden-Cocktail-Verfahrens (Combined-Probe Cocktail, CPC) werden NC, LRC und HRC mit dem Kombinationssonden-Cocktail in der gleichen Mikrotiterplatte als Dreifachbestimmung getestet. Vertiefungen A1, B1 und C1 für die NC und Vertiefungen D1, E1, F1, G1, H1 und A2 für die LRC bzw. HRC verwenden. Vertiefungen B2 und C2 werden hingegen für die QC1-LR- bzw. QC2-HR-Qualitätskontrollen und die in D2 beginnenden Proben verwendet. **Das CPC-Verfahren wurde nicht für den Einsatz im Rapid Capture System validiert.**

7. Für das Dual-Sondenverfahren erfolgt die Durchführung der Low-Risk-HPV-Sondengemischtests auf der linken Seite und die Durchführung der High-Risk-HPV-Sondengemischtests auf der rechten Seite der Mikrotiterplatte.

ZUERST den Negativkalibrator (NC) und den Low-Risk-Kalibrator (LRC) mit dem Low-Risk-HPV-Sondengemisch als Dreifachbestimmung testen. Dann die Qualitätskontrollen (QC1-LR und QC2-HR) und die Proben auch mit dem Low-Risk-HPV-Sondengemisch als Einzelbestimmung testen. Die NC-Wiederholungstests in A1, B1, C1; die LRC-Wiederholungstests in D1, E1, F1; QC1-LR in G1; QC2-HR in H1; und die Proben beginnend mit A2 anordnen.

ALS NÄCHSTES die NC und den High-Risk-Kalibrator (HRC) mit dem High-Risk-HPV-Sondengemisch als Dreifachbestimmung testen. Danach die QC1-LR- und QC2-HR-Proben auch mit dem High-Risk-HPV-Sondengemisch als Einzelbestimmung testen. Die NC-Wiederholungstests in A7, B7, C7; die HRC-Wiederholungstests in D7, E7, F7; QC1-LR in G7; QC2-HR in H7; und die Proben beginnend in A8 anordnen. Siehe beispielhafte Anordnung oben.

Informationen zum sachgerechten Einrichten von Kalibrator/Qualitätskontrolle/Probe in der Software sind im betreffenden Benutzerhandbuch zu finden.

8. Als Alternative können für die mit der Low-Risk- und High-Risk-HPV-Sonde getesteten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben zwei getrennte Mikrotiterplatten verwendet werden. NC und LRC werden als Dreifachbestimmung und die QC1-LR und QC2-HR als Einzelbestimmung mit dem Low-Risk-HPV-Sondengemisch in einer Mikrotiterplatte getestet, und die NC und HRC werden als Dreifachbestimmung und die QC1-LR und QC2-HR als Einzelbestimmung mit dem High-Risk-HPV-Sondengemisch in einer zweiten Mikrotiterplatte getestet. Für die NC werden die Vertiefungen A1, B1 und C1 und für die LRC bzw. HRC die Vertiefungen D1, E1 und F1 verwendet. Für die QC1-LR- bzw. QC2-HR-Qualitätskontrollen werden die Vertiefungen G1 und H1 verwendet.
9. Die Proben können bei Verwendung des CPC-Verfahrens als Einzelbestimmung mit dem Kombinationssonden-Cocktail oder als Einzelbestimmung mit dem Low-Risk-HPV-Sondengemisch sowie als Einzelbestimmung mit dem High-Risk-HPV-Sondengemisch bei Verwendung des Dual-Sondenverfahrens getestet werden.

DENATURIERUNG

Hinweis:

- **Warnhinweis:** Das Denaturierungsreagenz ist ätzend. Bei der Handhabung vorsichtig vorgehen und puderfreie Handschuhe tragen.
- **Wichtig:** Einige Zervixproben können Blut oder anderes biologisches Material enthalten, das nach Zufügen von Denaturierungsreagenz die Farbumschläge maskieren kann. Proben, die vor Zufügen von Denaturierungsreagenz eine dunkle Farbe aufweisen, können bei diesem Schritt möglicherweise keinen vorschriftsmäßigen Farbumschlag ergeben. In den Fällen, in denen kein vorschriftsmäßiger Farbumschlag auftritt, werden die Ergebnisse dieses Assays nicht negativ beeinflusst. Vorschriftsmäßiges Mischen kann durch Beobachtung des Farbumschlags der Kalibratoren und der Qualitätskontrolle bestätigt werden.
- Während der Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte ist darauf zu achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in dem Röhrchen ausreichend ist.
- Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben können bis zu dem Denaturierungsschritt vorbereitet und über Nacht bei 2 bis 8 °C oder bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden. Maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen mit maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur pro Auftauzyklus dürfen durchgeführt werden. Vor Gebrauch gut mischen.
- Nach der Denaturierung und Inkubation werden die Proben nicht mehr als infektiös angesehen.²⁶ Das Laborpersonal sollte jedoch jederzeit die nationalen/lokalen Vorsichtsmaßnahmen beachten.
- Die Probenentnahmeverrichtung darf vor der Denaturierung nicht entfernt werden.
- Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse ist es wichtig, dass das gesamte Kalibrator-, Qualitätskontroll- und STM-Probenmaterial mit dem Denaturierungsreagenz in Berührung kommt. Ein weiterer kritischer Schritt ist das Mischen nach Zufügen von Denaturierungsreagenz: **Es ist darauf zu achten, dass der Multi-Specimen Tube Vortexer 2 auf 100 (maximale Geschwindigkeit) eingestellt ist und während des Mischens ein sichtbarer Flüssigkeitswirbel beobachtet wird, so dass die Flüssigkeit die gesamte Innenfläche des Röhrchens bespült. Bei Durchführung von manuellem Vermischen auf dem Vortexer sicherstellen, dass jeder Kalibrator, jede Qualitätskontrolle und jede Probe jeweils mindestens 5 Sekunden bei voller Geschwindigkeit des Vortexers individuell vermischt wird, so dass der Flüssigkeitswirbel die gesamte Innenfläche des Röhrchens bespült, gefolgt von einmaligem Umdrehen des Röhrchens.**

Verfahren zur Vorbereitung von Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Proben

1. Die Verschlussdeckel von den Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Probenröhrchen abnehmen und verwerfen.

Hinweis: Von Probenröhrchen entfernte Verschlusskappen sind als potentiell infektiös zu betrachten. Sie sind gemäß den nationalen/lokalen Bestimmungen zu entsorgen.

2. Das Denaturierungsreagenz mit dem Indikatorfarbstoff mit einem Direktverdrängungssystem- oder einstellbaren Dispenser in jeden Kalibrator, jede Qualitätskontrolle oder STM-Probe pipettieren. Darauf achten, dass die Seiten des Röhrchens nicht berührt werden, um das Auftreten einer Kreuzkontamination von Proben zu verhindern. Das Volumen benötigtes Denaturierungsreagenz entspricht der Hälfte des Probenvolumens. Das genaue Volumen für jeden Kalibrator-, Qualitätskontroll- und Probentyp ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Das restliche Denaturierungsreagenz in der Flasche vor der Entsorgung gemäß nationaler/lokaler Laborverfahren verdünnen.

Kalibrator, Qualitätskontrolle oder Probe	Erforderliches Volumen Denaturierungsreagenz
Negativkalibrator	1.000 µl
Low-Risk- oder High-Risk-HPV-Kalibrator	500 µl
Low-Risk- oder High-Risk- Qualitätskontrollen	500 µl
Zervixprobe	500 µl

3. Die Proben unter Verwendung eines der beiden nachstehenden Verfahren mischen.

Verfahren mit Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Hinweis: Mit dem MST-Vortexer 2 gemischte Proben des *digene* HC2 DNA Collection Device **müssen** unter Verwendung des Verfahrens mit Mikrotiterplatten zur Hybridisierung und dem Mikrotiterplatten-Inkubator I hybridisiert werden.

- a) Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Probenröhrchen mit DuraSeal-Verschlußfolie abdecken, indem die Folie über die Röhrchen in dem Gestell gezogen wird.
- b) Die Gestellabdeckung über die mit Folie abgedeckten Röhrchen bringen und mit den beiden Seitenclips sicher befestigen. Die Folie mit der Schneidevorrichtung zurechtschneiden.
- c) Das Gestell auf den Multi-Specimen Tube Vortexer 2 stellen und mit der Klemme befestigen. Verifizieren, dass sich die Geschwindigkeitseinstellung bei 100 (maximale Geschwindigkeit) befindet und der Vortexer EIN geschaltet ist. Die Röhrchen 10 Sekunden auf dem Vortexer vermischen.

Manuelles Vortex-Verfahren für individuelle Röhrchen

- a) Die Kontrollen, Qualitätskontrollen und STM-Probenröhrchen mit sauberen Schraubdeckeln für die Probenentnahmeröhrchen wieder verschließen.
- b) Jedes Röhrchen individuell auf dem Vortexer für 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit gründlich vermischen.
- c) Jedes Probenröhrchen zum Bespülen der Innenseite des Röhrchens, des Verschlussdeckels und des Randes einmal umdrehen.
- d) Das Röhrchen wieder in das Gestell bringen.

Unabhängig von dem verwendeten Vortex-Verfahren **muss ein sichtbarer Flüssigkeitswirbel auf der Innenseite jedes Röhrchens während des Mischens sichtbar sein, so dass die Flüssigkeit die gesamte Innenfläche des Röhrchens bespült**. Die Farbe der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollte nach purpurrot umschlagen.

4. Die Röhrchen in dem Gestell bei 65 ± 2 °C im Wasserbad für 45 ± 5 Minuten inkubieren (denaturierte Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben können sofort getestet oder gelagert werden, wie in den vorstehenden Hinweisen beschrieben). HPV-Sondengemisch(e) während dieser Inkubation vorbereiten. Siehe Abschnitt *Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien*.

Verfahren zur Probenvorbereitung mit PreservCyt Solution

Hinweis:

- Entnehmen Sie alle Einzelheiten der *digene* HC2 Sample Conversion Kit Gebrauchsanweisung.
- Die Verarbeitung eines 4-ml-Aliquots der PreservCyt Solution ergibt genug Lösung für zwei Tests, wenn manuell getestet wird. 4 ml ist das kleinste Volumen, das verarbeitet werden kann.
- Proben in PreservCyt Solution in Chargen von 36 oder weniger zubereiten; sonst können sich die Pellets beim Abdekantieren des Überstands ablösen. Dies ist wichtig, damit beim Abdekantieren die Integrität des Zellpellets erhalten bleibt. Mit der Vorbereitung zusätzlicher Röhrchen mit PreservCyt Solution erst dann beginnen, wenn die Vorbereitung der ersten Charge beendet ist.

Vorbereitung der Reagenzien

Verwenden Sie entweder das mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test mitgelieferte Denaturierungsreagenz (DNR) (siehe *Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien*) oder das mit dem *digene* HC2 Sample Conversion Kit mitgelieferte DNR. Zur Vorbereitung des mit dem *digene* HC2 Sample Conversion Kit mitgelieferten DNR 3 Tropfen Indikatorfarbstoff in die Flasche mit DNR geben und gründlich mischen. Die Flüssigkeit sollte eine gleichmäßige, dunkle purpurrote Farbe aufweisen. Erforderliches Volumen mithilfe von Tabelle 1 bestimmen.

Tabelle 1
Erforderliche Volumen: Vorbereitung der Reagenzien

Anzahl Tests	Volumen PreservCyt Solution	Volumen Konversionspuffer
1 bis 2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Ein *digene* HC2 Sample Conversion Röhrchen, ein konisches 10-ml-Sarstedt-Röhrchen oder ein 15-ml-Röhrchen von VWR oder Corning mit der entsprechenden Probenidentifikationsnummer kennzeichnen.
2. Nur eine Probe auf einmal verarbeiten:
 - a. PreservCyt-Fläschchen kräftig von Hand schütteln, bis die Zellen homogen verteilt sind.
 - b. Da sich die Zellen schnell absetzen, sofort das entsprechende Volumen der PreservCyt-Probe in das beschriftete Röhrchen pipettieren. Die PreservCyt Solution ganz unten in das konische Röhrchen geben, damit möglichst wenig Zellmaterial an den Innenwänden haften bleibt.
3. Jedem Röhrchen das entsprechende Volumen Probenkonversionspuffer zufügen (siehe Tabelle 1).
4. Röhrchen wieder verschließen und den Inhalt mit einem Vortexmischer mit Zusatzschale mischen.
Hinweis: Das Verfahren mit dem MST-Vortexer 2 wurde nicht zum Vermischen von Proben in PreservCyt Solution mit Probenkonversionspuffer vor der Zentrifugation validiert und darf daher für diesen Schritt nicht benutzt werden.
5. Röhrchen im Ausschwingrotor 15 ± 2 Minuten bei $2.900 \pm 150 \times g$ zentrifugieren.
6. Während der Zentrifugation Mischung aus Probentransportmedium und Denaturierungsreagenz (STM/DNR) gemäß Tabelle 2 im Verhältnis 2:1 vorbereiten.

Hinweis: Die STM/DNR-Mischung muss an jedem Testtag frisch zubereitet werden.

- a. Zur Berechnung des Gesamtvolumens der benötigten STM/DNR-Mischung Ausgangsvolumen der Probe in PreservCyt Solution als Anhaltspunkt nehmen und dann die STM- und DNR-Volumen „pro Röhrchen“ mit der Anzahl der zu testenden Proben multiplizieren (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2
Erforderliche Volumen: STM/DNR

Anzahl Tests	Volumen PreservCyt Solution	STM-Volumen pro Röhrchen für endgültige STM/DNR-Mischung*	DNR-Volumen pro Röhrchen für endgültige STM/DNR-Mischung*	Ins Röhrchen gegebene STM/DNR-Mischung
1 bis 2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* Die in diesen Spalten aufgeführten Volumen dürfen dem Probenröhrchen nicht direkt zugegeben werden.

- b. Lösung mit dem Vortexer gründlich vermischen.

7. Röhrrchen einzeln aus der Zentrifuge nehmen und in einen Halter oder ein Konversionsgestell stellen. In jedem Röhrrchen sollte am Boden ein pink-/orangefarbenes Pellet zu sehen sein.
Hinweis: Proben, die nach dem Zentrifugieren kein sichtbares Pellet aufweisen, können nicht für den Test verwendet und müssen verworfen werden.
8. Individuelle Handhabung der Proben:
 - a. Verschlusskappe entfernen und auf ein sauberes, fusselfreies Papiertuch legen.
 - b. Überstand sorgfältig abdekantieren.
 - c. Röhrrchen in umgekehrter Position halten und vorsichtig (ungefähr sechsmal) auf absorbierenden, fusselfreien Papiertüchern abtupfen, bis keine Flüssigkeit mehr aus dem Röhrrchen tropft. Jedes Mal eine saubere Stelle auf dem Papiertuch benutzen. Das Pellet **darf nicht** beim Abtupfen im Röhrrchen herabrutschen.
Hinweis:
 - Nicht mehrmals auf dieselbe Stelle des absorbierenden, fusselfreien Papiertuchs tupfen.
 - Es ist wichtig, dass die höchstmögliche Menge an PreservCyt Solution durch Abtupfen entfernt wird. Es ist jedoch normal, wenn nach dem Abtupfen noch ein Rest PreservCyt Solution zu sehen ist.
 - d. Röhrrchen in einen Halter oder ins Konversionsgestell stellen.

MISCHEN UND DENATURIEREN

Manuelles Vortex-Verfahren

1. Zu jedem Pellet entsprechendes Volumen STM/DNR-Lösung hinzugeben (siehe Tabelle 2). Jedes Röhrrchen wieder verschließen und einzeln auf dem Vortexer mindestens 30 Sekunden lang auf der höchsten Geschwindigkeitsstufe erneut suspendieren. Wenn sich ein Pellet schwer suspendieren lässt, nochmals für 10 bis 30 Sekunden mischen oder solange, bis das Pellet vom Röhrrchenboden aufschwimmt. Wenn sich das Pellet nach erneutem Mischen auf dem Vortexer (insgesamt maximal 2 Minuten) immer noch nicht auflöst, Probenkennnummer notieren und zum nächsten Schritt übergehen.
2. Röhrrchen in ein Gestell stellen.
3. Gestell für 15 ± 2 Minuten in ein 65 ± 2 °C warmes Wasserbad stellen. Dabei ist darauf zu achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in den Röhrrchen ausreichend ist.
4. Gestell mit Proben aus dem Wasserbad nehmen und Proben einzeln auf dem Vortexer für 15 bis 30 Sekunden mischen.
Hinweis: Überprüfen, dass zu diesem Zeitpunkt alle Pellets vollständig resuspendiert sind. Proben, die noch immer sichtbare Pellets aufweisen, sind für den Test ungeeignet und müssen verworfen werden.
5. Gestell in das 65 ± 2 °C warme Wasserbad zurückstellen und Denaturierung für weitere 30 ± 3 Minuten fortsetzen.
6. Mit dem Schritt *Hybridisierung* fortfahren, oder siehe *Optionaler Haltepunkt* über Lagerung und Behandlung denaturierter Proben.

Verfahren mit Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Hinweis:

- Das Verfahren mit einem Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 ist für die Behandlung von Proben in PreservCyt Solution nach dem Zentrifugieren und Abdekantieren des Überstands validiert.
- Für die Behandlung von Proben in PreservCyt Solution ist nur der MST-Vortexer 2 geeignet.

- Das Konversionsgestell und der Deckel wurden speziell zur Aufnahme von *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (konische 15-ml-Probenkonversionsröhrchen von VWR oder Corning) entwickelt. Der Nutzer sollte nur einen Röhrchentyp zur selben Zeit im Konversionsgestell verwenden. Andere Marken wurden nicht für die Verwendung validiert.
- Die spezifizierten Mischzeiten für Konversionsgestell und Deckel sind genau einzuhalten.
- Konversionsgestell und Deckel dürfen nicht zum Mischen der Kalibratoren oder Qualitätskontrollen des *digene* HC2 DNA Test Kits verwendet werden. Beim Gebrauch von Konversionsgestell und Deckel verhindert die Höhe der STM-Röhrchen ein adäquates Vermischen.

1. Jedes gekennzeichnete konische 15-ml-Röhrchen abtupfen und dann an seine Position ins Konversionsgestell stellen.
2. Zu jedem Pellet das richtige Volumen STM/DNR-Mischung hinzufügen (Tabelle 2).
3. Die konischen 15-ml-Röhrchen mit DuraSeal-Verschlussfolie abdecken, indem die Folie über die Röhrchen in dem Gestell gezogen wird.
4. Die Gestellabdeckung über die mit Folie abgedeckten Röhrchen bringen und mit den beiden Seitenclips sicher befestigen. Die Folie mithilfe der Schneidevorrichtung zurechtschneiden, nachdem die Abdeckung sicher befestigt wurde.
5. Den roten Hebel in die waagerechte Position bringen.
6. Konversionsgestell und Deckel auf den MST-Vortexer 2 stellen, so dass sich die größte abgeschrägte Ecke des Konversionsgestells in der vorderen rechten Ecke befindet. Gestell und Abdeckung so auf der Plattform des MST-Vortexer 2 positionieren, dass es sicher in den Schienen sitzt. Gestell befestigen, indem der rote Hebel nach unten in die senkrechte Position bewegt wird. Dadurch wird das Gestell festgehalten.
7. Vergewissern Sie sich, dass die Geschwindigkeit auf 100 (maximale Geschwindigkeit) eingestellt ist und der Pulser AUS geschaltet ist.
8. Schalten Sie den Vortexer EIN. **Die Röhrchen 30 Sekunden auf dem Vortexer vermischen.**
9. Schalten Sie den Vortexer AUS.
10. Entfernen Sie Konversionsgestell und Deckel vom MST-Vortexer 2, indem Sie den roten Hebel anheben.
11. Das Gestell bei 65 ± 2 °C im Wasserbad für 15 ± 2 Minuten inkubieren. Dabei ist darauf zu achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in den Röhrchen ausreichend ist.
12. Nach 15 Minuten Inkubation das Gestell mit den Röhrchen aus dem Wasserbad nehmen.
13. Zur Vermeidung von Spritzern überschüssiges Wasser am Gestell abtrocknen, bevor dieses auf den MST-Vortexer 2 gestellt wird.
14. Konversionsgestell und Deckel auf dem MST-Vortexer 2 befestigen, wie in *Schritt 6* beschrieben.
15. Vergewissern Sie sich, dass die Geschwindigkeit auf 100 (maximale Geschwindigkeit) eingestellt ist, und schalten Sie den Vortexer EIN. **Die Röhrchen 1 Minute lang auf dem Vortexer vermischen.**
16. Schalten Sie den Vortexer AUS.

