



Hybrid Capture<sup>®</sup> 2

GC-ID DNA Test

Gebrauchsanweisung

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

Ein *In Vitro* Nukleinsäurehybridisierungsassay mit Signalamplifikation mithilfe von Mikrotiterplatten-Chemilumineszenz zum qualitativen DNA-Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae* (GC) in Zervixproben.

Zur Verwendung mit:

*digene*<sup>®</sup> HC2 DNA Collection Device  
*digene*<sup>®</sup> Female Swab Specimen Collection Kit  
Hologic PreservCyt<sup>®</sup>-Lösung

### WICHTIGSTE VERÄNDERUNGEN SEIT DER LETZTEN ÜBERARBEITUNG DES BEIPACKZETTELS

1. Aktualisierter Markenname
2. Text und Daten zum Reflextest entfernt

Nur zum Laborgebrauch durch geschultes und geprüftes Laborpersonal. Diese Anleitung ist vor Durchführung des Tests sorgfältig zu lesen.



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



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Str. 1  
D-40724 Hilden  
Germany

IVD



REF 5140-1330

©2011 QIAGEN

L2172DE Rev. 3



Das CE-Zeichen sagt aus, dass der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID den Anforderungen der Richtlinie 98/79/EG über In-Vitro-Diagnostika entspricht

# INHALT

BEZEICHNUNG UND VERWENDUNGSZWECK .....	1
ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG .....	1
VERFAHRENSPRINZIP .....	1
MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN .....	3
ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN.....	4
WARN- UND SICHERHEITSHINWEISE .....	5
SICHERHEITSMASSNAHMEN .....	5
INFORMATIONEN ZU SICHERHEITS- UND GESUNDHEITSRISIKEN .....	6
IM UMGANG MIT DEM TESTSYSTEM ZU BEACHTENDE VORSICHTSMASSNAHMEN .....	7
VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN .....	8
ENTNAHME UND HANDHABUNG DER PROBEN.....	10
ZERVIXPROBEN IN STM.....	10
ZERVIXPROBEN IN HOLOGIC PRESERVCYT-LÖSUNG.....	11
TESTVERFAHREN.....	11
TESTS MIT GROSSEM PROBENDURCHSATZ MITTELS RAPID CAPTURE-SYSTEM .....	11
MANUELLES VERFAHREN .....	11
DENATURIERUNG.....	12
verfahren zur vorbereitung von kalibratoren, qualitätskontrollen und stm-proben .....	13
verfahren zur vorbereitung von proben in PreservCyt-lösung .....	14
MISCHEN UND DENATURIEREN .....	16
optionaler haltepunkt.....	17
HYBRIDISIERUNG .....	18
HYBRID-CAPTURE .....	19
HYBRIDNACHWEIS .....	20
SPÜLEN .....	20
VERFAHREN MIT AUTOMATISCHEM PLATTENSPÜLER .....	20
MANUELLES SPÜLVERFAHREN.....	21
SIGNALAMPLIFIKATION.....	22
VERIFIZIERUNGSKRITERIEN FÜR DIE ASSAY-KALIBRIERUNG .....	22
BERECHNUNG DER CUTOFF-WERTE .....	24
QUALITÄTSKONTROLLE .....	25
INTERPRETATION DER PROBENERGEBNISSE .....	25
VERFAHRENS-EINSCHRÄNKUNGEN.....	26
ERWARTETE ERGEBNISSE .....	27
PRÄVALENZ.....	27
POSITIVER UND NEGATIVER PRÄDIKTIVER WERT .....	27
HÄUFIGKEITSVERTEILUNG: RLU/CO-ERGEBNISSE AUS DEM DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID.....	27