Hinweis: Bei dem Verfahren mit dem MST-Vortexer 2 sind Geschwindigkeit, Zeiten und Verfahren des Vermischens standardisiert. Daher ist keine visuelle Kontrolle auf Zellpellets erforderlich, wie es beim manuellen Vortex-Verfahren notwendig ist.
17. Stellen Sie das Gestell erneut ins Wasserbad und setzen Sie die Denaturierung bei 65 ± 2 °C für 30 ± 3 Minuten fort.
18. Gestell aus dem Wasserbad nehmen, abtrocknen und auf dem Vortexer befestigen.
19. Schalten Sie den Vortexer EIN. **10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit auf dem Vortexer vermischen.**
20. Schalten Sie den Vortexer AUS. Gestell entfernen.
21. Sofort Gestellabdeckung abnehmen und DuraSeal-Verschlussfolie von den Proben entfernen.

22. Mit dem Schritt *Hybridisierung* fortfahren, oder siehe *Optionaler Haltepunkt* über Lagerung und Behandlung denaturierter Proben.

Vorbereitungsverfahren für Proben in SurePath (NUR für High-Risk-HPV DNA-Tests)

Nach zytologischem Verfahren folgendermaßen vorgehen:

1. Stellen Sie sicher, dass das beobachtete Flüssigkeitsvolumen gleich 2,8 ml ist.

VORSICHT: Wenn der Zellpelletrest weniger als 1 ml Flüssigkeit enthält, ist es möglich, dass nach der zytologischen Vorbereitung keine SurePath Preservative Fluid hinzugefügt wurde. In diesem Fall ist die Probe NICHT geeignet für einen High-Risk-HPV-DNA-Test.

2. Darauf achten, dass die Proben auf Raumtemperatur äquilibriert sind.
3. Die Probe im Ausschwingrotor 10 ± 1 Minuten bei $800 \pm 15 \times g$ zentrifugieren.
4. Die Röhrchen aus der Zentrifuge nehmen.
5. Den Überstand sofort nach der Zentrifugation sorgfältig abdekantieren und Röhrchen vorsichtig (ungefähr dreimal) auf absorbierenden, fusselreien Papiertüchern abtupfen, bis keine Flüssigkeit mehr aus dem Röhrchen tropft. In jedem Röhrchen sollte ein Pellet zu sehen sein. **Das Pellet darf nicht beim Abtupfen im Röhrchen herabrutschen.**
6. Die Röhrchen in den Halter stellen.
7. Zu jedem Pellet 200 µl STM mit einem Direktverdrängungssystem- oder einstellbaren Dispenser hinzugeben.

Hinweis: Die Röhrchen können ohne Verschlusskappe vermischt werden.

8. Jedes Röhrchen einzeln 15 Sekunden lang bei hoher Geschwindigkeit des Vortexers erneut suspendieren. Wenn sich ein Pellet schwer suspendieren lässt, nochmals 5 bis 30 Sekunden auf dem Vortexer vermischen oder solange, bis das Pellet vom Röhrchenboden aufschwimmt und sich auflösen scheint.
9. In jede Probe mit einem Direktverdrängungssystem- oder einstellbaren Dispenser 100 µl vorbereitetes Denaturierungsreagenz (mit Indikatorfarbstoff) pipettieren.

VORSICHT: Darauf achten, dass die Seiten des Röhrchens nicht berührt werden, um das Auftreten einer Kreuzkontamination von Proben zu verhindern.

Beim Entsorgen von restlichem Denaturierungsreagenz zutreffende nationale und lokale Vorschriften für die Entsorgung korrosiver Stoffe befolgen.

10. Jedes Röhrchen einzeln für 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit des Vortexers gründlich vermischen.

Hinweis: Die Röhrchen können ohne Verschlusskappe vermischt werden.

Das konische 15-ml-Röhrchen mit der entsprechenden Probenidentifizierung kennzeichnen (beispielsweise „SP“ für den Probenotyp in SurePath) und in den Halter zurückstellen.

Hinweis: Bei Verwendung des Rapid Capture Systems zur halbautomatischen Assay-Verarbeitung müssen konische 15-ml-Röhrchen von VWR oder Corning verwendet werden, um eine korrekte Platzierung im *digene* Conversion Rack (silbernes Gestell) zu gewährleisten.

11. Das Volumen des gesamten Röhrchens mit einer 7-ml-Transferringpipette mit Einmal-Standardspitze (oder einer entsprechenden Pipette) in ein konisches 15-ml-Röhrchen mit Schraubdeckel transferieren¹.
12. Die konischen 15-ml-Röhrchen verschließen.
13. Im Wasserbad bei 65 ± 2 °C für 90 ± 5 Minuten inkubieren.

¹ Bei den Verifizierungstest von QIAGEN wurden konische 15-ml-Röhrchen von VWR verwendet.

VORSICHT: Diese Inkubationszeit ist länger als die für andere genehmigte Proben typen erforderliche Inkubationszeit.

14. Wenn die HPV-Tests am gleichen Tag beendet werden, die *digene* HC2 DNA Test Kalibratoren gemäß dieser Gebrauchsanweisung denaturieren.
15. Probengestell aus dem Wasserbad nehmen.

Optionaler Haltepunkt

Nach der Denaturierung können STM-Proben und konvertierte Proben in PreservCyt oder SurePath bei 2 bis 8 °C über Nacht oder bei -20 °C bis zu drei Monaten aufbewahrt werden. Über Nacht können die Proben im Konversionsgestell gekühlt werden. Die DuraSeal-Verschlussfolie und die Abdeckung müssen dann wieder angebracht werden. Vor der Lagerung bei -20 °C müssen die Gestellabdeckung und die DuraSeal-Verschlussfolie entfernt und die Röhrchen mit Deckeln verschlossen werden. In beiden Fällen müssen die Proben vor dem Hybridisierungsschritt auf Raumtemperatur (20 bis 25 °C) äquilibriert und sorgfältig auf dem Vortexer gemischt werden.

Hinweis: Denaturierte Proben nicht auf Trockeneis aufbewahren oder versenden.

Maximal drei Einfrier-/Auftauzyklen mit maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur pro Auftauzyklus dürfen durchgeführt werden.

HYBRIDISIERUNG: KOMBINATIONSSONDEN-COCKTAIL-(CPC)- UND DUAL-SONDENVERFAHREN

Hinweis:

- HPV-Sondenmischungen sind viskos. Auf gründliches Mischen achten und darauf, dass in jede Mikrotiterplatten-Vertiefung die erforderliche Menge vollständig abgegeben wird. Siehe Abschnitt *Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien*.
- Wenn die denaturierte Probe bei -20 °C gelagert wurde, muss sie zum Auftauen auf 20 bis 25 °C gebracht und vor der Hybridisierung gründlich auf dem Vortexer vermischt werden.
- Den Mikrotiterplatten-Inkubator I für mindestens 60 Minuten vor Gebrauch auf 65 ±2° C vorwärmen. Weitere Einzelheiten sind gegebenenfalls im *Microplate Heater I Benutzerhandbuch* zu finden.

Hybridisierungsverfahren mittels Hybridisierungsplatte und Mikrotiterplatten-Inkubator I

Hinweis: Mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device in STM entnommene und mit dem Verfahren mit MST-Vortexer 2 verarbeitete Proben dürfen **nur** mit dem Verfahren mit Mikrotiterplatten-Inkubator I hybridisiert werden.

1. Eine Mikrotiterplatte zur Hybridisierung kennzeichnen und bereitstellen.
2. Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben nach der Inkubation aus dem Wasserbad nehmen. Bei Verwendung des Multi-Specimen Tube Vortexers 2 das gesamte Gestell mit den Proben in STM mindestens 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeitseinstellung vermischen. Wenn sich die Proben in PreservCyt Solution oder in SurePath befinden, das gesamte Konversionsgestell mindestens 10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeitseinstellung des Vortexers vermischen. Als Alternative kann jedes Röhrchen mindestens 5 Sekunden lang einzeln auf dem Vortexer vermischt werden.
3. Jeweils 75 µl Kalibrator, Qualitätskontrolle oder Probe unter Beachtung der unter *Vorbereitung* erstellten Plattenanordnung unten auf den **Boden** der Vertiefung der leeren Mikrotiterplatte zur Hybridisierung pipettieren. Dabei nicht die Seiten der Vertiefungen berühren und möglichst die Bildung von Luftbläschen verhindern. Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination von Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder Proben für jede Überführung eine saubere, extralange Pipettenspitze verwenden. Das Entfernen der Probenentnahmevorrichtung aus dem

Probentransportröhrchen ist nicht notwendig. Denaturierte Proben können mit den Schraubdeckeln für die Probenentnahmeröhrchen verschlossen und mit den in den Röhrchen verbleibenden Probenentnahmeverrichtungen gelagert werden. Denaturierte Proben in PreservCyt können mit ihren Originaldeckeln wieder verschlossen werden.

Hinweis: Falsch-positive Ergebnisse können auftreten, wenn die Probenaliquote nicht sorgfältig überführt werden. Während der Probenüberführung darf die Pipette bei der Entnahme des 75- μ l-Aliquots die Innenseite des Röhrchens nicht berühren.

4. Nach dem Überführen der letzten Probe die Platte mit einer Plattenabdeckung verschließen und die **Mikrotiterplatte zur Hybridisierung 10 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren**.
5. Das vorbereitete und mit einem Vortexer gründlich vermischte Sondengemisch in einen Einmal-Reagenzbehälter aliquotieren. Mit einem 8-Kanal-Dispenser und frischen Spitzen für jede Zeile in jeweils jede die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben enthaltende Vertiefung sorgfältig 25 μ l des Sondengemischs pipettieren. In jede Vertiefung zur Hybridisierung ohne Verspritzen das Sondenvolumen abgeben. Dabei dürfen die Seiten der Vertiefungen nicht berührt werden. Während der Denaturierungsinkubation die Mikrotiterplatte mit dem Plattendeckel abdecken.
6. Die Mikrotiterplatte zur Hybridisierung mit einem Plattendeckel abdecken und auf einem auf 1.100 \pm 100 U/min eingestellten Kreisschüttler I für das Hybrid Capture System für 3 \pm 2 Minuten schütteln. *Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollten nach dem Schütteln nach gelb umschlagen.* Vertiefungen, die purpurrot bleiben, haben nicht die vorschriftsmäßige Menge des Sondengemischs erhalten. Den purpurrot gebliebenen Proben zusätzliche 25 μ l Sondengemisch zufügen und erneut schütteln. Wenn die Vertiefungen nach diesem Verfahrens purpurrot bleiben, müssen die Proben erneut getestet werden.

Hinweis:

- Nach dem Schütteln sollten die Proben in PreservCyt Solution nach rosa statt nach gelb umschlagen.
 - Wenn die Mikrotiterplatte zur Hybridisierung in den Mikrotiterplatten-Inkubator I gebracht wird, ist darauf zu achten, dass kein Material verspritzt wird.
7. In einem auf 65 \pm 2 °C vorgewärmten und äquilibrierten Mikrotiterplatten-Inkubator I für 60 \pm 5 Minuten inkubieren.

Hybridisierungsverfahren mittels Mikroröhrchen und Wasserbad

Hinweis:

- Die Verarbeitung von mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device in STM entnommenen Proben mit dem Verfahren mit MST-Vortexer 2 zum Vermischen und mit dem Wasserbadverfahren zur Hybridisierung **wurde nicht validiert**. Mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device in STM entnommene und mit dem Verfahren mit MST-Vortexer 2 verarbeitete Proben dürfen **nur** mit dem Verfahren mit Mikrotiterplatten-Inkubator I hybridisiert werden.
 - Wenn die denaturierte Probe bei -20 °C gelagert wurde, muss die Probe auf 20 bis 25 °C aufgetaut und auf dem Vortexer gründlich vermischt werden, bevor die Hybridisierung begonnen wird.
1. Die erforderliche Anzahl sauberer Mikroröhrchen für die Hybridisierung kennzeichnen und in das Mikroröhrchengestell geben.
 2. Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben nach der Inkubation aus dem Wasserbad nehmen. Jedes Röhrchen unmittelbar vor der Entnahme von Aliquoten individuell mindestens 5 Sekunden lang im Vortexer vermischen.
 3. Jeweils 75 μ l Kalibrator, Qualitätskontrolle oder Probe unter Beachtung der unter Vorbereitung erstellten Plattenanordnung unten auf den **Boden** des leeren Mikroröhrchens zur Hybridisierung pipettieren. Dabei die Seiten des Mikroröhrchens nicht berühren und die Bildung von

Luftbläschen möglichst verhindern. Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination von Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder Proben für jede Überführung eine saubere, extralange Pipettenspitze verwenden. Das Entfernen der Probenentnahmeverrichtung aus dem Probentransportröhrchen ist nicht notwendig. Denaturierte Proben können mit den Schraubdeckeln für die Probenentnahmeröhrchen verschlossen und mit den in den Röhrchen verbleibenden Probenentnahmeverrichtungen gelagert werden.

Hinweis: Falsch-positive Ergebnisse können auftreten, wenn die Probenaliquote nicht sorgfältig überführt werden. Während der Probenüberführung darf die Pipette bei Entnahme des 75- μ l-Aliquots die Innenseite des Röhrchens nicht berühren.

4. Nach dem Überführen der letzten Probe die **Mikroröhrchen zur Hybridisierung 10 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren.**
5. Das vorbereitete und auf dem Vortexer gründlich vermischte Sondengemisch in einen Einmal-Reagenzbehälter aliquotieren. Mit einem 8-Kanal-Dispenser und frischen Spitzen für jede Zeile in jeweils jedes die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben enthaltendes Mikroröhrchen sorgfältig 25 μ l des Sondengemischs pipettieren. In jedes Mikroröhrchen zur Hybridisierung ohne Verspritzen das Sondenvolumen abgeben. Dabei dürfen die Seiten der Röhrchen nicht berührt werden. Das Gestell von unten prüfen, um sicherzustellen, dass alle Röhrchen die entsprechende Menge Sondengemisch erhalten haben.
6. Die Mikroröhrchen mit einer Plattenabdeckung abdecken. Die Gestellabdeckung oben auf das Gestell geben. Das Mikroröhrchengestell auf einem Kreisschüttler I bei 1.100 ± 100 U/min für 3 ± 2 Minuten schütteln. *Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollten nach dem Schütteln nach gelb umschlagen.* Röhrchen, die purpurrot bleiben, haben nicht die vorschriftsmäßige Menge des Sondengemischs erhalten. Den purpurrot gebliebenen Proben zusätzliche 25 μ l Sondengemisch zufügen und erneut schütteln. Wenn die Röhrchen nach diesem Verfahren purpurrot bleiben, müssen die Proben erneut getestet werden.
Hinweis: Nach dem Schütteln sollten die Proben in PreservCyt Solution nach rosa statt nach gelb umschlagen.
7. Im Wasserbad bei 65 ± 2 °C für 60 ± 5 Minuten inkubieren. Sicherstellen, dass der Wasserspiegel in dem Wasserbad zur Bedeckung des gesamten Volumens des Hybridisierungsgemischs ausreichend ist. Das Mikroröhrchengestell schwimmt dann im Wasserbad.

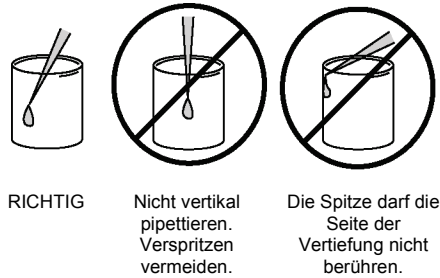
Hinweis: Mit der *digene* Assay-Analysesoftware eine Plattenanordnungsdatei erstellen, sofern dies nicht bereits früher vorgenommen wurde.

HYBRID CAPTURE

1. Alle anderen außer der erforderlichen Anzahl Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte aus dem Plattenrahmen herausnehmen. Nicht gebrauchte Vertiefungen der Mikrotiterplatte in den Originalbeutel zurückgeben und wieder verschließen. Die Spalten mit einem Markierungsstift mit 1, 2, 3 ... nummerieren. Die Mikrotiterplatte mit einem entsprechenden Kennzeichen beschriften. Die Proben werden den Vertiefungen nach der unter Vorbereitung erstellten beispielhaften Anordnung zugefügt.
2. Die Mikrotiterplatte zur Hybridisierung mit Kalibratoren, Kontrollen und Proben vorsichtig aus dem Mikrotiterplatten-Inkubator I nehmen. Sofort den Plattendeckel abnehmen und ihn auf eine saubere Oberfläche legen. Als Alternative wird das Mikroröhrchengestell aus dem Wasserbad genommen. Sofort die Abdeckung von dem Gestell nehmen und die Plattenabdeckung langsam nach oben vom Gestell abziehen.
3. Mit einem 8-Kanal-Dispenser den gesamten Inhalt (ca. 100 μ l) der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung oder Mikroröhrchen auf den Boden der entsprechenden Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte überführen. Für jede überführte Zeile sind auf dem 8-Kanal-Dispenser neue Pipettenspitzen zu verwenden, und jede Pipettenspitze muss zur Gewährleistung einer vollständigen Überführung

gut auslaufen. Gegebenenfalls kann der Dispenser ruhig gehalten werden, indem die **Mitte** der Pipettenspitzen gegen die obere Kante der Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte gelehnt wird (siehe *Abbildung 1*).

ABBILDUNG 1: RICHTIGES PIPETTIEREN



4. Die Capture-Mikrotiterplatte mit dem Plattendeckel oder der Plattenabdeckung abdecken und auf dem Kreisschüttler I bei 1.100 ± 100 U/min für 60 ± 5 Minuten bei 20 bis 25 °C schütteln.
5. Den Waschpuffer vorbereiten und die Spül- und Abwassertanks des automatischen Plattenspülers überprüfen. Siehe Abschnitt Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien.
6. Wenn der Capture-Schritt abgeschlossen ist, die Capture-Mikrotiterplatte aus dem Kreisschüttler I nehmen und den Plattendeckel oder die Plattenabdeckung vorsichtig entfernen. Die Flüssigkeit aus den Vertiefungen entfernen und sie im Ausguss wegspülen; die Platte über dem Ausguss umdrehen und mit einer Bewegung kräftig nach unten schütteln. Vorsichtig vorgehen, damit beim Dekantieren zu dicht am Ausgussboden kein Material zurück spritzt. **Die Platte umgedreht lassen**; auf sauberen Kimtowels-Wischtüchern oder entsprechenden fusselfreien Papiertüchern 2 bis 3 Mal kräftig abtupfen. Darauf achten, dass alle Flüssigkeit aus den Vertiefungen entfernt und die Oberseite der Platte trocken ist.

HYBRIDNACHWEIS

Hinweis:

- Alle Zugaben über die gesamte Platte mit einem 8-Kanal-Dispenser von links nach rechts vornehmen.
 - Zur besseren Konsistenz der Reagenzabgabe wird die reverse Pipettiertechnik empfohlen. Bei dieser Technik werden die Pipettenspitzen unter Verwendung des zweiten Anschlags an der Aspirier-/Abgabekontrolle (Kolben) initial überfüllt. Siehe nachstehendes Verfahren. Die Spitzen vor Abgabe auf die Platte an dem Einmal-Reagenzbehälter abstreifen.
 - Gegebenenfalls kann der Dispenser ruhig gehalten werden, indem die Mitte der Pipettenspitzen gegen die obere Kante der Vertiefungen der Mikrotiterplatten gelehnt wird. Darauf achten, dass die Seiten der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht berührt werden, weil andernfalls eine Kreuzkontamination der Proben auftreten kann. Bitte die vorstehende Abbildung 1 beachten.
1. Das entsprechende Volumen Nachweisreagenz 1 in einen Einmal-Reagenzbehälter aliquotieren (weitere Anweisungen sind dem Abschnitt *Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien* zu entnehmen). 75 µl Nachweisreagenz 1 mit einem 8-Kanal-Dispenser und der reversen Pipettiertechnik vorsichtig in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren.

Reverses Pipettierverfahren:

- a) Die Spitzen auf einen 8-Kanal-Dispenser setzen; sicherstellen, dass alle Spitzen fest aufsitzen.
- b) Den Dispenserkolben an dem ersten Anschlag vorbei auf den zweiten Anschlag schieben.
- c) Die Spitzen in das Nachweisreagenz 1 eintauchen.
- d) Den Kolben langsam freigeben und die Spitzen mit Flüssigkeit füllen.

- e) Die Lösung durch Drücken des Kolbens auf den ersten Anschlag in die Vertiefungen (75 µl) der Mikrotiterplatte abgeben. Den Kolben nicht freigegeben, bis die Pipettenspitzen erneut in das Nachweisreagenz 1 getaucht wurden.
 - f) Die Spitzen erneut füllen, und diesen Vorgang wiederholen, bis alle Vertiefungen gefüllt sind. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte von links nach rechts befüllen. Sicherstellen, dass alle Vertiefungen gefüllt wurden, indem die Intensität der rosa Farbe beobachtet wird. Alle Vertiefungen sollten eine ähnliche Intensität aufweisen.
2. Die Platten mit einem Plattendeckel oder sauberem Parafilm (oder einem ähnlichen Material) abdecken und für 30 bis 45 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren.

SPÜLEN

Die Capture-Platte nach einem der beiden nachstehenden Verfahren spülen.

Verfahren mit dem automatischen Plattenspüler

Hinweis: Den automatischen Plattenspüler immer **EIN** geschaltet lassen. Darauf achten, dass der Spülwassertank gefüllt und der Abwassertank leer ist. Der automatische Plattenspüler spült das System zu Reinigungszwecken routinemäßig. Weitere Anweisungen sind gegebenenfalls im Automated Plate Washer Benutzerhandbuch zu finden.

VOR JEDEM GEBRAUCH:

- Sicherstellen, dass der Wassertank mindestens bis zur 1-l-Marke mit Waschpufferlösung gefüllt ist. Wenn nicht, Waschpufferlösung vorbereiten. Siehe Abschnitt Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien.
- Sicherstellen, dass der Spülwassertank mit entionisiertem oder destilliertem Wasser gefüllt ist.
- Sicherstellen, dass der Abwassertank leer und der Verschlussdeckel sicher befestigt ist.
- Der automatische Plattenspüler füllt sich vor jedem Spülvorgang und entleert sich nach jedem Spülvorgang automatisch.

1. Den Plattendeckel abnehmen und die Platte auf die Plattform des automatischen Plattenspülers geben.
2. Sicherstellen, dass das Gerät eingeschaltet ist und auf der Anzeige „Digene Wash Ready“ oder „P1“ angezeigt wird.

Hinweis: Wenn nur ein Teil einer Reihe der Capture-Vertiefungen gebraucht wird, müssen die leeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte in die Capture-Platte gegeben werden, um die Reihe vor dem Spülen zu vervollständigen.

3. Die Zahl der zu spülenden Reihen durch Drücken der Taste „Rows“ (Zeilen) und dann „+“ oder „-“ zum Einstellen auswählen. Taste „Rows“ drücken, um zu „Digene Wash Ready“ oder „P1“ zurückzukehren.
4. Zum Beginn „Start/Stop“ drücken.
5. Der Spülapparat führt sechs Füll- und Absaugzyklen durch, was ca. 10 Minuten dauert. Während des Programmablaufs tritt eine kurze Pause ein; darauf achten, dass die Platte nicht zu früh entfernt wird. Wenn der automatische Plattenspüler das Spülen beendet hat, zeigt er „Digene Wash Ready“ oder „P1“ an.
6. Wenn der Programmablauf beendet ist, die Mikrotiterplatte aus dem Spüler nehmen. Die Platte sollte weiß aussehen, und es sollte keine rosa Flüssigkeit in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zurückbleiben.

Manuelles Spülverfahren

1. Das Nachweisreagenz 1 aus den Vertiefungen entfernen, indem saubere Kimtowels-Wischtücher oder entsprechende fusselfreie Papiertücher oben auf die Platte gelegt und die Platte vorsichtig umgedreht wird. Vor dem Umdrehen sicherstellen, dass sich das Papier mit der gesamten Oberfläche der Platte in Kontakt befindet. Die Platte für 1 bis 2 Minuten ablaufen lassen. Auf

sauberen Kimtowels-Wischtüchern oder entsprechenden fusselfreien Papiertüchern gut abtupfen. Die gebrauchten Papiertücher vorsichtig entsorgen, um eine Kontamination der späteren Schritte mit alkalischer Phosphatase zu vermeiden.

2. Die Platten unter Verwendung des Spülers 6 mal manuell spülen. Jede Vertiefung wird zur Entfernung von Nachweisreagenz 1 von den Oberseiten der Vertiefungen bis zum Überfließen gespült. Das Spülen beginnt bei Vertiefung A1 und wird in einer Schlangenlinie nach rechts und unten fortgesetzt. Nachdem alle Vertiefungen gefüllt wurden, die Flüssigkeit mit einer kräftigen Bewegung nach unten in den Ausguss dekantieren. Der zweite Spülvorgang beginnt bei Vertiefung H12 und verläuft in einer Schlangenlinie nach links und oben. Diese aus 2 Spülvorgängen bestehende Sequenz wird weitere zweimal für insgesamt 6 Spülvorgänge pro Vertiefung wiederholt.
3. Nach dem Spülen wird die Platte umgedreht auf sauberen Kimtowels-Wischtüchern oder entsprechenden fusselfreien Papiertüchern abgetupft und 3 bis 4 mal kräftig ausgeklopft. Die Papiertücher austauschen und erneut abtupfen. Die Platte umgedreht 5 Minuten lang ablaufen lassen. Die Platte nochmals abtupfen.
4. Die Platte sollte weiß aussehen, d. h. es sollte keine rosa Flüssigkeit in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zurückbleiben.

SIGNALVERSTÄRKUNG

HINWEIS:

- Zur Handhabung von Nachweisreagenz 2 ein neues Paar Handschuhe verwenden.
 - Zur Vermeidung einer Kontamination von Nachweisreagenz 2 **nur** die zur Durchführung des Assays erforderliche Reagenzmenge in den Einmal-Reagenzbehälter aliquotieren. Siehe den Abschnitt Vorbereitung der Reagenzien. Das Nachweisreagenz 2 darf nicht in die Originalflasche zurückgegeben werden. **Nicht aufgebrauchtes Material nach Gebrauch verwerfen.**
 - Die Zugabe von Nachweisreagenz 2 sollte ohne Unterbrechung erfolgen. Die Inkubationszeit aller Vertiefungen muss so nah wie möglich beieinander liegen.
 - Darauf achten, dass die Seiten der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht berührt werden oder Reagenz zurück auf die Spitzen gespritzt wird, da eine Kreuzkontamination der Proben auftreten kann (siehe *Abbildung 1*).
1. 75 µl Nachweisreagenz 2 mit einem 8-Kanal-Dispenser, wie zuvor beschrieben, sorgfältig in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. Alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte sollten in eine gelbe Farbe umschlagen. Sicherstellen, dass alle Vertiefungen gefüllt wurden, indem die Intensität der Farbe beobachtet wird. Alle Vertiefungen sollten eine ähnliche Intensität aufweisen.
 2. Die Mikrotiterplatten mit einem Plattendeckel oder sauberem Parafilm (oder entsprechendem Material) abdecken und für 15 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.
 3. Die Mikrotiterplatte nach 15 Minuten Inkubation (und nicht später als nach 30 Minuten Inkubation) auf dem DML-Instrument messen.
 4. Das Assay-spezifische Software-Protokoll ermöglicht die Eingabe relevanter Assay-Informationen direkt in die Software.
 5. Wenn keine volle Mikrotiterplatte verwendet wurde, die verwendeten Vertiefungen der Mikrotiterplatte aus dem Mikroplattenhalter entfernen, den Halter gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen, trocknen lassen und für den nächsten Assay bereithalten.

VERIFIKATIONSKRITERIEN FÜR DIE ASSAY-KALIBRIERUNG

Die Verifikation der Assay-Kalibration wird durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Reagenzien und bereitgestellten Kalibrator- und Qualitätskontrollmaterialien vorschriftsmäßig funktionieren und die genaue Ermittlung des Assay-Grenzwerts ermöglichen. Für den *digene* HC2 HPV DNA Test ist die Kalibration bei jedem Assay erforderlich. Deshalb ist es notwendig, jeden Assay unter Verwendung der folgenden Kriterien zu verifizieren. Dieses Verifikationsverfahren ist nicht als Ersatz der Tests der internen Qualitätskontrollen vorgesehen. Die Assay-Protokolle der *digene* Assay-Analysesoftware verifizieren die nachfolgenden Kriterien automatisch.

1. Negativkalibrator

Der Negativkalibrator muss bei jedem Assay als Dreifachbestimmung getestet werden. Um mit dem Test fortfahren zu können, muss der Mittelwert des Negativkalibrators ≥ 10 und ≤ 250 RLU betragen. Die von dem Negativkalibrator erhaltenen Ergebnisse sollten einen Variationskoeffizienten (VK (%)) von ≤ 25 % zeigen. Liegt der VK (%) bei > 25 , wird der RLU-Wert, der sich am weitesten von dem Mittelwert befindet, als ein Ausreißer verworfen und der Mittelwert unter Verwendung der beiden verbleibenden Werte erneut berechnet. Wenn der Unterschied zwischen dem Mittelwert und jedem der beiden Werte ≤ 25 % beträgt, mit Schritt 2 fortfahren. Andernfalls ist die Assay-Kalibration ungültig, und der Assay muss für alle Patientenproben wiederholt werden. In diesem Fall dürfen keine Patientenergebnisse berichtet werden.

2. Kalibratoren

Die Kalibratoren müssen bei jedem Assay als Dreifachbestimmung getestet werden. Für CPC müssen beide Kalibratoren als Dreifachbestimmung getestet werden. Die Kalibratorergebnisse sollten einen Variationskoeffizienten (VK (%)) von ≤ 15 % ergeben. Der VK (%) von LRC, HRC und LRC-HRC in Kombination muss für CPC einen VK (%) ≤ 15 % ergeben. Wenn der VK (%) > 15 ist, muss der Kalibratorwert mit einem am weitesten von dem Mittelwert liegenden RLU-Wert als ein Ausreißer verworfen und der Mittelwert unter Verwendung der verbleibenden Kalibratorwerte erneut berechnet werden. Es dürfen nur 1 LRC- und 1 HRC-Wert gelöscht werden. Wenn der VK (%) der Kalibratoren ≤ 15 % ist, mit Schritt 3 fortfahren. Andernfalls ist die Assay-Kalibration ungültig, und der Assay muss für alle Patientenproben wiederholt werden. In diesem Fall dürfen keine Patientenergebnisse berichtet werden.

Die oben beschriebene Assay-Kalibrationsverifikation für die Kalibratoren wird von der *digene* Assay-Analysesoftware automatisch durchgeführt und auf dem Datenanalysenbericht ausgedruckt. **Die *digene* Assay-Analyseprotokolle für HPV verifizieren automatisch, dass der VK (%) für Low-Risk- und High-Risk-HPV-Kalibratoren ≤ 15 % beträgt.** Die *digene* Assay-Analysesoftware der Versionen V1.0.2 und V1.0.3 macht den Assay jedoch NICHT ungültig, es sei denn, dass der VK (%) für die Kalibratoren > 25 % beträgt. Der Anwender muss deshalb manuell verifizieren, dass der durch die *digene* Assay-Analysesoftware berechnete VK (%) ≤ 15 % beträgt, und fortfahren, wie für Situation 1 in der nachstehenden Tabelle angegeben. Wenn der VK (%) der Kalibratorwerte zwischen 15 und 25 fällt, sind die Anweisungen für Situation 2 oder 3 in der nachstehenden Tabelle zu befolgen und mit der angegebenen „Anwenderaktion“ fortzufahren.

Situation	Berichteter VK (%) für die LRC- und/oder HRC-Werte	Aktion der <i>digene</i> Assay-Analysesoftware	Anwenderaktion
1	≤15 %	Assay als „gültig“ berichtet	Ergebnisse können berichtet werden; es ist keine weitere Aktion erforderlich.
2	Zwischen 15 % und 25 %	Keine Ausreißer verworfen und Assay als „gültig“ berichtet	Den am weitesten vom Mittelwert entfernt liegenden Kalibrator-RLU-Wert verwerfen. Den VK (%) des Kalibrators mit den beiden verbleibenden Werten erneut berechnen. Wenn der VK (%) der verbleibenden RLU-Werte >15 % ist, ist der Assay ungültig. Die Ergebnisse dürfen nicht berichtet werden. Wenn der VK (%) der verbleibenden RLU-Werte ≤15 % ist, den Assay-Grenzwert erneut berechnen und dann den Quotienten RLU/Grenzwert von jeder Probe mittels dieses Grenzwertes erneut berechnen. Diese erneut berechneten Werte können berichtet werden.
3	Zwischen 15 % und 25 %	Ein Ausreißer pro Kalibrator verworfen und Assay als „gültig“ berichtet	Der Assay ist ungültig. Die Ergebnisse dürfen nicht berichtet werden. Der Assay muss wiederholt werden.
4	>25 %	Ein Ausreißer verworfen und Assay als „ungültig“ berichtet	Der Assay ist ungültig. Die Ergebnisse dürfen nicht berichtet werden. Der Assay muss wiederholt werden.

Zur manuellen Berechnung des VK (%), wie in der vorstehenden Situation 2 erforderlich, sollte der Anwender die Standardabweichung (STDEV) (n-1) der verbleibenden RLU-Werte aus dem Wiederholungstest durch den Mittelwert der verbliebenen RLU-Werte (LRC oder HRC oder beide) aus dem Wiederholungstest dividieren und dieses Ergebnis mit 100 multiplizieren.

Zur Berechnung des VK (%) mit Microsoft® Excel® (mit der vorherigen Version der *digene* Assay-Analysesoftware mitgeliefert) kann der Anwender die Standardabweichung der Kalibratorwerte mit der Formel *STDEV* berechnen und den RLU-Mittelwert für den Kalibrator mit der Formel *AVERAGE* ermitteln. Wenn diese beiden Werte berechnet sind, die *STDEV* (Standardabweichung) durch den *AVERAGE* (Mittelwert) dividieren und das Ergebnis zum Erlangen des VK (%) mit 100 multiplizieren.

$$(STDEV/AVERAGE) * 100 = VK (\%)$$

Bei Fragen zur Berechnung des VK (%), der erneuten Berechnung des Assay-Grenzwertes oder der erneuten Berechnung des RLU/Grenzwertes der Proben setzen Sie sich bitte mit Ihrem lokalen QIAGEN-Vertreter in Verbindung.

Zur Ermittlung der Kalibrator-Reproduzierbarkeit und der Schätzung der Frequenz, mit der die manuellen Neuberechnungen erforderlich sein können, wurden die Ergebnisse aus drei klinischen Evaluationen der mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test durchgeführten 152 Assay-Durchläufen zusammengetragen. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass der durchschnittliche VK (%) für diese 152 Durchläufe 8,1 betrug. Unter Berücksichtigung aller drei Wiederholungstests des Kalibrators pro Testdurchlauf wurde eine Kalibrator-Reproduzierbarkeit des VK von >15 % für nur 17 der 152 Durchläufe (11,2 %) beobachtet, wobei 10 dieser 17 Testdurchläufe einen VK zwischen 15 und 25 % ergaben (Situation 2). Für die 17 Testdurchläufe, die einen VK von >15 % ergaben, wurde ein einzelner Ausreißer verworfen und der VK (%) erneut berechnet. Nach der Anwenderaktion für Situation 2 blieb nur ein VK für die Testdurchläufe >15 % und machte den Testdurchlauf folglich ungültig. Die VK (%) der übrigen 151 Testdurchläufe wurden mit einem durchschnittlichen VK von 6,0 % berechnet.

- Die Ergebnisse des Kalibratormittelwerts (LRC oder HRC) und des Mittelwerts des Negativkalibrators (NC) werden zur Berechnung des Quotienten LRC/NC oder HRC/NC für jede Sonde verwendet. Frühere Versionen (V1.0.2 und V1.0.3) der Protokolle der *digene* Assay-Analysesoftware berechneten die zulässigen Bereiche nicht korrekt. Bevor die Probenergebnisse

interpretiert werden können, müssen diese Quotienten den folgenden Kriterien zur Verifizierung der Assay-Kalibration entsprechen:

CPC-VERFAHREN	DUAL-SONDENVERFAHREN
Verifikation der Assay-Kalibration Zulässige Bereiche	Verifikation der Assay-Kalibration Zulässige Bereiche
$2,0 \leq \text{LRC}\bar{x} / \text{NC}\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq \text{LRC}\bar{x} / \text{NCLR}\bar{x} \leq 15$ (LR-Seite)
$2,0 \leq \text{HRC}\bar{x} / \text{NC}\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq \text{HRC}\bar{x} / \text{NCHR}\bar{x} \leq 15$ (HR-Seite)
$2,0 \leq (\text{LRC und HRC}) \bar{x} / \text{NC}\bar{x} \leq 15$	

4. Die entsprechenden Quotienten $\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$ oder $\text{HRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$ für jeden der Sonden-Sets berechnen. Wenn die Quotienten $\geq 2,0$ und ≤ 15 sind, mit dem nächsten Schritt fortfahren. Wenn einer der Quotienten $< 2,0$ oder > 15 ist, **ist der Assay für diese spezifische Sonde ungültig und muss wiederholt werden**. Alle Patientenproben in dem Durchlauf wiederholen.

Hinweis: Zulässige Bereiche für die Negativ- und Positivkalibratoren wurden nur für ein DML-Instrument ermittelt.