LEISTUNGSMERKMALE.....	28
KLINISCHE STUDIENERGEBNISSE FÜR DIE VERSCHIEDENEN PROBENTYPEN.....	28
REPRODUZIERBARKEIT.....	32
GENAUIGKEIT.....	34
genauigkeit mit PreservCyt-proben.....	35
ANALYTISCHE SENSITIVITÄT.....	36
zusätzliche überlegungen zu PreservCyt-proben.....	37
ANALYTISCHE SPEZIFITÄT.....	39
HOMOLOGIE DER SONDEN MIT GESAMTPLASMID-DNA UND GENOMISCHER DNA.....	41
WIRKUNG VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF STM-PROBEN.....	41
WIRKUNG VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN PRESERVCYT- LÖSUNG.....	42
GENAUIGKEIT DES DNA-TESTS <i>digene</i> HC2 GC-ID AM CUTOFF MIT KLINISCHEN PROBEN IN STM.....	43
BISHERIGE VERFAHRENSWEISE.....	44
ÄQUIVALENZ ZWISCHEN PROBEN IN STM- UND PRESERVCYT-LÖSUNG.....	44
LITERATUR.....	46
ANLEITUNG ZUR FEHLERSUCHE.....	47
KONTAMINATIONSTEST.....	52
QIAGEN -KONTAKTINFORMATIONEN.....	53
ZUSAMMENFASSUNG DES DNA-TESTS <i>digene</i> HC2 GC-ID.....	54

## BEZEICHNUNG UND VERWENDUNGSZWECK

Der DNA-Test *digene*<sup>®</sup> Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (HC2) GC-ID ist ein *In-Vitro*-Nukleinsäurehybridisierungsassay mit Signalamplifikation mithilfe von Mikroplatten-Chemilumineszenz zum qualitativen DNA-Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae* in Zervixproben, entnommen mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device (bestehend aus Zervixbürste und *digene* Specimen Transport Medium [Probentransportmedium, STM]), und in Zervixproben, entnommen mit dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (Abstrichtupfer und STM), oder in Proben, die mithilfe eines besenähnlichen Entnahmegäräts entnommen und in Hologic PreservCyt<sup>®</sup>-Lösung gegeben wurden. Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID ist indiziert für die Verwendung bei symptomatischen oder asymptomatischen Patientinnen als Nachweis einer Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae*.

Für Tests mit großem Probendurchsatz kann der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID mithilfe des Rapid Capture<sup>®</sup>-Systems (RCS) durchgeführt werden.

Zur Verwendung in der *In-Vitro*-Diagnostik

IVD

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

*Neisseria gonorrhoeae* sind unbewegliche gramnegative Diplokokken mit recht komplexen Wachstumsanforderungen. Sie sind aerob und vermehren sich optimal bei Temperaturen zwischen 35 und 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt zwischen 3 und 7 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ≥ 70 %. Der vorläufige Nachweis von *Neisseria gonorrhoeae* wird klassisch durch Isolation von Organismen in Kulturen aus klinischen Proben unter Verwendung einer Gram-Färbung zur morphologischen Untersuchung geführt. Definitive Diagnosen können mit einem positiven Oxidase- bzw. Katalasetest der Kultur gestellt werden. Die Ergebnisse können über Kohlenhydratabbau-, Agglutinations- und Zuckerfermentierungstests untermauert werden. Noch eindeutigere *Neisseria gonorrhoeae*-Tests sind z. B. der Antigennachweis sowie der Nukleinsäure-Sondentest. Es konnte gezeigt werden, dass zum Nachweis von Gonokokken in männlichen Urin- und Morgenurinproben ein Enzym-Immunoassay genauso empfindlich und spezifisch wie die Gram-Färbung ist; er zeigt lediglich eine verringerte Empfindlichkeit, wenn er auf Endozervixproben angewendet wird.<sup>1,2</sup> Da der Antigennachweistest mit kommensaler *Neisseria* und ähnlichen Mikroorganismen kreuzreagieren kann<sup>3</sup>, darf dieser Test nur zur vorläufigen Diagnosestellung verwendet werden.<sup>3</sup>

Erst seit Kurzem werden Nukleinsäurehybridisierungsassays verwendet, um *Neisseria gonorrhoeae* in sowohl Endozervixproben als auch männlich-urethralen Proben aus Risikopopulationen nachzuweisen.