GRENZWERTBERECHNUNG

Wenn ein Assay nach den vorstehenden Kriterien validiert wurde, sind die Grenzwerte zur Bestimmung der positiven Proben wie folgt:

1) Kombinationssonden-Cocktail-Verfahren:
$$\frac{(\text{LRC-Wiederholungstests} + \text{HRC-Wiederholungstests})}{\text{Anzahl Wiederholungstests}}$$

2) Dual-Sondenverfahren:
$$\begin{aligned} \text{Low-Risk-HPV-Sondengrenzwert} &= \text{LRC}\bar{x} \\ \text{High-Risk-HPV-Sondengrenzwert} &= \text{HRC}\bar{x} \end{aligned}$$

Beispielhafte Grenzwertberechnungen					
für:		Low-Risk- oder High-Risk-HPV-Sonden Dual-Sondenverfahren	Low-Risk-HPV-Sonden-CPC-Verfahren	High-Risk-HPV-Sonde CPC-Verfahren	Kombinations-HPV-Sonden-CPC-Verfahren
	NC-RLU-Werte	LRC- oder HRC-RLU-Werte	LRC-RLU-Werte	HRC-RLU-Werte	LRC- und HRC-RLU-Werte
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Mittlerer RLU-Wert	96	318	340	287*	318,8*
VK (%)	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$	k. A.	3,31	3,54	3,00	3,32

Der mittlere RLU-Wert für den Positivkalibrator legt den Assay-Grenzwert fest. Deshalb ist der positive Grenzwert ($\text{LRC}\bar{x}$) = 318.

* Der Mittelwert des VK (%) von allen 6 Wiederholungstests betrug 16,8. Der Wiederholungstest mit einem Wert von 235 wurde als ein Ausreißer verworfen. Der VK (%) der verbleibenden Wiederholungstests lag bei 13,0 mit einem Mittelwert von 318,8. Der initiale VK (%) der HRC betrug 11,5.

Alle von den Proben erhaltenen RLU-Werte sollten in ein Verhältnis zu dem entsprechenden Grenzwert umgewandelt werden. So sollten zum Beispiel alle mit der Low-Risk-HPV-Sonde getesteten Assays als Proben-RLU/Low-Risk-Grenzwert ausgedrückt werden. Das Gleiche kann für mit der High-Risk-HPV-Sonde oder der CPC-Sonde getestete Proben durchgeführt werden.

Hinweis: Die RLU/CO-Werte und Positiv/Negativ-Ergebnisse für alle Proben werden in dem *Data Analysis Report (Datenanalysebericht)* des DML-Instruments berichtet.

Für die Rapid Capture System Geräteanwendung wurde das Protokoll der RCS HPV Software so programmiert, dass der mittlere RLU-Wert gültiger Wiederholungstests des Positivkalibrators durch einen Kalibrierungsanpassungsfaktor (Calibration Adjustment Factor, CAF) von 0,8 korrigiert wird. Dieser CAF ist notwendig, damit die Leistungsmerkmale des Assays denen des manuellen Testverfahrens entsprechen. Diese Änderung wird nur bei Assays eingesetzt, die mit dem Rapid Capture System Instrument durchgeführt wurden. Daher ist es entscheidend, für jedes spezifische Testverfahren das richtige Software-Protokoll auszuwählen, um genaue Testergebnisse zu erzielen. Alle RLU-Werte von Proben sollten in ein Verhältnis zu dem entsprechenden Grenzwert (Cutoff-Wert, CO-Wert) umgewandelt werden. So sollten zum Beispiel alle Assays als Proben-RLU/CO-Wert ausgedrückt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Qualitätskontrollproben werden mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test mitgeliefert. Nähere Anweisungen, wie die Chargen-Nummern und die Verfallsdaten der Qualitätskontrollen einzugeben sind, gehen aus dem entsprechenden Benutzerhandbuch hervor. Diese Qualitätskontrollen müssen bei jedem Testdurchlauf eingeschlossen werden, und der Wert RLU/CO jeder Qualitätskontrolle muss in die folgenden zulässigen Bereiche fallen, damit der Durchlauf als gültig eingestuft werden kann. **Wenn die Qualitätskontrollen nicht in diese Bereiche fallen, ist der Assay ungültig und muss wiederholt werden.** Demzufolge sollten für einen ungültigen Durchlauf keine Patientenergebnisse berichtet werden.

Qualitätskontrolle	HPV-Typ	Erwartetes Ergebnis (RLU/Grenzwert) Low-Risk-HPV-Sonde			
		Minimum	Maximum	Durchschnitt	VK (%)
QC1-LR	Low-Risk (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	High-Risk (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Qualitätskontrolle	HPV-Typ	Erwartetes Ergebnis (RLU/Grenzwert) High-Risk-HPV-Sonde			
		Minimum	Maximum	Durchschnitt	VK (%)
QC1-LR	Low-Risk (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	High-Risk (HPV 16)	2	8	5,0	25

Qualitätskontrolle	HPV-Typ	Erwartetes Ergebnis (RLU/Grenzwert) CPC-HPV-Sonde			
		Minimum	Maximum	Durchschnitt	VK (%)
QC1-LR	Low-Risk (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	High-Risk (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Die im Kit bereitgestellten Materialien zur Qualitätskontrolle sind klonierte HPV-DNA-Targets, die sich nicht von HPV des Wildtyps herleiten. Hierbei handelt es sich um das gleiche Material wie für die Kalibratoren verwendete Material, das mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test mitgeliefert wird.
2. Dieses Material zur Qualitätskontrolle ist keine geeignete Kontrolle für die Verarbeitung mit PreservCyt Solution oder SurePath Preservative Fluid.
3. Die mit diesem Testkit bereitgestellten Qualitätskontrollen sind für die interne Qualitätskontrolle zu verwenden. Zusätzliche Qualitätskontrollen können nach den Leitfäden oder Anforderungen der jeweiligen lokalen Vorschriften und/oder des Landes oder der Akkreditierungsorganisationen getestet werden.

INTERPRETATION DER PROBENERGEBNISSE

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

1. STM-Proben **nur mit der Low-Risk-HPV-Sonde** mit Quotienten RLU/Grenzwert $\geq 1,0$ werden für einen oder mehrere der HPV-Typen 6, 11, 42, 43 oder 44 als „positiv“ eingestuft.
2. STM-Proben **nur mit der High-Risk-HPV-Sonde** mit Quotienten RLU/Grenzwert $\geq 1,0$ werden für einen oder mehrere der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 als „positiv“ eingestuft.
3. Wenn beim Testen von Proben in PreservCyt der Quotient RLU/CO einer Probe $\geq 1,0$ und $< 2,5$ ist, empfiehlt QIAGEN, die Probe erneut zu testen. Wenn das Ergebnis des ersten Wiederholungstests positiv ist ($\geq 1,0$ RLU/CO), kann die Probe als positiv berichtet werden, und es sind keine weiteren Wiederholungstests erforderlich. Wenn aber das Ergebnis des ersten Wiederholungstests negativ ist ($< 1,0$), muss ein zweiter Wiederholungstest (drittes Ergebnis) durchgeführt werden, um das endgültige Ergebnis zu erzielen. Das Ergebnis des zweiten Wiederholungstests wird als Endergebnis betrachtet und ist zu berichten.
4. Wenn der Quotient RLU/Grenzwert einer Probe dicht bei aber unter 1,0 liegt und eine High-Risk-HPV-Infektion vermutet wird, sind alternative Testverfahren und/oder eine Wiederholungsprobe in Betracht zu ziehen.
5. STM-Proben mit RLU/Grenzwert-Quotienten $\geq 1,0$ sowohl für die Low-Risk-HPV-Sonde als auch High-Risk-HPV-Sonde, werden für einen oder mehrere HPV-Typen aus jeder Sondengruppe als „positiv“ eingestuft.
6. STM-Proben mit RLU/Grenzwert-Quotienten $\geq 1,0$ mit dem Kombinationssonden-Cocktail werden für einen oder mehrere der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 als positiv eingestuft.
7. Proben mit Quotienten RLU/Grenzwert $< 1,0$ für den Kombinationssonden-Cocktail oder sowohl Low-Risk-HPV-Sonde als auch High-Risk-HPV-Sonde werden für die 18 getesteten HPV-Typen als „negativ“ oder „keine HPV-DNA nachgewiesen“ eingestuft. HPV-DNA-Sequenzen liegen entweder nicht vor, oder die HPV-DNA-Spiegel liegen unter der Nachweisgrenze des Assays.

DATEN ZUR UNTERSTÜTZUNG DER LOW-RISK- UND HIGH-RISK-HPV-INDIKATION

Klinisches Screening von Patientinnen mit ASC-US-Pap-Abstrichergebnissen 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 unter dem Titel „Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears“ (Nützlichkeit von HPV-DNA-Tests für eine Triage von Frauen mit grenzwertigen Pap-Abstrichen) durchgeführt. Bei Frauen, die verschiedene klinische Kaiser-Einrichtungen aufsuchten, wurden Zervixproben für Routine-Pap-Abstriche und für den *digene* HC2 HPV DNA Test entnommen. Die Bewertung der initialen Pap-Abstriche erfolgte nach der Bethesda-Klassifikation. Die für das Screening auf ein Zervixkarzinom entsprechende Terminologie in der Europäischen Union ist in den European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening⁴⁰ (Europäische Leitlinien für Qualitätssicherung beim Screening auf ein Zervixkarzinom) einzusehen. Frauen (15 Jahre oder älter) mit Pap-Abstrichergebnissen von ASC-US (atypical cells of undetermined significance; atypischen Plattenepithelzellen unklarer Signifikanz) wurden zur Kolposkopie und Biopsie überwiesen. Kolposkopisch gewonnene histologische Proben wurden zur initialen Diagnosestellung von Pathologen untersucht. Jede histologische Probe wurde auch von einem unabhängigen Pathologen überprüft, und Diskrepanzen zwischen der initialen Prüfung und der unabhängigen Überprüfung wurden von einem dritten Pathologen abschließend beurteilt.

HPV-DNA-Tests wurden an der initialen Probe durchgeführt, und es wurde nur die High-Risk-HPV-Sonde verwendet. Die HPV-DNA-Tests wurden mit einem Prototyp des *digene* HC2 HPV DNA Tests durchgeführt, der Sonden für 11 der 13 HPV-Typen in der High-Risk-HPV-Sonde enthielt, aber keine Sonden für die HPV-Typen 59 und 68. Es ist nicht zu erwarten, dass dieser Unterschied zu signifikant unterschiedlichen Leistungsprofilen der beiden Assays führt.

HPV-Testergebnisse und histologische Diagnosen standen von 885 Frauen mit ASC-US-Pap-Abstrichen zur Verfügung. Die Tests an den meisten Patientinnen wurden mit Proben durchgeführt, die sowohl in STM als auch in PreservCyt Solution entnommen wurden. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Leistungsmerkmalen des *digene* HC2 HPV DNA Tests für die Medien STM und PreservCyt wird nur die Assay-Leistung für PreservCyt Solution präsentiert.

Tabelle 3 zeigt, dass unter den Frauen, die aufgrund von ASC-US im Pap-Abstrich überwiesen wurden, der negative Vorhersagewert des *digene* HC2 HPV DNA Tests für HSIL oder eine fortgeschrittenere Erkrankung bei der Kolposkopie 99 % beträgt.

Tabelle 3
***digene* HC2 HPV DNA Test im Vergleich zur Konsenshistologie bei einer Population mit Überweisung nach einem ASC-US-Pap Kaiser-Studie, Proben in PreservCyt Lösung**

	HSIL oder fortgeschrittenere Erkrankung zum Zeitpunkt der Kolposkopie			Insgesamt
		+	-	
High-Risk-HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Insgesamt	71	814	885

Sensitivität [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 95 % KI = 84,3 bis 97,7
 Spezifität [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 95 % KI = 57,7 bis 64,4
 Krankheitsprävalenz = 8,0 % (71/885)
 Positiver Assay-Vorhersagewert = 17,2 % (66/383)
 Negativer Assay-Vorhersagewert = 99,0 % (497/502)

Tabelle 4 zeigt theoretische positive und negative Vorhersagewerte basierend auf verschiedenen Prävalenzen für initiale ASC-US, von denen ermittelt wurde, dass es sich basierend auf den High-Risk-HPV-Sondenergebnissen um HSIL oder eine fortgeschrittenere Erkrankung handelt.

Tabelle 4
Theoretischer positiver und negativer Vorhersagewert
High-Risk-HPV-Sonde
ASC-US-Pap-Abstrichergebnisse

Theoretische Prävalenz für HSIL	Initiales ASC-US-Pap-Abstrichergebnis	
	Positiver Assay-Vorhersagewert	Negativer Assay-Vorhersagewert
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

Tabelle 5 zeigt die Variation zwischen den verschiedenen Altersgruppen in dieser Studie:

Tabelle 5
Kaiser-Studiendaten
Leistung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests im Vergleich zu Konsenshistologie
Ergebnisse (HSIL)
Altersspezifische Merkmale

	Alter <30	Alter 30 bis 39	Alter >39
n	287	233	365
Krankheitsprävalenz (%)	12,2	11,2	2,7
Sensitivität (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
Konfidenzintervall 95 %	90,0 bis 100	69,9 bis 97,6	44,4 bis 97,5
Spezifität (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
Konfidenzintervall 95 %	25,7 bis 37,5	59,3 bis 72,6	74,6 bis 83,3
Negativer Vorhersagewert (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Positiver Vorhersagewert (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Klinische Sensitivität und Spezifität für die Ermittlung des Risikos einer hochgradigen Erkrankung bei Frauen mit LSIL- oder HSIL-Pap-Abstrichen

Es wurde eine multizentrische klinische Studie unter Verwendung des *digene* HC2 HPV DNA Tests an Proben durchgeführt, die in mehreren großen Kolposkopiekliniken (3 Standorte) mit einer hohen Prävalenz zervikaler Erkrankungen und HPV im Westen und Süden der USA entnommen wurden. Der HPV-Test wurde an 3 Studienzentren durchgeführt, die nicht an die Kolposkopiekliniken, in denen die Proben entnommen wurden, angeschlossen waren. Die Population für diese klinische Studie bestand aus Frauen mit der Diagnose LSIL oder HSIL basierend auf einem kürzlich angefertigten Pap-Abstrich, die deshalb zur Kolposkopie überwiesen wurden. Bei den 702 in die Studie aufgenommenen Patientinnen waren 327 Pap-Abstrichergebnisse schwerwiegender als ASC-US, und die Patientinnen wurden angemessen informiert; 96 von ihnen wiesen einen Enderkrankungsstatus von HSIL oder schwerwiegender auf. Exfolierte Zervixzellproben wurden entweder mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommen und in STM gegeben oder mit einer besenartigen Vorrichtung entnommen und in PreservCyt Solution gespült. Die Proben wurden zum Zeitpunkt der Kolposkopie entnommen. Die Proben wurden mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test untersucht und die Ergebnisse mit dem für jede Patientin ermittelten Krankheitsstatus verglichen. Der Krankheitsstatus basierte auf den Ergebnissen der

histologischen Beurteilung. Wenn jedoch die Histologie negativ war oder kein histologisches Ergebnis vorlag, wurde der Krankheitsstatus mittels Zytologie zum Zeitpunkt der kolposkopischen Untersuchung bestimmt (siehe *Tabelle 6*). Der *digene* HC2 HPV DNA Test wurde an 3 großen medizinischen Zentren durchgeführt, die nicht an die Standorte angeschlossen waren, an denen die Proben anlässlich der Kolposkopie entnommen wurden. Die zytologischen Untersuchungen wurden in einem pathologischen Referenzlabor durchgeführt, und die histologischen Untersuchungen in den Einrichtungen durchgeführt, in denen die Kolposkopie erfolgte. Die Testergebnisse wurden zur Beurteilung der Sensitivität und der Spezifität des Tests sowie der negativen und positiven Vorhersagewerte zum Nachweis einer hochgradigen Zervixneoplasie mit dem Krankheitsstatus verglichen. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Leistungsmerkmalen des *digene* HC2 HPV DNA Tests für die Medien STM und PreservCyt wird nur die Assay-Leistung für PreservCyt Solution präsentiert.

In den Ergebnissen mit High-Risk-HPV-Sonden von Proben in STM und PreservCyt Solution wurde kein Unterschied festgestellt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse mit der High-Risk-HPV-Sonde in dieser Population:

Tabelle 6
Algorithmus des Krankheitsstatus der Patientinnen

Zytologieergebnis	Histologieergebnis	Krankheitsstatus
NEG	NEG oder nicht durchgeführt *	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Krebs	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	Nicht durchgeführt*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Krebs	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Nicht durchgeführt*	HSIL
Krebs	HSIL	HSIL
NEG	Krebs	HSIL+
LSIL	Krebs	HSIL+
HSIL	Krebs	HSIL+
Krebs	Nicht durchgeführt*	HSIL+
Krebs	Krebs	HSIL+

* Eine Biopsie und/oder endozervikale Kürettage (ECC) wurde nicht durchgeführt, weil bei der Kolposkopie keine Anomalien festgestellt wurden oder histologische Ergebnisse nicht zur Verfügung standen.

Tabellen 7 und 8 stellen die Leistung des *digene* HC2 HPV DNA Tests dar, die mit 327 Proben in PreservCyt bestimmt wurde, von denen 96 Proben bei Frauen entnommen wurden, die mit einer hochgradigen Zervixerkrankung diagnostiziert wurden. Die Vergleiche wurden an allen an der Studie teilnehmenden Patientinnen vorgenommen, die nach abnormen Pap-Abstrichergebnissen überwiesen wurden. Die Vergleiche werden für die mit der High-Risk-HPV-Sonde getesteten Proben in PreservCyt gezeigt.

Tabelle 7
Ergebnisse mit der High Risk-HPV-Sonde

Überweisung nach Pap-Abstrichergebnis	Endgültiger Krankheitsstatus						Gesamt
	HSIL		LSIL		Negativ		
High-Risk-HPV-Ergebnisse	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Gesamt	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Tabelle 8 zeigt, dass der *digene* HC2 HPV DNA Test bei Verwendung der High-Risk-HPV-Sonde eine Gesamtsensitivität von ca. 93 % für die Identifikation von Frauen mit einer hochgradigen Neoplasie in einer Population aufwies, die auf der Basis einer LSIL-, HSIL- oder ähnlichen Diagnose anhand des Pap-Abstriches zur Kolposkopie überwiesen wurde. Der Test zeigte außerdem einen negativen Vorhersagewert von nahezu 93 % bei dieser Population.

Tabelle 8
Leistungsmerkmale
***digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test unter Patientinnen, die mit einem Pap-Abstrich mit LSIL oder fortgeschrittener und einem Enderkrankungsstatus von HSIL überwiesen wurden**

High-Risk-HPV-Sondenergebnis	Überweisung nach Pap LSIL oder HSIL → HSIL-Erkrankung			Insgesamt
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Gesamt		96	231	327

Sensitivität $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)

95 % KI = 85,6 bis 97,0

Spezifität $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)

95 % KI = 33,1 bis 46,0

Krankheitsprävalenz von LSIL bis zur endgültigen HSIL bei Überweisung = 21,4 %

Krankheitsprävalenz von HSIL bis zur endgültigen HSIL bei Überweisung = 46,6 %

Positiver Gesamtvorhersagewert = 38,9 % (89/229)

Negativer Gesamtvorhersagewert = 92,8 % (91/98)

Obwohl die Spezifität des *digene* HC2 HPV DNA Tests etwas niedrig zu sein scheint, ist eine strikte Korrelation zwischen der Abwesenheit einer Neoplasie und einem negativen HPV-Ergebnis unerwartet. HPV-DNA kann bei Frauen vorliegen, bei denen sich keine hochgradige Erkrankung entwickelt hat. Wenn ein Test mit HPV-Polymerase-Kettenreaktion (HPV-PCR) (ein nur zu Forschungszwecken verwendeter Assay) an Proben mit positiven HPV-Ergebnissen, deren entsprechender Krankheitsstatus weniger als eine geringgradige Neoplasie war, durchgeführt wurde, waren tatsächlich fast 75 % positiv.

Tabelle 9 gibt die theoretischen positiven und negativen Prädiktionswerte der High-Risk-HPV-Sonde für eine initiale LSIL oder HSIL an, von der bei der Kolposkopie gefunden wurde, dass es sich um eine HSIL oder schwerwiegendere Erkrankung handelte.

Tabelle 9
Theoretischer positiver und negativer Vorhersagewert der
High-Risk-HPV-Sonde bei
Pap-Abstrichergebnissen mit initialer LSIL oder HSIL

Theoretische Prävalenz für HSIL	Pap-Abstrichergebnis mit initialer LSIL oder HSIL	
	Positiver	Negativer
	Vorhersagewert des Assays	Vorhersagewert 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

DATEN ZUR UNTERSTÜTZUNG DER PRIMÄREN SCREENING-INDIKATION AUF HIGH-RISK-HPV

Klinische Leistung beim Screening von Patientinnen mit normalen Pap-Abstrichergebnissen als Hilfsmittel bei der Risikobeurteilung zur Patientenbetreuung

Die Ergebnisse von acht unabhängigen klinischen Studien, die in namhaften medizinischen, akademischen und Regierungseinrichtungen in Zentren der USA und im Ausland durchgeführt wurden, werden nachstehend beschrieben. In den Studien wurden etablierte Pap-Verfahren eingesetzt, die in den Ländern verwendet werden, in denen die Studie durchgeführt wurde. In allen außer zwei Fällen wurde zur Interpretation der Pap-Ergebnisse das Bethesda-Grading-System verwendet. Außerdem wurden hochgradige Zervixerkkrankungen für jede Studie anhand der durch Kolposkopie geführten Biopsie diagnostiziert. Anhand dieser Studien wurde die klinische Brauchbarkeit des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests im Vergleich zu dem Pap-Abstrich für ältere Frauen (im Allgemeinen über 30 bis 35 Jahre alt) beurteilt. Alle Studien außer einer führten auch prospektive HPV-Tests unter Verwendung des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests durch.

Die Studien waren Screening-Studien an einem Querschnitt der Allgemeinbevölkerung, bei denen der *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test eingesetzt wurde, sofern nachstehend nicht anderweitig angegeben. Wie angegeben, wurden 2 der 8 Screening-Studien in den USA, 2 in Europa, 2 in Lateinamerika, 1 in Afrika und 1 in Asien durchgeführt.

Die Leistung des anhand der sechs Querschnittsstudien beobachteten *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests wird in den Tabellen 10 und 11 für Frauen von 30 Jahren und älter, die mit einer histologisch bestätigten hochgradigen Zervixneoplasie (definiert als CIN3 oder schwerwiegender) diagnostiziert wurden, zusammengefasst.

Tabelle 10
Leistungsabschätzungen des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests
Sensitivität und Spezifität

Population	n		Sensitivität (%)			Spezifität (%)		
			PAP allein	HPV allein	HPV + PAP	PAP allein	HPV allein	HPV + PAP
Westeuropa 1	7.592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7.453/7.565)	96,2 (275/7.565)	95,1 (7.193/7.565)
		95 % KI	32,0 bis 71,3	81,0 bis 99,9	87,2 bis 100	98,2 bis 98,8	95,7 bis 96,6	94,6 bis 95,6
Lateinamerika 1	6.115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5.962/6.038)	93,9 (5.669/6.038)	93,4 (5.637/6.038)
		95 % KI	46,68 bis 69,6	87,2 bis 98,6	90,9 bis 99,7	98,4 bis 99,0	93,3 bis 94,5	92,7 bis 94,0
Lateinamerika 2 [†]	6.176		77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5.745/6.108)	94,0 (5.742/6.108)	89,9 (5.490/6.108)
		95 % KI	66,2 bis 87,1	79,9 bis 95,8	85,6 bis 98,4	93,4 bis 94,6	93,4 bis 94,6	89,1 bis 90,6
Afrika	2.925		84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2.436/2.818)	80,0 (2.253/2.818)	76,4 (2.152/2.818)
		95 % KI	75,8 bis 90,5	82,4 bis 94,8	85,8 bis 96,7	85,1 bis 87,7	78,4 bis 81,4	74,8 bis 77,9
Asien	1.936		97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1.445/1.894)	83,0 (1.572/1.894)	68,0 (1.287/1.894)
		95 % KI	87,4 bis 99,9	91,6 bis 100,0	91,6 bis 100,0	74,3 bis 78,2	81,2 bis 85,0	65,8 bis 70,1
USA 1	1.040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1.013/1.038)	96,2 (999/1.038)	95,5 (991/1.038)
		95 % KI	1,26 bis 98,7	15,8 bis 100,0	15,8 bis 100,0	96,5 bis 98,4	94,9 bis 97,3	94,0 bis 96,7

[†] HC2-Daten, sofern verfügbar, andernfalls Verwendung von HCS-Daten; kombinierte Daten

Tabelle 11
Leistungsabschätzungen des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests
Positiver und negativer Vorhersagewert

Population	n		Prävalenz (%)	Positiver Vorhersagewert (%)			Negativer Vorhersagewert (%)		
				PAP allein	HPV allein	HPV + PAP	PAP allein	HPV allein	HPV + PAP
Westeuropa 1	7.592		0,36 (27/7.592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7.453/7.466)	99,99 (7.275/7.276)	100,0 (7.193/7.193)
		95 % KI	0,23 bis 0,52	6,21 bis 17,9	5,45 bis 11,8	4,51 bis 9,69	99,70 bis 99,91	99,92 bis 100,0	99,95 bis 100,0
Lateinamerika 1	6.115		1,26 (77/6.115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5.962/5.994)	99,93 (5.669/5.673)	99,96 (5.637/5.639)
		95 % KI	0,99 bis 1,57	28,6 bis 46,4	13,2 bis 20,3	12,6 bis 19,4	99,25 bis 99,63	99,82 bis 99,98	99,87 bis 100,0
Lateinamerika 2 [†]	6.176		1,10 (68/6.176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5.745/5.760)	99,88 (5.742/5.749)	99,93 (5.490/5.494)
		95 % KI	0,86 bis 1,39	9,69 bis 16,3	11,1 bis 18,0	7,30 bis 11,8	99,57 bis 99,85	99,75 bis 99,95	99,81 bis 99,98
Afrika	2.925		3,66 (107/2.925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2.436/2.453)	99,51 (2.253/2.264)	99,63 (2.152/2.160)
		95 % KI	3,01 bis 4,40	15,6 bis 22,9	11,9 bis 17,4	10,6 bis 15,5	98,89 bis 99,60	99,13 bis 99,76	99,27 bis 99,84
Asien	1.936		2,17 (42/1.936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1.445/1.446)	100,0 (1.572/1.572)	100,0 (1.287/1.287)
		95 % KI	1,57 bis 2,92	6,07 bis 11,2	8,44 bis 15,3	4,70 bis 8,65	99,62 bis 100,0	99,77 bis 100,0	99,71 bis 100,0
USA 1	1.040		0,19 (2/1.040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1.013/1.014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		95 % KI	0,02 bis 0,69	0,10 bis 19,6	0,60 bis 16,5	0,50 bis 14,0	99,45 bis 100,0	99,63 bis 100,0	99,63 bis 100,0

[†] HC2-Daten, sofern verfügbar, andernfalls Verwendung von HCS-Daten; kombinierte Daten

Allen Studien ergaben eine gleichmäßige und häufig sehr signifikante Verbesserung der Sensitivität des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests im Vergleich zum Pap allein. Wie bei der Sensitivität, übertrifft der negative Vorhersagewert (NVW) von HPV in allen Fällen den von Pap allein und nähert sich 100 % an. Dieser NVW zeigt die hohe Wahrscheinlichkeit der Abwesenheit einer hochgradigen

Zervixerkkrankung oder eines Zervixkarzinoms bei zytologisch normalen Frauen nach, die frei von einer HPV-Infektion sind.

Obwohl die Spezifität des *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Tests niedriger als für Pap allein war, zeigen Wahrscheinlichkeitsverhältnisanalysen, dass die beobachtete Spezifitätsabnahme nicht signifikant genug ist, um die klinische Brauchbarkeit des Tests bei der Identifikation von Frauen negativ zu beeinflussen, die ein geringes oder kein Risiko für die Entwicklung einer Zervixerkkrankung aufweisen. Dennoch ist es wichtig, dass die Entscheidung zur Überweisung einer Patientin zur Kolposkopie auf allen dem Arzt verfügbaren klinischen Informationen und Risikoinformationen sowie der Anamnese der Patientin basiert. Zu wichtigen Variablen zählen anamnestisch eine HPV-Infektion und/oder abnorme Pap-Abstriche, das Alter beim ersten Koitus, Anzahl der Sexualpartner und gleichzeitige sexuell übertragene Krankheiten.^{27,28}

Obwohl die Prävalenz einer hochgradigen Erkrankung nicht signifikant unter den Studien variiert, aus denen die Leistung ermittelt wurde, kann sich die Prävalenz einer HPV-Infektion in einer Population auf die Leistung auswirken und variiert typischerweise mit der Patientenpopulation. Außerdem wurde gezeigt, dass die Prävalenz einer HPV-Infektion mit zunehmendem Alter dramatisch abnimmt.^{28, 30 bis 37, 41} Positive Vorhersagewerte nehmen ab, wenn Populationen mit einer geringen Prävalenz oder individuelle Patientinnen mit einem geringen Infektionsrisiko getestet werden.

Longitudinalanalysen wurden unter Verwendung der Ergebnisse aus zwei Studien durchgeführt; eine, die in den USA von dem National Cancer Institute (NCI) in Portland, Oregon, ausgeführt wurde, und die andere, die in Frankreich im Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims ausgeführt wurde. Diese Longitudinalanalysen sollten zeigen, dass Pap-negative/HPV-negative Patientinnen im Vergleich zu den herkömmlich als Low-Risk definierten Frauen, deren HPV-Status unbekannt ist und verglichen mit Pap-negativen/HPV-positiven Patientinnen ein geringeres Risiko für eine Zervixerkkrankung aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Longitudinalanalysen sind in den nachstehenden Tabellen 12 und 13 angegeben.

Tabelle 12
Zusammenfassung der Ergebnisse: NCI-Studie und französische Studie
Relatives Risiko für eine High-Grade-Erkrankung

Studiengruppe	Alter	Low-Risk-Klassifikation	n	Fälle mit CIN 3+	Rate (pro 100 Patientenjahre)	Relatives Risiko (95 % KI)
NCI-Studie	30 Jahre und älter	Pap normal, HPV negativ	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Konsekutive normale Paps*	9.429	19	0,048	1,000
	Alle	Pap normal, HPV negativ	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Konsekutive normale Paps*	13.392	44	0,082	1,000
Französische Studie	30 Jahre und älter	Pap normal, HPV negativ	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Konsekutive normale Paps*	2.026	4	0,099	1,000
	Alle	Pap normal, HPV negativ	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Konsekutive normale Paps*	2.650	7	0,136	1,000

*Drei normale jährliche Paps über ca. 2 Jahre

Tabelle 13
Zusammenfassung der Ergebnisse: NCI-Studie und französische Studie
Durch den HPV-Status zur Basislinie stratifizierte Erkrankungsraten

Studiengruppe	Alter	Basislinienstatus	n	Fälle mit CIN 3+	Rate (pro 100 Patientenjahre)	Relatives Risiko (95 % KI)
NCI-Studie	30 Jahre und älter	Pap normal, HPV positiv	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Pap normal, HPV negativ	12.054	28	0,043	1,00
	Alle	Pap normal, HPV positiv	2.561	63	0,096	10,64 (7,33 bis 15,5)
		Pap normal, HPV negativ	17.594	48	0,056	1,00
Französische Studie	30 Jahre und älter	Pap normal, HPV positiv	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap normal, HPV negativ	1.696	3	0,084	1,00
	Alle	Pap normal, HPV positiv	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap normal, HPV negativ	2180	3	0,066	1,00

Die klinische Brauchbarkeit des HPV-Testergebnisses wird weiterhin durch das erhöhte Risiko für eine Zervixerkkrankung bei HPV-positiven Frauen im Vergleich zu HPV-negativen Frauen gezeigt.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Ein nicht klinisches Panel klonierter HPV-Plasmid-DNA wurde getestet, um zu ermitteln, ob alle 18 HPV-Typen mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test nachweisbar sind, und um die analytische Sensitivität des Assays für jeden der HPV-Typen zu ermitteln. Jede HPV-Zielkonzentration (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml und 0,2 pg/ml) von jedem der 18 HPV-DNA-Typen (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68) wurde als Dreifachbestimmung dem Typ entsprechend mit der Low-Risk-HPV-Sonde oder der High-Risk-HPV-Sonde durchgeführt. Das mittlere Signal in RLU für jede Konzentration von jedem HPV-Typ wurde berechnet und mit dem Positivkalibrator für die entsprechende Seite des Assays verglichen.

Die Nachweisgrenze für jeden HPV-Typ in STM ist in Tabelle 14 angegeben. Die Nachweisgrenzen variierten abhängig von dem getesteten HPV-Typ von 0,62 pg/ml bis 1,39 pg/ml. Alle HPV-Typen waren bei einer Konzentration von schätzungsweise 1,09 pg/ml HPV-DNA-Target pro 1 ml Probe in STM nachweisbar. Die mittlere Nachweisgrenze aller 18 HPV-DNA-Typen betrug 1,09 pg/ml mit einer Standardabweichung von 0,05.

Tabelle 14
Zusammenfassung der Nachweisgrenzen der Sensitivität
für jeden HPV-DNA-Typ in STM beim *digene* HC2 HPV DNA Test

HPV-DNA-Typ	Nachweisbare HPV-DNA-Konzentration (pg/ml)	Standardabweichung	95 % Konfidenzbereich
6	1,33	0,03	1,22 bis 1,46
11	1,13	0,05	1,00 bis 1,29
16	1,09	0,06	0,94 bis 1,29
18	1,05	0,05	0,88 bis 1,29
31	1,01	0,05	0,91 bis 1,15
33	1,35	0,02	1,26 bis 1,45
35	1,11	0,05	0,95 bis 1,31
39	1,39	0,09	1,16 bis 1,71
42	1,20	0,05	1,02 bis 1,44
43	0,85	0,03	0,86 bis 1,07
44	1,17	0,04	1,02 bis 1,36
45	1,14	0,04	0,99 bis 1,35

51	0,78	0,10	0,70 bis 0,88
52	1,37	0,06	1,21 bis 1,58
56	0,62	0,04	0,58 bis 0,67
58	0,82	0,04	0,73 bis 0,94
59	1,10	0,06	1,00 bis 1,21
68	1,19	0,04	1,03 bis 1,39
Mittelwert (alle Typen)	1,09	0,05	0,97 bis 1,27

LEISTUNG DES KOMBINATIONSSONDEN-COCKTAILS (CPC)

Das gleiche, oben beschriebene nicht klinische HPV-Plasmid-DNA-Panel wurde zur Bestimmung der analytischen Sensitivität von jedem der 18 HPV-Typen in dem *digene* HC2 HPV DNA Test unter Befolgung des in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Kombinationssonden-Cocktail-(CPC) Protokolls getestet. Die analytische Sensitivität des CPC-Protokolls variierte von 0,58 pg/ml bis 1,39 pg/ml, und alle HPV-Typen waren bei einer Konzentration von schätzungsweise 0,95 pg/ml HPV-DNA-Target pro 1 ml Probe nachweisbar. Die mittlere Nachweisgrenze aller 18 HPV-Typen betrug 0,95 pg/ml mit einer Standardabweichung von 0,07. Diese Sensitivität entspricht der für das Dual-Sondenverfahren des *digene* HC2 HPV DNA Tests ermittelten analytischen Sensitivität.

ÄQUIVALENZ ZWISCHEN PROBEN IN STM UND PRESERVCYT SOLUTION

Die Äquivalenz zwischen Proben in STM und PreservCyt Solution wurde auf gleichwertiges Auffinden von HPV-18-DNA aus ca. 10⁶ positiven HeLa-Zellen mit integrierten HPV-18-Genomen untersucht, die in STM und in einen Pool negativer Zellen in PreservCyt Solution dotiert waren. Jeder Probenotyp wurde nach den in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verarbeitungs-/Denaturierungsverfahren verarbeitet und mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test unter Verwendung der High-Risk-HPV-Sonde getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Auffinden der HPV-18-DNA aus humanen Karzinomzellen für die beiden Medien äquivalent ist und dass das Vorbereitungsverfahren mit PreservCyt Solution die analytische Sensitivität des *digene* HC2 HPV DNA Tests nicht beeinträchtigt.

KORRELATION ZWISCHEN ERGEBNISSEN VON PROBEN IN SUREPATH UND PROBEN IN STM IN EINER KLINISCHEN POPULATION

In den USA wurde eine zweiphasige klinische Bewertung unter Einbeziehung von 6 Untersuchungszentren und 3 Teststandorten durchgeführt. Patientinnen einer Klinik für sexuell übertragbare Krankheiten, einer gynäkologischen Klinik, einer Kolposkopieklinik, eines Krankenhauses oder einer Familienplanungsstelle waren für die Teilnahme nach vorbestimmten Ein- und Ausschlusskriterien qualifiziert. An der Durchführbarkeitsphase, in der ein passender *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Assay-Grenzwert für die Verwendung von Proben in SurePath bestimmt werden sollte, waren ca. 400 Patientinnen beteiligt. Die klinische Evaluierungsphase zur Bewertung des gewählten Assay-Grenzwertes, an der ca. 1.500 Patientinnen beteiligt waren, begann, nachdem eine Interimanalyse der Machbarkeit gezeigt hatte, dass ein Assay-Grenzwert von 1,0 RLU/CO unter Verwendung von Proben in SurePath eine akzeptable Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Proben in STM ergab.

Für beide Evaluierungsphasen wurden gepaarte Zervixproben in SurePath und in STM von 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 übrigen Proben in SurePath und die entsprechenden Proben in STM mit dem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test unter Verwendung eines Assay-Grenzwerts von 1,0 RLU/CO getestet.

In Tabelle 15 ist die Korrelation zwischen den Ergebnissen in SurePath und den gepaarten Proben in STM angegeben, die in den für die Datenanalyse zulässigen Endergebnissen aller Teilnehmerinnen beobachtet wurde.