## VERFAHRENSPRINZIP

Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID stützt sich auf die *digene* Hybrid Capture 2-Technologie und ist ein Nukleinsäurehybridisierungsassay mit Signalamplifikation auf der Grundlage eines Mikroplatten-Chemilumineszenz-Nachweises. Die Ziel-DNA enthaltenden Proben hybridisieren mit einer spezifischen GC-RNA-Sonde. Die hierbei entstehenden RNA:DNA-Hybride werden auf eine mit für RNA:DNA-Hybride spezifischen Antikörpern beschichtete Mikroplatte aufgetragen. Die immobilisierten Hybride werden dann mit für RNA:DNA-Hybriden spezifischen, alkalischen phosphatasekonjugierten Antikörpern zur Reaktion gebracht und mit einem chemilumineszierenden Substrat nachgewiesen. Mit jedem Antikörper sind verschiedene alkalische Phosphatasemoleküle konjugiert. An jedes eingefangene Hybridmolekül binden sich mehrfach konjugierte Antikörper, was zu einer beträchtlichen Signalamplifikation führt. Wird das Substrat durch die gebundene alkalische Phosphatase gespalten, so wird Licht frei, das in relativen Lichteinheiten (engl. Relative Light Units, RLUs) mit einem Luminometer gemessen wird. Die entstehende Lichtintensität ist der Gradmesser für das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Ziel-DNA in der Probe.

Eine RLU-Messung, die größer ist als ein bestimmtes Verhältnis zum positiven Cutoff-Wert (CO) bzw. diesem entspricht, weist auf das Vorhandensein von GC-DNA in der Probe hin. Eine RLU-Messung, die unter einem bestimmten Verhältnis zum positiven Cutoff-Wert liegt, weist auf das Nichtvorhandensein von GC-DNA hin bzw. darauf, dass die Menge der GC-DNA unter der Nachweisgrenze des Assays liegt.

Die GC-Sonde enthält ein Sondengemisch, das so zusammengestellt wurde, dass die Kreuzreaktivität mit DNA-Sequenzen aus menschlichen Zellen, anderen Bakterienarten oder von *Neisseria gonorrhoeae* abweichenden Neisseria-Arten unterbunden bzw. minimiert wird. Die im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID enthaltene GC-Sonde ist komplementär zu ca. 9.700 bp bzw. 0,5 % der genomischen DNA von *Neisseria gonorrhoeae* ( $1,9 \times 10^6$  bp).<sup>4</sup> Eine Sonde ist komplementär zu 100 % des kryptischen Plasmids mit 4200 bp.

Tests mit großem Probendurchsatz mittels des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID können mit einem universellen automatischen Pipettier- und Verdünnungssystem durchgeführt werden, das auch als Rapid Capture System (RCS) bezeichnet wird. Dieses Gerät verarbeitet mit einem für den DNA-Test *digene* HC2 GC-ID spezifischen Programm bis zu 352 Proben in acht Stunden. Damit Tests mit großem Probendurchsatz getätigt werden können, werden alle Verfahrensschritte des Assays vom RCS mit Ausnahme von Probenidentifizierung, Chemilumineszenzsignalnachweis und Erstellung der Ergebnisberichte übernommen.

## MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Es befinden sich 96 Tests in einem DNA-Test-Kit *digene* HC2 GC-ID (REF 5140-1330). Die Anzahl der Patientenergebnisse richtet sich nach der Benutzungshäufigkeit eines Kits:

Einmalige Benutzung = 88 Patientenergebnisse  
 Zweimalige Benutzung = 80 Patientenergebnisse  
 Dreimalige Benutzung = 72 Patientenergebnisse  
 Viermalige Benutzung = 64 Patientenergebnisse

<b>Indikatorfarbstoff</b> <b>INDIC</b> Enthält 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 0,35 ml
<b>Denaturierungsreagenz*</b> <b>REAG DENAT</b> Verdünnte Natriumhydroxid-Lösung (NaOH).	1 x 50 ml
<b>Sondenverdünnungsmittel*</b> <b>DIL PROBE</b> Gepufferte Lösung mit 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 5 ml
<b>GC-Sonde</b> <b>PROBE GC</b> GC-RNA-Sonde in gepufferter Lösung.	1 x 200 µl
<b>Negativkalibrator (NC)</b> <b>CAL -</b> Träger-DNA in Probentransportmedium (STM) mit 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 2 ml
<b>GC-Positivkalibrator (PC)</b> <b>CAL GC +</b> 1,0 pg/ml klonierte GC-DNA und Träger-DNA in STM mit 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 1 ml
<b>CT-Qualitätskontrolle (QC CT)</b> <b>QC CT</b> 5,0 pg/ml klonierte CT-DNA und Träger-DNA in STM mit 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 1 ml
<b>GC-Qualitätskontrolle (QC GC)</b> <b>QC GC</b> 5,0 pg/ml klonierte GC-DNA und Träger-DNA in STM mit 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 1 ml
<b>Capture-Mikrotiterplatte</b> <b>PLATE CAPTURE</b> Beschichtet mit polyklonalen Ziege-Anti-RNA:DNA-Hybrid-Antikörpern.	Jeweils 1
<b>Nachweisreagenz 1</b> <b>REAG DET 1</b> Mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper gegen RNA:DNA-Hybride in gepufferter Lösung mit 0,05 % m/V Natriumazid.	1 x 12 ml
<b>Nachweisreagenz 2</b> <b>REAG DET 2</b> CDP-Star® mit Emerald II (Chemilumineszenzsubstrat).	1 x 12 ml
<b>Waschpufferkonzentrat*</b> <b>BUF WASH X 30</b> Enthält 1,5 % m/V Natriumazid.	1 x 100 ml

\*Für Informationen zu Sicherheit- und Gesundheitsrisiken siehe den Abschnitt „Warn- und Sicherheitshinweise“ dieses Handbuchs.

## ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

### Ausrüstungsgegenstände und Zubehörteile<sup>A</sup> des Hybrid Capture-Systems für die *In-Vitro*-Diagnostik

*digene* Hybrid Capture 2-System („*digene* HC2-System“), bestehend aus einem von QIAGEN zugelassenen Luminometer („Luminometer“), einem von QIAGEN zugelassenen PC mit Peripheriegeräten (Bildschirm, Tastatur, Maus, Drucker und Drucker Kabel), der *digene* HC2-System-Software („*digene* Testanalyse-Software“), den Testprotokollen des *digene* HC2-Systems für CT/GC, der LumiCheck-Platten-Software und dem Benutzerhandbuch zur *digene* HC2-System-Software

Rotationsschüttler I zum Hybrid Capture-System

Mikrotiterplatteninkubator I zum Hybrid Capture-System

Automatischer Plattenspüler zum Hybrid Capture-System

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (optional) zum Hybrid Capture-System<sup>F</sup>

Konversionsgestell mit Deckel (optional bei manueller Anwendung; erforderlich bei Anwendung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID auf einem Rapid Capture System mit PreservCyt-Proben)

*digene*-Probengestell mit Gestelldeckel (optional bei manueller Anwendung; erforderlich bei Anwendung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID auf einem Rapid Capture System mit *digene* HC2-Proben, die mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommen wurden)

EXPAND-4 Dispenser mit Gestell (optional)<sup>C</sup>

*digene* HC2 DNA Collection Device<sup>D</sup>

*digene* Female Swab Specimen Collection Kit (besteht aus 2 Tupfern und *digene* Specimen Transport Medium)<sup>B</sup>

Spender für Probenröhrchen-Verschlußfolie und Folien-Schneidevorrichtung (optional, verwendet mit dem Multi-Specimen Tube Vortexer 2)

Rapid Capture-System (optional für Tests mit großem Probendurchsatz)<sup>E</sup>

Wascheinrichtung

Hybridisierungsmikrotiterplatten

Mikrotiterplattendeckel

Leere Mikrotiterplattenstrips (erhältlich bei Costar, Modell-Nr. 2581); optional bei Verwendung des automatischen Plattenspülers I

Extralange Pipettenspitzen zum Entnehmen der Probe

Probeentnahmeröhrchen

Probenröhrchengestell

Schraubverschlüsse für Probesammelröhrchen

Einwegbehälter für Nachweisreagenzien

DuraSeal<sup>®</sup>-Film zum Verschließen der Röhrchen

### Allgemeine Labor-Ausrüstungsgegenstände und –zubehörteile

Ausreichend großes Wasserbad bei  $65 \pm 2$  °C für ein Konversionsgestell (36 x 21 x 9 cm) oder zwei *digene* Probengestelle (jeweils 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)