Tabelle 15
Ergebnisübereinstimmung von SurePath mit STM
(alle Altersgruppen und zytologische Klassifikationen)
(n = 1.490)

Positive Übereinstimmung % 95 % KI (n/N)		Negative Übereinstimmung % 95 % KI (n/N)	
Alle positiv	Deutlich positive Untergruppe (RLU/CO \geq 2,5)	Alle negativ	Deutlich negative Untergruppe RLU/CO (<0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1.011/1.061)	96,0 94,6, 97,1 (1.002/1.044)

Diese Ergebnisse präzisieren, dass die relative Sensitivität und Spezifität des Assays unter Verwendung von Proben in SurePath eine hohe Korrelation mit dem Ergebnis aufweist, das mit Proben in STM erzielt wurde, was durch den unteren Wert des 95 % Konfidenzintervalls für die positive und negative Übereinstimmung nachgewiesen wird.

REPRODUZIERBARKEIT

Es wurde eine multizentrische Reproduzierbarkeitsstudie durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit bezüglich unterschiedlicher Tage und Orte und insgesamt des *digene* HC2 HPV DNA Tests mit einem Panel von HPV-DNA-Targets und HPV-positiven und HPV-negativen klinischen Proben zu bestimmen.

Drei externe Laboratorien führten die Tests mit der gleichen Charge *digene* HC2 HPV DNA Test Kits an 3 verschiedenen Tagen mit einem identischen Reproduzierbarkeits-Panel durch. Das Reproduzierbarkeits-Panel umfasste folgende Proben: 12 denaturierte klinische Proben-Pools in STM; 3 nicht denaturierte klinische Proben-Pools in PreservCyt Solution; Negativ- und Positivkalibratoren, Low-Risk und High-Risk, bei Konzentrationen von 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml und 10 pg/ml. Alle Panel-Proben wurden täglich als Dreifachbestimmung sowohl mit dem High-Risk-HPV-Sondenverfahren als auch mit dem CPC-Verfahren getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 gezeigt.

Tabelle 16
Zusammenfassung der Gesamtstatistik für die
multizentrische Reproduzierbarkeit des *digene* HC2 HPV DNA Tests

Statistisches Maß	HIGH-RISK-HPV-SONDE	Kombinationssonden-Cocktail (CPC)	Kombinierte Ergebnisse für High-Risk-HPV-Sonde und CPC ^a
Prozentualer Anteil positiv erwarteter Ergebnisse mit beobachtetem positiven Ergebnis	100 % (99,0 bis 100,0)	99,8 % (98,92 bis 100,0)	99,9 % (99,38 bis 100,0)
Prozentualer Anteil negativ erwarteter Ergebnisse mit beobachtetem negativen Ergebnis	99,0 % (97,49 bis 99,73)	98,9 % (96,79 bis 99,77)	99,0 % (97,88 bis 99,58)
Übereinstimmung	99,5 % (98,70 bis 99,86)	99,5 % (98,70 bis 99,86)	99,5 % (99,0 bis 99,78)

Kappa	0,990	0,989	0,990
-------	-------	-------	-------

^aDie Zahlenangaben in Klammern geben die 95 % Konfidenzintervalle an. Die Gesamtdaten sind eine Kombination aller Durchläufe an allen Standorten.

Dies zeigt an, dass die Reproduzierbarkeit des *digene* HC2 HPV DNA Tests mit in STM entnommenen klinischen Proben sehr gut ist.

KREUZREAKTIVITÄT

KREUZREAKTIVITÄTS-PANEL

Eine Reihe von Bakterien, Viren und Plasmiden, die häufig im weiblichen Anogenitaltrakt vorkommen, sowie eine Sammlung kutaneotropher HPV-Typen, für die Klone zur Verfügung standen, wurden getestet, ob eine Kreuzreaktivität mit den im *digene* HC2 HPV DNA Test verwendeten HPV-Sonden auftritt. Alle Mikroorganismen wurden bei Konzentrationen von 1×10^5 und 1×10^7 Organismen pro ml getestet. Aufgereinigte DNA von Viren und Plasmiden wurde bei einer Konzentration von 4 ng/ml bestimmt.

Es folgt eine Liste der getesteten Bakterien. Alle Bakterien waren im *digene* HC2 HPV DNA Test negativ.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 oder 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan-Stamm)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

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

Nachstehend ist eine Liste der getesteten Virus- oder Plasmid-DNA oder des getesteten Humanserums aufgeführt:

Adenovirus 2	Humanes Papillomavirus, Typ 1
Cytomegalovirus	Humanes Papillomavirus, Typ 2
Epstein-Barr-Virus	Humanes Papillomavirus, Typ 3
Hepatitis-B-Surface-Antigen-positives Serum	Humanes Papillomavirus, Typ 4
Herpes simplex I	Humanes Papillomavirus, Typ 5
Herpes simplex II	Humanes Papillomavirus, Typ 8
Humanes Immundefizienz-Virus (HIV, RT-DNA)	Humanes Papillomavirus, Typ 13
Simian-Virus, Typ 40 (SV40)	Humanes Papillomavirus, Typ 30
	pBR322

Die einzigen Viren oder Plasmiden, die im *digene* HC2 HPV DNA Test eine Kreuzreaktivität aufwiesen, waren der HPV-Typ 13 und das Plasmid pBR322. Die HPV-13-DNA reagierte nur mit der Low-Risk-HPV-Sonde. HPV-13 wird häufig in Lippenläsionen bestimmter ethnischer Gruppen, jedoch nicht im Anogenitaltrakt nachgewiesen.²⁹ Folglich ist nicht zu erwarten, dass die zwischen HPV-13 und der Low-Risk-HPV-Sonde im *digene* HC2 HPV DNA Test beobachtete Kreuzreaktivität für anogenitale Proben ein klinisch irreführendes Ergebnis bewirkt. Die Kreuzreaktivität zwischen pBR322 und den Low-Risk- und High-Risk-HPV-Sonden des *digene* HC2 HPV DNA Tests ist nicht unerwartet, weil die Entfernung der gesamten Vektor-pBR322-DNA bei der Isolation des HPV-Inserts schwierig ist. Das Vorliegen homologer pBR322-Sequenzen in Humangenitalproben wurde berichtet, und falsch-positive Ergebnisse können bei Vorliegen hoher bakterieller Plasmid-Konzentrationen auftreten. Von den 298 klinischen Proben, die mit den Low-Risk- und High-Risk-HPV-Sonden beim *digene* HC2 HPV DNA Test positiv getestet wurden,

ließen jedoch keine auf positive Ergebnisse schließen, die beim Test mit einer pBR322-Sonde auf pBR322 zurückzuführen waren. Folglich scheint die Wahrscheinlichkeit, im *digene* HC2 HPV DNA Test aufgrund homologer pBR322-Sequenzen bei klinischen Proben falsch-positive Ergebnisse zu erhalten, gering zu sein.

KREUZHYBRIDISIERUNG

Jeder der 18 HPV-Typen wurde sowohl mit Low-Risk- als auch High-Risk-HPV-Sonden bei Konzentrationen von 4 ng/ml HPV-DNA getestet. Es wurde erwartet, dass alle HPV-Targets mit der entsprechenden Sondengruppe negativ sein würden, wohingegen von keiner der Proben mit der entgegengesetzten Sondengruppe erwartet wurde, dass sie positiv ist. Aus dieser Studie ging hervor, dass im geringen Ausmaß eine Kreuzhybridisierung zwischen den HPV-Typen 6 und 42 (Low-Risk-HPV-Typen) und der High-Risk-Sondengruppe (High-Risk-HPV-Sonde) auftrat. Proben mit HPV-6- oder HPV-42-DNA-Konzentrationen von 4 ng/ml oder mehr können für beide Sondengruppen positiv sein. Die klinische Signifikanz dieser Tatsache besteht darin, dass Patientinnen mit 4 ng/ml oder mehr HPV-6- oder HPV-42-DNA unnötigerweise zur Kolposkopie überwiesen werden können.

Zusätzlich hat sich gezeigt, dass bei der High-Risk-HPV-Sonde Kreuzreaktionen mit den HPV-Typen 40, 53 und 66 auftreten. Diese Typen sind selten, und es liegen nicht genügend Hinweise zur Ermittlung der genauen Korrelation zwischen einer Infektion mit diesen Typen und der Entstehung einer hochgradigen Erkrankung vor³⁸. Patientinnen, deren Proben hohe Konzentrationen dieser HPV-DNA-Typen enthalten, können fälschlicherweise zur Kolposkopie überwiesen werden. In der Literatur wurde zudem auch berichtet, dass komplexe Sonden, ähnlich den bei diesem Test verwendeten, aufgrund einer Kreuzhybridisierung mit den HPV-Typen 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 oder MM9 zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten.³⁹ Obwohl mehrere dieser HPV-Typen selten sind oder neue Typen bei einer hochgradigen Erkrankung nicht häufig begegnet wird, können Patientinnen, deren Proben hohe Konzentrationen dieser HPV-DNA-Typen enthalten, fälschlicherweise zur Kolposkopie überwiesen werden.

EINFLUSS VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN STM

Der Einfluss von Blut und anderen potenziell störenden definierten und nicht definierten Substanzen wurde im *digene* HC2 HPV DNA Test evaluiert. Vollblut, Duschbad, antifungale Creme und empfängnisverhütende Gele (Mittel, die häufig in Zervixproben gefunden werden können) wurden den negativen und positiven Proben in STM (Pools klinischer Proben und nicht klinischer Proben) in Konzentrationen zugegeben, die in Zervixproben gefunden werden können. Mit keinem der vier Mittel und bei keiner Konzentration wurden falsch-positive Ergebnisse beobachtet. Ein falsch-negatives Ergebnis kann jedoch in klinischen Proben mit HPV-DNA-Konzentrationen nahe am positiven Grenzwert für den Assay (1 pg/ml) berichtet werden, wenn hohe Konzentrationen einer antifungalen Creme oder eines empfängnisverhütenden Gels vorhanden sind. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine klinische Probe fast vollständig aus einer dieser Substanzen besteht, da die Zervix vor Entnahme von Proben für den Pap-Abstrich und die HPV-Tests routinemäßig gereinigt wird.

EINFLUSS VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN PRESERV CYT SOLUTION

Der Einfluss von Blut und anderen potenziell störenden definierten oder nicht definierten Substanzen, die in klinischen Proben in PreservCyt Solution potenziell vorhanden sein können, wurde im *digene* HC2 HPV DNA Test evaluiert. Vollblut, Duschbad, antifungale Creme und empfängnisverhütende Gele (Mittel, die häufig in Zervixproben gefunden werden können) wurden den Pools negativer und positiver klinischer Proben in PreservCyt Solution in Konzentrationen zugegeben, die in Zervixproben gefunden werden können. Mit keinem der vier Mittel und bei keiner Konzentration wurden falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse beobachtet. Außerdem inhibieren Substanzen, die einigen klinischen Proben inhärent sind, den Nachweis der HPV-DNA durch den *digene* HC2 HPV DNA Test nicht.

REPRODUZIERBARKEIT DES *digene* HC2 HPV DNA TESTS MIT IN STM ENTNOMMENEN KLINISCHEN PROBEN

Die Reproduzierbarkeit des *digene* HC2 HPV DNA Tests mit in STM entnommenen klinischen Proben wurde in einer Studie unter Verwendung von 20 klinischen Pools (10 positiven und 10 negativen)

bestimmt, die durch Kombination zuvor denaturierter und getesteter in STM mit Zervixbürste entnommenen Proben vorbereitet wurden. Die Proben wurden als 4 Wiederholungsbestimmungen an 5 Tagen für insgesamt 20 Wiederholungsbestimmungen pro Probe getestet. Das Testen wurde mit dem Kombinationssonden-Cocktail-Verfahren durchgeführt. Mittelwerte, Standardabweichung und 95 % Konfidenzintervalle um den Mittelwert (KI) wurden für jede Probe pro Tag und über 5 Tage berechnet und sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17
Mittlere RLU/CO mit Konfidenzintervallen und prozentualen Anteilen positiver Proben
(absteigende Reihenfolge des mittleren RLU/CO)

Nr.	Probe ID	Mittelwert RLU/CO	KI	Positive Proben (%)
1	10	3,18	3,02 bis 3,35	100 (20/20)
2	20	1,43	1,36 bis 1,50	100 (20/20)
3	11	1,25	1,20 bis 1,28	100 (20/20)
4	12	1,21	1,15 bis 1,27	100 (20/20)
5	15	1,20	1,14 bis 1,25	100 (20/20)
6	13	1,07	1,01 bis 1,11	80 (16/20)
7	16	1,06	1,01 bis 1,09	75 (15/20)
8	17	1,04	1,00 bis 1,06	80 (16/20)
9	14	0,98	0,92 bis 1,02	45 (9/20)
10	18	0,92	0,87 bis 0,96	20 (4/20)
11	19	0,72	0,68 bis 0,75	0 (0/20)
12	7	0,40	0,33 bis 0,46	0 (0/20)
13	4	0,38	0,35 bis 0,39	0 (0/20)
14	9	0,37	0,32 bis 0,41	0 (0/20)
15	1	0,35	0,32 bis 0,36	0 (0/20)
16	2	0,35	0,31 bis 0,37	0 (0/20)
17	8	0,32	0,29 bis 0,34	0 (0/20)
18	3	0,30	0,27 bis 0,31	0 (0/20)
19	6	0,27	0,24 bis 0,30	0 (0/20)
20	5	0,26	0,23 bis 0,28	0 (0/20)

Für die 5 Proben mit einem mittleren RLU/CO bei 20 % oder mehr über dem Grenzwert (Nr. 1 bis 5) waren 100 von 100 Wiederholungsbestimmungen (100,0 %) positiv. Für die 5 Proben mit einem mittleren RLU/CO innerhalb von 20 % über oder unter dem Assay-Grenzwert (Nr. 6 bis 10) waren 60 von 100 (60 %) der Wiederholungsbestimmungen positiv und 40 von 100 (40 %) waren negativ. Für die 10 Proben mit einem mittleren RLU/CO bei mehr als 20 % unter dem Grenzwert des Assays waren 200 von 200 Wiederholungsbestimmungen (100 %) negativ.

Folglich waren Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr über dem Grenzwert in 100 % der Fälle positiv, während Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr unter dem Grenzwert in 100 % der Fälle negativ waren, was darauf hindeutet, dass von Proben, die 20 % oder mehr vom Grenzwert entfernt liegen, erwartet werden kann, dass sie zu konsistenten Ergebnissen führen. Proben nah am Grenzwert ergaben annähernd gleiche Zahlen positiver und negativer Ergebnisse. Diese Daten zeigen, dass Proben in STM mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test zu reproduzierbaren Ergebnissen führen.

REPRODUZIERBARKEIT DES *digene* HC2 HPV DNA TESTS MIT IN PRESERVCYT SOLUTION ENTNOMMENEN KLINISCHEN PROBEN

Die Reproduzierbarkeit des *digene* hc2 HPV DNA Tests mit in PreservCyt Solution entnommenen klinischen Proben wurden in einer Studie unter Verwendung von 24 Blindproben bestimmt, die einen Bereich von HPV-DNA-Konzentrationen abdeckten. Die Proben bestanden aus PreservCyt Solution und Leukozyten mit und ohne HPV-16-Plasmid enthaltenden Bakterien.

Die Proben wurden als 4 Wiederholungsbestimmungen an 5 Tagen für insgesamt 20 Wiederholungsbestimmungen pro Probe getestet. An jedem der 5 Tage der Studie wurde von jeder Probe ein 8-ml-Aliquot verarbeitet und nach der *digene* HC2 Sample Conversion Kit Gebrauchsanweisung lediglich mit der High-Risk-HPV-Sonde getestet. Mittelwerte, Standardabweichungen und 95 % Konfidenzintervalle (KI) wurden für jede Probe pro Tag und über alle 5 Tage und alle Wiederholungsbestimmungen berechnet. Der mittlere RLU/CO, das Konfidenzintervall um den Mittelwert und der Prozentsatz positiver Wiederholungsbestimmungen sind für jede Probe, in absteigender Reihenfolge basierend auf dem mittleren RLU/CO, in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18
Mittlerer RLU/CO mit Konfidenzintervallen und prozentualen Anteilen positiver Proben
(absteigende Reihenfolge des mittleren RLU/CO)

Nr.	Probe Nr.	Mittelwert RLU/CO	KI	Positive Proben (%)
1	21	3,51	3,19 bis 3,83	100 (20/20)
2	12	1,58	1,48 bis 1,69	100 (20/20)
3	13	1,42	1,32 bis 1,52	100 (20/20)
4	17	1,38	1,23 bis 1,53	100 (20/20)
5	18	1,36	1,23 bis 1,48	90 (18/20)
6	15	1,32	1,16 bis 1,49	95 (19/20)
7	23	1,17	1,06 bis 1,27	85 (17/20)
8	16	1,14	1,07 bis 1,20	75 (15/20)
9	20	1,10	0,96 bis 1,21	75 (15/20)
10	19	1,06	0,95 bis 1,17	85 (17/20)
11	22	1,05	0,99 bis 1,10	45 (9/19)
12	11	1,04	0,96 bis 1,11	70 (14/20)
13	14	0,94	0,86 bis 1,01	65 (13/20)
14	24	0,77	0,73 bis 0,81	25 (5/20)
15	3	0,28	0,25 bis 0,30	0 (0/20)
16	1	0,27	0,24 bis 0,30	0 (0/20)
17	7	0,27	0,25 bis 0,30	0 (0/20)
18	2	0,27	0,25 bis 0,28	0 (0/20)
19	5	0,26	0,24 bis 0,28	0 (0/20)
20	4	0,24	0,22 bis 0,25	0 (0/20)
21	9	0,23	0,21 bis 0,25	0 (0/20)
22	8	0,22	0,18 bis 0,27	0 (0/20)
23	10	0,22	0,20 bis 0,25	0 (0/20)
24	6	0,19	0,17 bis 0,21	0 (0/20)

Für die 6 Proben mit einem mittleren RLU/CO bei 20 % oder mehr über dem Grenzwert (Nr. 1 bis 6) waren 114 von 120 Wiederholungsbestimmungen (95,0 %) positiv. Für die 7 Proben mit einem mittleren RLU/CO innerhalb von 20 % über oder unter dem Assay-Grenzwert (Nr. 7 bis 13) waren 88 von 139 (63,3 %) der Wiederholungsbestimmungen positiv und 51 von 139 (36,7 %) waren negativ. Für die 4 Proben innerhalb von 10 % über oder unter dem Grenzwert (Nr. 10 bis 13) waren 41 der 79 (51,9 %) der Wiederholungsbestimmungen positiv und 38 (48,1 %) waren negativ. Für die 11 Proben mit einem mittleren RLU/CO bei mehr als 20 % unter dem Assay-Grenzwert waren 220 von 220 Wiederholungsbestimmungen (100 %) negativ.

Folglich waren Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr über dem Grenzwert in mehr als 95 % der Fälle positiv, während Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr unter dem Grenzwert in 100 % der Fälle negativ waren, was erkennen lässt, dass für Proben, die 20 % oder mehr vom Grenzwert liegen, erwartet werden kann, dass sie zu konsistenten Ergebnissen führen. Proben nah am Grenzwert ergaben annähernd gleiche Zahlen positiver und negativer Ergebnisse. Diese Daten

zeigen, dass Proben in PreservCyt Solution mit dem *digene* HC2 HPV DNA Test zu reproduzierbaren Ergebnissen führen.

REPRODUZIERBARKEIT DES *digene* HC2 HIGH RISK HPV DNA TEST MIT IN SUREPATH-KONSERVIERUNGSFLÜSSIGKEIT ENTNOMMENEN PROBEN

Reproduzierbarkeitsbewertungen wurden durchgeführt, um die Eignung von 3 verschiedenen Labors zu beschreiben, ein ähnliches diagnostisches Ergebnis an verschiedenen Tagen und mit verschiedenen Durchläufen aus einer identischen Gruppe von Proben mit bekanntem positiven/negativen HPV-Status unter Verwendung eines Assay-Grenzwerts von 1,0 RLU/CO zu erzielen. Das Proben-Panel der Reproduzierbarkeitsbewertung bestand aus 5 HPV-positiven Proben, 2 Proben mit HPV-DNA-Konzentrationen nahe dem Assay-Grenzwert und 5 HPV-negativen Proben.

Die Panel-Proben wurden vorbereitet, indem einzelne Patientenproben in SurePath mit einem bekannten negativen und positiven HPV-Status kombiniert wurden, um die gewünschten RLU/CO-Zielwerte zu erhalten. Alle Panel-Proben wurden als Zweifachbestimmung zweimal pro Tag und an 5 Tagen in jedem der drei beteiligten Labors getestet.

Tabelle 19
Reproduzierbarkeitsstudie mit Proben in SurePath
Qualitative Ergebnisse nach Panel-Proben

Panel-Proben	Mittlerer RLU/CO	Erwartetes Ergebnis	HPV-positiv n (%)	HPV-negativ n (%)
1	0,20	negativ	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativ	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativ	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativ	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativ	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativ	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positiv	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positiv	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positiv	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positiv	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positiv	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positiv	60 (100)	0 (0)

REPRODUZIERBARKEIT DER ERGEBNISSE VON PROBEN IN SUREPATH UNTER VERWENDUNG DES RAPID CAPTURE SYSTEMS ZUR ASSAY-VERARBEITUNG

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Proben in SurePath bei Verwendung des Rapid Capture Systems zur Assay-Verarbeitung wurden mit den Ergebnissen der manuellen Assay-Verarbeitung verglichen. Es wurden zwei vergleichende Tests an separaten Aliquoten der gleichen verarbeiteten Probe durchgeführt.

Tabelle 20
Ergebnisübereinstimmung mit RCS innerhalb der Probe in SurePath
(RCS versus manuelles Assay)

Positive Übereinstimmung % 95 % KI (n/N)		Negative Übereinstimmung % 95 % KI (n/N)	
Alle positiv	Deutlich positive Untergruppe (RLU/CO \geq 2,5)	Alle negativ	Deutlich negative Untergruppe (RLU/CO < 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1.057/1.079 96,9, 98,7	98,7 1.050/1.064 97,8, 99,28

GRENZEN DES VERFAHRENS

In-vitro-Diagnostikum

Weitere Grenzen des Verfahrens, die für Tests mit großen Probendurchsätzen typisch sind, sind dem *Rapid Capture System Benutzerhandbuch* zu entnehmen.

- Der *digene* HC2 HPV DNA Test auf das humane Papillomavirus der Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68 wird nicht zur Evaluierung eines Verdachts auf sexuellen Missbrauch empfohlen.
- Die HPV-Infektionsprävalenz in einer Population kann sich auf die Leistung auswirken. Positive Vorhersagewerte nehmen beim Testen von Populationen mit einer niedrigen Prävalenz oder einzelnen Patientinnen ohne Infektionsrisiko ab.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer HPV-Infektion nicht aus, weil sehr geringe Infektionsgrade oder Probenentnahmefehler zu einem falsch-negativen Ergebnis führen können.
- Der *digene* HC2 HPV DNA Test unterscheidet zwischen 2 Gruppen von HPV-Typen: HPV 6/11/42/43/44 und 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Er unterscheidet nicht zwischen den Virustypen innerhalb dieser Gruppen.
- Der *digene* HC2 HPV DNA Test kann nur mit Zervixproben, die mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommen wurden, oder mit in STM entnommenen Biopsien oder mit Zervixproben verwendet werden, die mit einer besenartigen Entnahmevorrichtung oder einer Bürsten-/Spatelkombination entnommen und in PreservCyt Solution oder in SurePath Preservative Fluid gegeben wurden. Biopsieproben können nur getestet werden, wenn sie sofort in STM gegeben und bis zum Test bei -20 °C gelagert werden.
- Das *digene* HC2 DNA Collection Device darf nicht zur Probenentnahme an schwangeren Frauen verwendet werden.
- Eine Infektion mit HPV ist weder ein definitiver Indikator für eine hochgradige Zervixerkrankung, noch impliziert sie in allen Fällen, dass sich eine hochgradige Erkrankung oder ein Karzinom entwickeln wird.
- Eine geringfügige Kreuzhybridisierung zwischen den HPV-Typen 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 und MM9 und der High-Risk-HPV-Sonde ist vorhanden. Patientinnen, deren Proben hohe Konzentrationen dieser HPV-DNA-Typen enthalten, können fälschlicherweise zur Koloskopie überwiesen werden.³⁸
- Der *digene* HC2 HPV DNA Test ist zum Nachweis der Low-Risk- und High-Risk-HPV-Typen, einschließlich der Typen 39, 58, 59 und 68, ausgelegt. Von QIAGEN durchgeführte analytische Studien unter Verwendung klonierter HPV-Plasmid-DNA zeigen, dass diese Typen bei Konzentrationen im Bereich von 0,62 pg/ml bis 1,39 pg/ml mit diesem Assay nachgewiesen werden können. Dies entspricht den Nachweischarakteristika der anderen HPV-Typen, auf die der *digene* HC2 HPV DNA Test abzielt. QIAGEN konnte den Nachweis dieser HPV-Typen nur an einer begrenzten Anzahl klinischer Proben validieren. Aufgrund der geringen Prävalenz dieser Typen in der allgemeinen Population (wie von Bosch et. al.³⁶ gezeigt) wurden die Leistungsmerkmale des *digene* HC2 HPV DNA Tests zum Nachweis der HPV-Typen 39, 58, 59 und 68 nicht statistisch bestätigt.
- Wenn hohe Konzentrationen antifungaler Creme, empfängnisverhütender Gele oder Duschbad zum Zeitpunkt der Probenentnahme zum HPV-Test vorhanden sind, besteht eine Wahrscheinlichkeit, ein falsch-negatives Ergebnis zu erhalten, wenn diese Proben HPV-DNA-Konzentrationen enthalten, die RLU/CO-Werte in der Nähe des Assay-Grenzwertes ergeben.
- Eine Kreuzreaktivität zwischen der *digene* HC2 HPV DNA Testsonde und dem Plasmid pBR322 ist möglich. Das Vorliegen homologer pBR322-Sequenzen in Humangenitalproben wurde berichtet, und bei Vorliegen hoher bakterieller Plasmid-Konzentrationen können falsch-positive Ergebnisse auftreten.

LITERATUR

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17 bis 36. Von der Cancer Cells Conference 1985 in Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123 bis 132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951 bis 968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389 bis 396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784 bis 788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313 bis 324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560 bis 563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. Wissenschaftliche Veröffentlichung der IARC Nr. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212 bis 222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41 bis 45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671 bis 677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225 bis 229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246 bis 249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187 bis 190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073 bis 3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452 bis 1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925 bis 2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099 bis 3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829 bis 2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374 bis 384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328 bis 337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. 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 bis 1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762 bis 767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 20. Oktober 1984: *Seiten* 899 bis 901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400 bis 403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645 bis 651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6 bis 13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363 bis 366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61 bis 65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27 bis 40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419 bis 423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833 bis 836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158 bis 161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738 bis 744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC)

Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796 bis 802; 1995.

37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79 bis 88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252 bis 255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.;and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, Seiten 651 bis 655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29. A Supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, Juli-August, 1996:333 bis 341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S bis 18S.
43. Sehulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.

HILFE ZUR FEHLERSUCHE

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
<p>Beobachtung eines falschen oder keines Farbumschlags während der Denaturierung.</p>	<p>Das Denaturierungsreagenz wurde nicht vorschriftsmäßig vorbereitet oder</p> <p>das Denaturierungsreagenz wurde nicht zugefügt.</p> <p>Probe enthält Blut oder andere Materialien, die den Farbumschlag maskieren.</p> <p>Der pH der Probe kann ungewöhnlich sauer sein.</p>	<p>Sicherstellen, dass das Denaturierungsreagenz den Indikatorfarbstoff enthält und eine dunkle purpurrote Farbe aufweist.</p> <p>Sicherstellen, dass das Denaturierungsreagenz der Probe durch Abmessen des Probenvolumens (erwartet werden 1,5 ml) zugefügt wird. Wenn das Volumen anzeigt, dass kein Denaturierungsreagenz zugefügt wurde, die entsprechende Zugabe vornehmen, mischen und mit dem Assay fortfahren, wenn dann der richtige Farbumschlag beobachtet wird.</p> <p>Mit diesen Probentypen wird der beschriebene genaue Farbumschlag nicht erwartet; die Ergebnisse des <i>digene</i> HC2 HPV DNA Tests sollten nicht nachteilig beeinflusst werden.</p> <p>Wenn keine der anderen Ursachen zutrifft, können die Proben ungewöhnlich sauer sein, und der erwartete Farbumschlag tritt nicht auf. Vor Applikation von Essigsäure auf die Zervix eine neue Probe entnehmen, da sich ein unrichtiger pH der Probe nachteilig auf die Testergebnisse auswirkt.</p>
<p>Die Qualitätskontrollen ergeben falsche Ergebnisse.</p>	<p>Wahl eines für den Test inkorrekten Software-Protokolls (d. h. Verwendung des CPC-Protokolls für das Dual-Verfahren)</p> <p>Vertauschter Einsatz von QC1-LR und QC2-HR</p> <p>Vertauschter Einsatz von LRC und QC1-LR und/oder HRC und QC1-HR.</p>	<p>Wenn das Software-Protokoll für den durchzuführenden Test inkorrekt ist, sollte die Platte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe von Nachweisreagenz 2 mit dem korrekten Protokoll erneut gemessen werden.</p> <p>Proben erneut testen.</p> <p>Proben erneut testen.</p>
<p>Beobachtung eines falschen Farbumschlags während der Hybridisierung.</p>	<p>Unzureichendes Mischen des Sondengemischs mit denaturierten Kalibratoren, Qualitätskontrollen und/oder Proben, oder das Sondengemisch wurde nicht zugefügt, oder ein falsches Reagenzvolumen wurde zugefügt.</p> <p>Probe enthält Blut oder andere Materialien, die den Farbumschlag maskieren.</p> <p>Probe enthielt < 1.000 µl STM.</p>	<p>Das Gestell mit der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung oder das Mikroröhrchengestell für weitere 2 Minuten schütteln. Wenn Vertiefungen vorhanden sind, die weiterhin purpurrot bleiben, zusätzliche 25 µl entsprechendes Sondengemisch hinzufügen und gut mischen. Wenn nach Sondenzugabe und erneutem Mischen keine vorschriftsmäßige Farbänderung auftritt und die Probe kein Blut oder andere Materialien enthielt, die Probe erneut testen.</p> <p>Mit diesen Probentypen wird der beschriebene genaue Farbumschlag nicht erwartet; die Ergebnisse des <i>digene</i> HC2 HPV DNA Tests sollten nicht nachteilig beeinflusst werden.</p> <p>Volumen der Originalprobe prüfen. Das Volumen sollte 1.350 µl ±20 µl betragen (nach Entfernung von 75 µl für Low- und High-Risk-HPV-Sonden). Wenn das Volumen <1.350 µl ist, enthielt die Originalprobe <1.000 µl STM. Eine neue Probe entnehmen.</p>

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
<p>Der Assay entspricht nicht den Validationskriterien. Kein Signal im Kalibrator, in den Qualitätskontrollen oder in den Proben beobachtet.</p>	<p>Dem Sondenverdünnungsmittel wurde keine Sonde zugefügt.</p> <p>Kontamination der Sonde mit RNase während der Vorbereitung.</p> <p>Unzureichendes Mischen von Sonde und Sondenverdünnungsmittel.</p> <p>Unzureichendes Mischen von verdünnter Sonde und denaturierter Probe.</p> <p>Inkorrekte Zeitdauer oder Temperatur während des Hybridisierungsschrittes.</p> <p>Unzureichendes Mischen während des Capture-Schrittes.</p> <p>Vertauschte Sonden/Sondengemische/Hybridisierungsröhrchen.</p> <p>Die korrekte Menge Nachweisreagenz 1 wurde nicht zugefügt, oder es wurde nicht für die spezifizierte Zeitdauer inkubiert.</p> <p>Die korrekte Menge Nachweisreagenz 2 wurde nicht zugefügt, oder es wurde nicht für die spezifizierte Zeitdauer inkubiert.</p> <p>Funktionsstörung des Luminometers oder inkorrekte Programmierung.</p>	<p>Die Sondengemische vorbereiten, wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben. Die Röhrchen sorgfältig kennzeichnen.</p> <p>Beim Pipettieren der Sonde Filterspitzen mit Aerosolsperre verwenden und Handschuhe tragen. Nur saubere, neue Einmal-Reagenzbehälter verwenden.</p> <p>Nach Hinzufügen der Sonde zum Sondenverdünnungsmittel, für mindestens 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit des Vortexers sehr gründlich vermischen. Es muss ein sichtbarer Wirbel gebildet werden.</p> <p>Nach Hinzufügen des Sondengemisches und der Probe zu jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung oder zu jedem Mikroröhrchen auf dem Kreisschüttler I, eingestellt auf 1.100 ±100 U/min, für 3 ±2 Minuten schütteln. Prüfen, dass in jedem Röhrchen/jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte ein Farbumschlag von purpurrot nach gelb auftritt.</p> <p>Für 60 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C hybridisieren. Die Temperatur des Mikrotiterplatten-Inkubators I oder des Wasserbades prüfen. Sicherstellen, dass der Mikrotiterplatten-Inkubator I oder das Wasserbad zum Erwärmen der Proben auf die korrekte Temperatur eingestellt ist und vor Gebrauch 60 Minuten vorgewärmt wurde. Sicherstellen, dass der Wasserspiegel zum Erwärmen der Proben auf die korrekte Temperatur ausreichend ist. Die Wasserbäder sollten regelmäßig kalibriert werden.</p> <p>Auf dem Kreisschüttler I für 60 ±5 Minuten bei 20 bis 25 °C schütteln, wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben. Geschwindigkeit des Kreisschüttlers I durch Kalibration verifizieren, wie im Abschnitt Kalibration der Schüttelgeschwindigkeit des <i>Rotary Shaker I Benutzerhandbuchs</i> angegeben.</p> <p>Die Sondengemische sorgfältig vorbereiten und die Sondengemischröhrchen entsprechend kennzeichnen. Sorgfältig darauf achten, dass die richtige Sonde zu dem richtigen Satz Hybridisierungsröhrchen hinzugefügt wird. Sondengemischröhrchen, Hybridisierungsröhrchen und/oder Gestelle zur Minimierung potenzieller Verwechslungen kennzeichnen.</p> <p>75 µl Nachweisreagenz 1 mit einem 8-Kanal-Dispenser in jede Vertiefung pipettieren. Für 30 bis 45 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren.</p> <p>75 µl Nachweisreagenz 2 mit einem 8-Kanal-Dispenser in jede Vertiefung pipettieren. Für 15 bis 30 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren.</p> <p>Weitere Anweisungen sind im entsprechenden Benutzerhandbuch zu finden. Oder örtlichen QIAGEN-Vertreter anrufen.</p>

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
<p>Erhöhte RLU-Werte in den im Kalibrator, in den Qualitätskontrollen und/oder in den Proben (≥ 200RLU in vielen oder allen Vertiefungen). Der Assay kann den Validationskriterien nicht entsprechen.</p>	<p>Es wurde kein Denaturierungsreagenz zugefügt; oder es wurde ein inkorrektes Reagenzvolumen zugefügt; oder das Denaturierungsreagenz wurde unzureichend mit den Proben oder Kalibratoren vermischt.</p> <p>Lichtleck im Luminometer. Tür nicht abgedichtet. Die Abdichtung um die Tür ist schadhaft.</p> <p>Kontamination von Nachweisreagenz 2 oder der Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte durch Nachweisreagenz 1 oder exogene alkalische Phosphatase.</p> <p>Kontaminierter Waschpuffer.</p> <p>Kontaminierter automatischer Plattenspüler.</p> <p>Unzureichendes Spülen der Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte nach der Inkubation mit dem Nachweisreagenz 1.</p> <p>Kontamination der Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit Nachweisreagenz 1.</p> <p>Abtupfen der Hybridisierungslösung auf dem gleichen Bereich der Kimtowels-Wischtücher oder entsprechenden fusselfreien Papiertüchern.</p> <p>Verwendung inkorrekt Wischtücher zum Abtupfen.</p>	<p>Vor Zufügen von Denaturierungsreagenz sicherstellen, dass der Direktverdrängungssystem-Dispenser genaue Mengen abgibt. Kalibrierte Dispenser sind unerlässlich. Jedem Röhrchen die Hälfte des Denaturierungsreagenzvolumens zufügen und gut mischen. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse darauf achten, dass die Flüssigkeit die gesamte Innenfläche des Röhrchen benetzt. Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollten nach Zufügen von Denaturierungsreagenz nach purpurrot umschlagen.</p> <p>Die Hintergrundmessung des Luminometers durch Messung einer leeren Mikrotiterplatte prüfen. Höhere Werte als 50 RLUs deuten darauf hin, dass ein Lichtleck vorhanden ist. Weitere Anweisungen sind im entsprechenden Benutzerhandbuch zu finden. Oder örtlichen QIAGEN-Vertreter anrufen.</p> <p>Siehe Kontaminationstest in dieser Hilfe zur Fehlersuche.</p> <p>Siehe Kontaminationstest in dieser Hilfe zur Fehlersuche.</p> <p>Siehe Kontaminationstest in dieser Hilfe zur Fehlersuche.</p> <p>Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 6 Mal gründlich mit Waschpuffer spülen, Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen füllen oder den automatischen Plattenspüler verwenden. Nach dem Waschen sollte keine rosa Flüssigkeit in den Vertiefungen zurückbleiben. Anleitungen zum Testen auf Kontamination oder Funktionsstörungen sind im <i>Automated Plate Washer Benutzerhandbuch</i> zu finden.</p> <p>Sicherstellen, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Bei Verwendung von Nachweisreagenz 1 vorsichtig vorgehen. Aerosole vermeiden.</p> <p>Auf zuvor verwendeten Bereichen von Kimtowels-Wischtüchern oder den entsprechenden fusselfreien Papiertüchern nicht erneut abtupfen.</p> <p>Zum Abtupfen Kimtowels-Wischtücher oder entsprechende fusselfreie Papiertücher verwenden.</p>