Mikrozentrifuge (optional) zum Zentrifugieren von Probenröhrchen, um das Sondenvolumen zu maximieren

Vortexmischer mit Zusatzschale

Einkanal-MikroDispenser; einstellbar auf Volumina von 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl

Direktverdränger wie etwa Eppendorf Repeater<sup>®</sup> Multipette oder gleichwertige Pipette

8-Kanal-Dispenser, einstellbar auf Volumina von 25 - 200 µl

Timer

Natriumhypochlorit-Lösung, 0,5 % Endkonzentration (aus Haushaltsbleiche)

Parafilm<sup>®</sup> oder gleichwertiges Produkt

Aerosoldichte Einweg-Pipettenspitzen für den 1-Kanal-Dispenser (20 - 200 µl und 200 - 1000 µl)

Einwegspitzen für die Eppendorf Repeater<sup>®</sup> Multipette (25 und 500 µl)

Einwegspitzen für 8-Kanal-Dispenser (25 - 200 µl)

Kimtowels<sup>®</sup>-Wischtücher oder gleichwertige fusselfreie Papiertücher

Einweg-Arbeitstischabdeckung

Puderfreie Handschuhe

Rundboden-Polypropylen-Röhrchen (5 ml bzw. 15 ml) mit Schnappverschluss (zur Sondenverdünnung)

2,0-ml-Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen mit Verschlussdeckeln

### Zusätzliche Geräte und Zubehörteile für die Behandlung von Proben in PreservCyt-Lösung

Zentrifuge mit Ausschwingrotor, bis zu  $2900 \pm 150$  xg, für konische 10-ml- oder 15-ml-Polypropylenröhrchen

Serologische oder Transferpipetten (5 ml)

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

Einwegspitzen für die Eppendorf Repeater Multipette (50 und 100 µl)

#### Für manuelles Vortexverfahren:

*digene* HC2-Probenkonversionsröhrchen (15 ml, konisch)<sup>F</sup>, konische 10-ml-Sarstedt<sup>®</sup>-Röhrchen mit Deckeln oder 15-ml-Rundboden-Polypropylenröhrchen mit Deckeln der Marken VWR<sup>®</sup> oder Corning<sup>®</sup>

Röhrchenhalter für konische 10- oder 15-ml-Röhrchen

#### Für Vortexer 2-Verfahren mit Multi-Specimen Tubes:

*digene* HC2-Probenkonversionsröhrchen (15 ml, konisch)<sup>F</sup>

Vortexer 2 für Multi-Specimen Tubes (MST)

Konversionsgestell mit Deckel (für konische 15-ml-Röhrchen)

Spender für Probenröhrchen-Verschlußfolie und Schneidevorrichtung

DuraSeal<sup>®</sup>-Film zum Verschließen der Röhrchen (zum Gebrauch mit MST Vortexer 2)

- <sup>A</sup> Bei QIAGEN sind nur für DNA-Tests *digene* HC2 CT/GC validierte Ausrüstungsgegenstände und Zubehörteile erhältlich.
- <sup>B</sup> Ist bei halbautomatischer RCS-Anwendung ebenfalls erforderlich.
- <sup>C</sup> Kundenanfertigung. Es können auch andere selbst erweiterbare Mehrkanal-Pipetten verwendet werden, sofern im erweiterten Zustand noch Abmessungen von 3,2 cm zwischen den Spitzen möglich sind. Alternativ kann eine Einkanal-Pipette mit einem Pipettiervolumen von 75 µl eingesetzt werden.
- <sup>D</sup> Die Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID wurden ausschließlich mit den beiden genannten Entnahme-Kits ermittelt.
- <sup>E</sup> Anweisungen zum Einsatz dieses Systems für Tests mit großem Probendurchsatz finden Sie in der Gebrauchsanweisung für das Rapid Capture-System.
- <sup>F</sup> Die bei QIAGEN erhältlichen *digene* HC2-Probenkonversionsröhrchen (der Marken VWR oder Corning<sup>®</sup>) müssen benutzt werden, damit bei Anwendung des Vortexer-Verfahrens mit Multi-Specimen Tubes eine saubere Assaydurchführung gewährleistet ist.

## WARN- UND SICHERHEITSHINWEISE

LESEN SIE VOR VERWENDUNG DES TESTS SÄMTLICHE ANWEISUNGEN SORGFÄLTIG DURCH.

### SICHERHEITSMASSNAHMEN

SÄMTLICHE PROBEN sind als potenziell infektiös anzusehen. Eine Infektion durch Proben kann durch keines der bekannten Testverfahren sicher verhindert werden. Es wird empfohlen, Humanproben gemäß den einschlägigen nationalen bzw. regionalen Richtlinien zur Einhaltung biologischer Sicherheit zu behandeln.<sup>5,6,7,8</sup> Halten Sie sich beim Umgang mit Substanzen, die infektiöses Material enthalten oder enthalten könnten, an diese Richtlinien zur Einhaltung biologischer Sicherheit. Zu diesen Sicherheitsmaßnahmen gehören u. a.:

1. Es darf nicht mit dem Mund pipettiert werden.
2. In Räumen, in denen mit Reagenzien oder Proben umgegangen wird, darf nicht geraucht, gegessen oder getrunken werden.
3. Beim Umgang mit Reagenzien oder Proben sind ungepuderte Einweghandschuhe zu tragen. Nach dem Test sind die Hände gründlich zu waschen.
4. Sämtliche Probenspritzer sind mit einem Tuberkelbakterien abtötenden Desinfektionsmittel wie etwa 0,5 % (V/V) Natriumhypochlorit oder einem anderen geeigneten Desinfektionsmittel zu desinfizieren.<sup>9,10</sup>
5. Sämtliche Proben, Nachweisreagenzien und andere potenziell kontaminierte Materialien sind gemäß den nationalen und den vor Ort geltenden Bestimmungen zu dekontaminieren.<sup>11,12</sup>

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid. Es liegen Hinweise dafür vor, dass Natriumazid in den Laborabflussrohren explosives Blei- oder Kupferazid bildet. Diese Azide können bei Erschütterung explodieren, z. B. durch Hammerschläge. Zur Vorbeugung der Bildung von Blei- oder Kupferazidablagerungen sind die Abflussleitungen nach dem Entsorgen von natriumazidhaltigen Lösungen gründlich durchzuspülen. Zur Beseitigung von Kontaminationen in alten Abflussleitungen, die Azidablagerungen enthalten könnten, gibt das US-amerikanische National Institute for Occupational Safety and Health folgende Empfehlungen: (1) Flüssigkeit vom Auffanggefäß mit einem Gummi- oder Kunststoffschlauch absaugen, (2) 10 %ige Natriumhydroxydlösung einleiten, (3) diese 16 Stunden einwirken lassen, (4) gründlich mit Wasser ausspülen.

## INFORMATIONEN ZU SICHERHEITS- UND GESUNDHEITSRISIKEN

Die folgenden Materialien wurden entsprechend den Anforderungen der EG-Richtlinien 2001/59/EG und 99/45/EG bewertet.



T

### **Waschpufferkonzentrat. Enthält Natriumazid: Giftig (T)**

R25: Giftig beim Verschlucken.

R52/53: Schädlich für Wasserorganismen; kann in Gewässern langfristige schädliche Wirkungen haben.

S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).



C

### **Denaturierungsreagenz. Enthält Natriumhydroxid: Ätzend (C)**

R35: Stark ätzend.

S26: Bei Augenkontakt gründlich mit Wasser ausspülen und Arzt aufsuchen.

S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).



Xi

### **Sondenverdünnungsmittel. Enthält BES und Essigsäure: Reizend (Xi)**

R36/38: Reizt die Augen und die Haut.

S26: Bei Augenkontakt gründlich mit Wasser ausspülen und Arzt aufsuchen.