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
<p>Niedrige Quotienten PC/NC oder eine hohe Anzahl schwach positiver Proben mit Quotienten <2,0 (>20 %). Der Assay kann den Validationskriterien nicht entsprechen.</p>	<p>Unzureichende Probenvorbereitung.</p> <p>Sonde unzureichend vermischt oder ungenügend Sonde zu den Assays hinzugefügt.</p> <p>Jedem Mikroröhrchen zur Hybridisierung wurde unzureichendes Volumen verdünnter Sonde zugefügt.</p> <p>Verlust der Aktivität von Nachweisreagenz 1.</p> <p>Unzureichendes Capture.</p> <p>Unzureichendes Spülen</p> <p>Kontaminierter Waschpuffer.</p>	<p>Das entsprechende Volumen Denaturierungsreagenz zufügen und auf dem Vortexer gründlich vermischen. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse darauf achten, dass die Flüssigkeit die gesamte Innenfläche des Röhrchen benetzt. Für Proben in PreservCyt Solution sicherstellen, dass vor der Denaturierungssinkubation vorschriftsmäßig gemischt wird und die erneute Suspension des Zellpellets abgeschlossen ist. Einzelheiten des Protokolls sind der <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit Gebrauchsanweisung zu entnehmen. Es sollte ein distinkter Farbumschlag von farblos nach purpurrot auftreten. Für 45 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C inkubieren.</p> <p>Die Sondenmische, wie beschrieben, vorbereiten. Auf dem Vortexer gründlich mischen; darauf achten, dass ein sichtbarer Wirbel entsteht. Die Sondenmische müssen zur Gewährleistung einer genauen Abgabe mit einem Direktverdrängungssystem-Dispenser oder einem Mehrkanal-Dispenser den Röhrchen zugefügt werden.</p> <p>Vor dem Zufügen des Sondenmischs zu der Mikrotiterplatte oder den Mikroröhrchen zur Hybridisierung sicherstellen, dass der 8-Kanal-Dispenser die genaue Menge abgibt. 25 µl Sondenmisch zu jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte bzw. zu jedem Mikroröhrchen mit denaturiertem Kalibrator, Qualitätskontrollen und klinischen Proben hinzufügen. Vor dem Hinzufügen des Sondenmischs zu den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung sicherstellen, dass der 8-Kanal-Dispenser die genaue Menge abgibt. Nach dem Hinzufügen und gründlichen Mischen des Sondenmischs sollte ein Farbumschlag von dunkel purpurrot nach gelb auftreten. Proben in PreservCyt Solution sollten nach rosa statt nach gelb umschlagen.</p> <p>Nachweisreagenz 1 bei 2 bis 8 °C lagern. Vor dem Verfallsdatum auf dem Etikett der Verpackung des Kits verwenden.</p> <p>Der Capture-Schritt sollte mit dem Kreisschüttler bei 1.100 ±100 U/min durchgeführt werden. Die Schüttlergeschwindigkeit durch Kalibration validieren.</p> <p>Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 6 Mal gründlich mit Waschpuffer spülen, die Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen oder den automatischen Plattenspüler verwenden.</p> <p>Siehe Kontaminationstest in dieser Hilfe zur Fehlersuche.</p>
<p>Serien positiver Proben mit annähernd gleichen RLU-Werten.</p>	<p>Kontamination der Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte während der Assay-Durchführung.</p> <p>Kontamination von Nachweisreagenz 2.</p> <p>Funktionsstörung des automatischen Plattenspülers.</p>	<p>Die Capture-Mikrotiterplatte während allen Inkubationen abdecken. Während der Durchführung des Assays dürfen die Röhrchen keinem Aerosol ausgesetzt werden. Bei der Durchführung puderfreie Handschuhe tragen.</p> <p>Darauf achten, dass die Stammlösung beim Pipettieren von Nachweisreagenz 2 in die Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte nicht kontaminiert wird. Eine Kontamination von Nachweisreagenz 2 durch Aerosole aus dem Nachweisreagenz 1 oder aus Laborstaub usw. ist zu vermeiden.</p> <p>Anleitungen zum Testen auf Kontamination oder Funktionsstörungen sind dem Kontaminationstest in dieser Hilfe zur Fehlersuche oder dem <i>Automated Plate Washer Benutzerhandbuch</i> zu entnehmen.</p>

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
<p>Breit gestreute VK (%) zwischen den Wiederholungsbestimmungen.</p>	<p>Ungenau pipettieren.</p> <p>Unzureichendes Vermischen.</p> <p>Unvollständige Überführung von Flüssigkeit aus den Mikroröhrchen zur Hybridisierung in die Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte.</p> <p>Unzureichende Spülbedingungen.</p> <p>Kontamination der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit Nachweisreagenz 1.</p>	<p>Den Dispenser überprüfen, um sicherzustellen, dass reproduzierbare Volumen abgegeben werden. Dispenser routinemäßig kalibrieren.</p> <p>Bei allen Schritten gründlich vermischen. Vor der Denaturierungsinubation und nach Zugabe des Sondengemischs auf dem Vortexer vermischen. Darauf achten, dass ein sichtbarer Wirbel entsteht.</p> <p>Beim Überführungsschritt aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung oder den Mikroröhrchen in die Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatte vorsichtig vorgehen, um zu gewährleisten, dass reproduzierbare Volumen überführt werden.</p> <p>Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit Waschlösung 6 Mal gründlich spülen, jedes Mal bis zum Überfließen füllen oder den automatischen Plattenspüler und die relevanten Protokolle für den automatischen Plattenspüler befolgen.</p> <p>Sicherstellen, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Bei Verwendung von Nachweisreagenz 1 vorsichtig vorgehen. Aerosole vermeiden.</p>

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
<p>Falsch-positive Ergebnisse aus bekannterweise negativen Proben.</p>	<p>Kontamination von Nachweisreagenz 2.</p> <p>Kontamination der Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit Nachweisreagenz 1.</p> <p>Abtupfen auf dem gleichen Bereich der Kimtowels-Wischtücher oder der entsprechenden fusselfreien Papiertücher über mehrere Zeilen.</p> <p>Unzureichende Probenvorbereitung.</p> <p>Unzureichende Spülbedingungen.</p> <p>Kontamination der Pipettenspitze mit nicht denaturiertem Material beim Transfer der denaturierten Probe in das Mikroröhrchen oder die Vertiefung der Mikrotiterplatte zur HPV-Sondenhybridisierung.</p>	<p>Zur Verhinderung einer Kreuzkontamination der Proben beim Aliquotieren von Nachweisreagenz 2 zwischen den Proben mit Vorsicht vorgehen. Wenn nur ein Teil des Kits verwendet wird, ist das für diesen Assay benötigte Volumen vor Befüllen des Dispensers in einen sauberen Einmal-Reagenzbehälter zu aliquotieren.</p> <p>Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 6 Mal gründlich mit Waschpuffer spülen, Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen füllen oder den automatischen Plattenspüler verwenden. Nach dem Waschen sollte keine rosa Flüssigkeit in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zurückbleiben.</p> <p>Nicht auf einem Bereich abtupfen, der bereits zuvor verwendet wurde, da es sonst zur Kontaminierung kommen kann.</p> <p>Das entsprechende Volumen Denaturierungsreagenz zufügen und auf dem Vortexer gründlich vermischen. Zur Verhinderung falsch-positiver Ergebnisse darauf achten, dass Flüssigkeit die gesamte Innenfläche des Röhrchens mit entweder dem manuellen Verfahren oder dem Verfahren mit MST-Vortexer 2 (für das manuelle Vortexer-Verfahren das Röhrchen einmal umdrehen) benetzt. Für Proben in PreservCyt Solution sicherstellen, dass vor der Denaturierungsinakubation vorschriftsmäßig gemischt wird und die erneute Suspension des Zellpellets abgeschlossen ist. Einzelheiten des Protokolls sind der <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit Gebrauchsanweisung zu entnehmen. Bei allen Proben sollte ein distinkter Farbumschlag nach dunkel-purpurrot auftreten. Für 45 ±5 Minuten bei 65 ±2° C inkubieren. Proben in SurePath müssen für 90 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C inkubiert werden.</p> <p>Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer 6 Mal gründlich spülen, indem die Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder der automatische Plattenspüler und die vorschriftsmäßigen Protokolle für den automatischen Plattenspüler befolgt werden.</p> <p>Der Denaturierungsschritt beim Verfahren zur Probenbehandlung muss durchgeführt werden, wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben. Unsachgemäßes Vermischen der Proben auf dem Vortexer oder Umdrehen und Schütteln der Röhrchen kann zur unvollständigen Denaturierung unspezifischer RNA:DNA-Hybride in den Zervixproben führen. Besonders bei Verwendung von Proben in PreservCyt Solution oder in SurePath Preservative Fluid ist ein Vorhandensein dieser Hybride an den Innenwänden des Probenaturierungsröhrchens wahrscheinlich. Um einen eventuellen Transfer dieses nicht denaturierten Zellmaterials zu vermeiden, darf die Mikropipettenspitze während des Transfers der denaturierten Probe in das Mikroröhrchen oder in die Vertiefung der Mikrotiterplatte zur HPV-Sondenhybridisierung die Wände des Probenaturierungsröhrchens nicht berühren.</p>

Beobachtung	Wahrscheinliche Ursachen	Lösungen
Erhöhte RLU-Werte (>200 RLU) des Negativkalibrators. Die Leistung des übrigen Assays ist wie erwartet.	<p>Das Nachweisreagenz 2 wurde bei einer höheren Temperatur als 20 bis 25 °C inkubiert.</p> <p>Das Nachweisreagenz 2 wurde länger als 30 Minuten inkubiert.</p> <p>Das Nachweisreagenz 2 oder der Waschpuffer wurde mit alkalischer Phosphatase oder Nachweisreagenz 1 inkubiert.</p>	<p>Den Test wiederholen und darauf achten, dass die Capture- und Nachweisschritte bei 20 bis 25 °C inkubiert werden.</p> <p>Die Platte nach 15 Minuten Inkubation (und nicht später als 30 Minuten Inkubation) bei 20 bis 25 °C messen.</p> <p>Siehe Kontaminationstest in dieser Hilfe zur Fehlersuche.</p>
Der Assay entspricht nicht den Validationskriterien. Erhöhter Quotient PC/NC	Vertauschter Einsatz von HRC und QC2-HR und/oder LRC und QC1-LR	Proben erneut testen. Die Etiketten der Fläschchen mit Kalibrator und Qualitätskontrolle aufmerksam lesen, um zu vermeiden, dass diese Reagenzien vertauscht eingesetzt werden.

KONTAMINATIONSTEST

Getestetes Reagenz	Kontaminationstestverfahren	Interpretation der Ergebnisse
Hinweis: Beim Pipettieren von Nachweisreagenz 2 vorsichtig vorgehen, um Kontamination zu vermeiden. Handschuhe tragen und Berühren der Arbeitsoberfläche mit den Pipettenspitzen vermeiden.		
Nachweisreagenz 2	<ul style="list-style-type: none"> 75 µl Nachweisreagenz 2 aus dem aliquotierten, angebrochenen oder dem originalen Fläschchen in eine leere Vertiefung einer Capture-Mikrotiterplatte geben. Für 15 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Vertiefungen der Mikrotiterplatte im Luminometer messen. <p>Hinweis: Nachweisreagenz 2 in Replikaten von 3 testen ermöglicht optimale Leistungsbewertung.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Der Kontrollwert mit Nachweisreagenz 2 muss <50 RLU betragen. Wenn die Werte mit Nachweisreagenz 2 <50 RLU betragen, kann das Nachweisreagenz 2 benutzt werden, um den Test zu wiederholen. Falls eine Kontamination vorliegt (>50 RLU), den Assay mit einem neuen Kit wiederholen.
Waschpuffersystem und/oder Wasserquelle	<ul style="list-style-type: none"> 75 µl Nachweisreagenz 2 in 4 separate Vertiefungen einer Capture-Mikrotiterplatte geben. Vertiefungen mit 1 bis 4 kennzeichnen. Vertiefung 1 dient als Kontrolle mit Nachweisreagenz 2. Aus dem Behälter mit Waschflüssigkeit 10 µl Waschpuffer in Vertiefung 2 pipettieren. Waschpuffer durch die Schläuche des Spülers laufen lassen. Aus den Schläuchen 10 µl Waschpuffer in Vertiefung 3 pipettieren. Aliquot des zur Herstellung des Waschpuffers verwendeten Wassers bereitstellen. Von diesem Wasser 10 µl in Vertiefung 4 pipettieren. Für 15 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Vertiefungen der Mikrotiterplatte im Luminometer messen. 	<ul style="list-style-type: none"> Die Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) muss <50 RLU betragen. Die RLU-Werte der Vertiefungen 2, 3 und 4 mit dem RLU-Wert der Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) vergleichen. Die individuellen RLU-Werte der Vertiefungen 2, 3 und 4 dürfen vom RLU-Wert der Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) um nicht mehr als 50 RLU abweichen. Werte, die um mehr als 50 RLU vom Wert der Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 abweichen, zeigen eine Kontamination an. Anweisungen zur Reinigung und Wartung des Plattenspülers finden sich im Abschnitt Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien.
Automatischer Plattenspüler	<ul style="list-style-type: none"> 75 µl Nachweisreagenz 2 in 5 separate Vertiefungen einer Capture-Mikrotiterplatte geben. Vertiefungen mit 1 bis 5 kennzeichnen. Vertiefung 1 dient als Kontrolle mit Nachweisreagenz 2. Aus dem mit <i>Wash</i> bezeichneten Behälter des Plattenspülers 10 µl Waschpuffer in Vertiefung 2 pipettieren. Aus dem mit <i>Rinse</i> bezeichneten Behälter des Plattenspülers 10 µl Spülflüssigkeit in Vertiefung 3 pipettieren. Die Taste Prime (Vorfüllen) auf der Tastatur des 	<ul style="list-style-type: none"> Die Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) muss <50 RLU betragen. Die RLU-Werte der Vertiefungen 2, 3, 4 und 5 mit dem RLU-Wert der Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) vergleichen. Die individuellen RLU-Werte der Vertiefungen 2, 3, 4 und 5 dürfen vom RLU-Wert der Kontrolle mit Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) um nicht mehr als 50 RLU abweichen.

	<p>Plattenspülers drücken, damit Waschpuffer durch die Leitungen fließt.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aus dem Behälter 10 µl Waschpuffer in Vertiefung 4 pipettieren. • Die Taste Rinse (Spülen) auf der Tastatur des Plattenspülers drücken, damit Spülflüssigkeit durch die Leitungen fließt. • Aus dem Behälter 10 µl Waschpuffer in Vertiefung 5 pipettieren. • Abdecken und für 15 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. • Vertiefungen der Mikrotiterplatte im Luminometer messen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Werte, die mehr als 50 RLU vom Wert der Kontrolle mit 2 abweichen, zeigen eine Kontamination des Plattenspülers an. • Siehe <i>Automated Plate Washer Benutzerhandbuch</i> Abschnitt Dekontaminationsverfahren.
--	--	--

QIAGEN KONTAKTDATEN

Benutzen Sie bitte das beigefügte Informationsblatt mit den Kontaktdaten, um sich mit dem für Sie zuständigen QIAGEN Außendienstmitarbeiter in Verbindung zu setzen.

Marken: QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); CDP-Star® (Tropix, Inc.); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Excel®, Microsoft® (Microsoft Corporation); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.

Dieses Produkt und die zugehörigen Anwendungsverfahren sind durch ein oder mehrere der folgenden Patente geschützt:

US HPV-Patentnummern

5,643,715 • 5,712,092 • 5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173 • 6,107,086

US Hybrid Capture-Patentnummer

6,228,578B1

digene HC2 HPV DNA Test, Zusammenfassung

WICHTIG: Vor Gebrauch dieser Zusammenfassung ist es wichtig, dass der Anwender mit den einzelnen Verfahrensschritten gründlich vertraut ist.

Durchführung

DENATURIERUNG (Für Proben in PreservCyt Solution, siehe digene HC2 Sample Conversion Kit Gebrauchsanweisung)	<p style="text-align: center;">Manuelles Vortex-Verfahren</p> <p>Mikroröhrchen zur Hybridisierung kennzeichnen. Denaturierungsreagenz vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben pipettieren.</p> <p>Jede Probe, jeden Kalibrator und jede Qualitätskontrolle 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit einzeln auf dem Vortexer vermischen (nähere Einzelheiten siehe diese Gebrauchsanweisung). Prüfen, dass alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 45 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C inkubieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Das HPV-Sondengemisch vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓</p>	<p style="text-align: center;">Verfahren mit Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2</p> <p>Die Hybridisierungsplatte kennzeichnen. Denaturierungsreagenz vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben pipettieren.</p> <p>Prüfen, dass alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Das Gestell mit Folie oder einem Verschlussdeckel abdecken.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 10 Sekunden auf dem Vortexer vermischen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 45 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C inkubieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>HPV-Sondengemisch vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
HYBRIDISIERUNG Kombinationssonden-Cocktail-Verfahren Dual-Sondenverfahren	<p style="text-align: center;">Wasserbad-Verfahren</p> <p>Die denaturierte Probe gut mischen und 75 µl in die Röhrchen pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 10 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>25 µl Kombinationssonden-Cocktail in Mikroröhrchen zur Hybridisierung pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">ODER</p> <p>Die denaturierte Probe gut mischen und 75 µl in „LR“-Röhrchen pipettieren. Die denaturierte Probe gut mischen und 75 µl in „HR“-Röhrchen pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 10 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>25 µl LowRisk-HPV-Sondenmischung in „LR“-Röhrchen pipettieren. 25 µl High-Risk-HPV-Sondenmischung in „HR“-Röhrchen pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Die Mikroröhrchen mit einer Plattenabdeckung abdecken und für 3 ±2 Minuten auf einem Kreisschüttler I bei 1.100 ±100 U/min schütteln. Prüfen, dass alle Röhrchen eine gelbe Farbe aufweisen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 60 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C inkubieren. Capture-Mikrotiterplatte vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓</p>	<p style="text-align: center;">Mikrotiterplatteninkubator-I-Verfahren</p> <p>Die denaturierte Probe gut mischen und 75 µl in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 10 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>25 µl Kombinationssonden-Cocktail in Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">ODER</p> <p>Denaturierte Probe gut mischen und 75 µl in „LR“-Vertiefungen der Mikrotiterplatte und 75 µl in „HR“-Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 10 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>25 µl Low-Risk-HPV-Sondenmischung in „LR“-Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. 25 µl High-Risk-HPV-Sondenmischung in „HR“-Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Mikrotiterplatte mit einem Plattendeckel abdecken und auf einem Kreisschüttler I für 3 ±2 Minuten bei 1.100 ±100 U/min schütteln. Prüfen, dass alle Röhrchen eine gelbe Farbe aufweisen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 60 ±5 Minuten bei 65 ±2 °C inkubieren. Capture-Mikrotiterplatte vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
HYBRID CAPTURE	<p>Inhalt aus jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte zur Hybridisierung oder jedem Mikroröhrchen mit einem 8-Kanal-Dispenser in die entsprechende Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. Mit einem Plattendeckel oder einer Plattenabdeckung abdecken.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Für 60 ±5 Minuten bei 20 bis 25 °C bei 1.100 ±100 U/min schütteln. Waschpuffer vorbereiten.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten sind in dieser Gebrauchsanweisung zu finden).</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
HYBRIDNACHWEIS	<p>In jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte 75 µl Nachweisreagenz 1 pipettieren. Capture-Mikrotiterplatte mit einem Plattendeckel, Parafilm oder entsprechendem Material abdecken. Für 30 bis 45 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren. Platte mit dem gewünschten Verfahren spülen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
SPÜLEN	<p style="text-align: center;">Manuelles Spülverfahren</p> <p>Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten sind in dieser Gebrauchsanweisung zu finden).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>6 Mal spülen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Auf fusselfreien Papiertüchern abtupfen</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Verfahren mit dem automatischen Plattenspüler</p> <p>Die Platte auf den Spüler setzen und zum Beginn „START/STOP“ drücken.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Mit nächstem Schritt fortfahren.</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓</p>
SIGNALVERSTÄRKUNG	<p>In jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte 75 µl Nachweisreagenz 2 pipettieren. Für 15 bis 30 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubieren.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
MESSEN	<p>Capture-Mikrotiterplatte im DML-Instrument messen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Assay validieren und Probenergebnisse interpretieren.</p>	