S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

24-STUNDEN-GIFTNOTRUF

**IM NOTFALL KÖNNEN SIE 24 STUNDEN AM TAG MEDIZINISCHE INFORMATIONEN (IN DEUTSCHER, ENGLISCHER UND FRANZÖSISCHER SPRACHE) ERHALTEN ÜBER DEN**

**GIFTNOTRUF DER BERATUNGSSTELLE BEI VERGIFTUNGEN IN MAINZ (DEUTSCHLAND)**

TEL.: +49-(0)6131-19240

**Bei Tests mit diesem Assay mit großem Probendurchsatz beachten Sie die Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung für das Rapid Capture-System.**

## IM UMGANG MIT DEM TESTSYSTEM ZU BEACHTENDE VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zur Verwendung in der *In-Vitro*-Diagnostik
2. Zervixbürste darf nicht bei Schwangerschaft verwendet werden.
3. Die Nachweisreagenzien dürfen nicht nach dem neben dem Symbol  auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum benutzt werden.
4. Ein Über- bzw. Unterschreiten der angegebenen Zeit- bzw. Temperaturgrenzen bei der Durchführung des Assays kann zu unbrauchbaren Ergebnissen führen. Assays, die nicht innerhalb der gesetzten Zeit- und Temperaturgrenzen ablaufen, sind ungültig und müssen wiederholt werden.
5. Das Verfahren für den DNA-Test *digene* HC2 GC-ID, die Verifizierungskriterien für die Assaykalibrierung, die Qualitätskontrolle und die Interpretation der Probenergebnisse sind zum Erreichen sicherer Testergebnisse strikt einzuhalten.
6. Es ist unbedingt exakt das angegebene Nachweisreagenzvolumen zu pipettieren und nach dem Hinzugeben des Nachweisreagenz gut zu mischen. Bei Nichtbeachtung besteht die Möglichkeit fehlerhafter Testergebnisse. Das tatsächliche Auftreten der angegebenen Farbumschläge bestätigt, dass diese Bedingungen eingehalten wurden.
7. Diese Komponenten sind als eine Einheit getestet worden. Komponenten anderer Herkunft oder aus anderen Chargen dürfen **nicht** untereinander ausgetauscht werden.
8. Nukleinsäuren sind sehr empfindlich gegenüber Abbau durch in der Umgebung vorhandene Nukleasen. Nukleasen kommen auf der menschlichen Haut und auf Oberflächen oder Materialien vor, die von Personen angefasst werden. Arbeitsflächen reinigen und mit Einwegabdeckungen versehen **und bei der Durchführung aller Assay-Schritte puderfreie Handschuhe tragen**.
9. Darauf achten, dass eine Kontamination der Capture-Mikrotiterplatte und des Nachweisreagenz 2 mit exogener alkalischer Phosphatase während der Assay-Durchführung vermieden wird. Zu Substanzen, die gegebenenfalls alkalische Phosphatase enthalten könnten, zählen das Nachweisreagenz 1, Bakterien, Speichel, Haare und Hautfette. **Das Abdecken der Capture-Mikrotiterplatte nach dem Spülschritt und während der Inkubation des 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 Reagenz unmittelbar nach dem Aliquotieren innerhalb des genannten Zeitrahmens verwenden und direktes Sonnenlicht vermeiden.
11. Direktverdrängungssystem-Dispenser vor der Reagenzienabgabe primen (vorbefüllen) und regelmäßig auf das Auftreten großer Luftbläschen kontrollieren. Übermäßige Mengen großer Luftbläschen in der Dispenser-Spitze können zu ungenauer Abgabe führen und lassen sich dadurch vermeiden, dass man den Dispenser befüllt, sämtliche Flüssigkeit ablässt und neu befüllt. Genaue Anleitungen zum Gebrauch sind in der Dispenser-Gebrauchsanweisung enthalten.
12. Das Pipettieren mit Mehrkanalpipetten sollte zur Abgabe der Nachweisreagenzien 1 und 2 unter Verwendung der reversen Pipettiertechnik erfolgen (siehe Hybridnachweis). Vergewissern Sie sich, dass jede Pipettenspitze vorschriftsmäßig auf dem Mehrkanal-Dispenser sitzt und sich füllt.
13. Beim Waschen darauf achten, dass jede Vertiefung der Mikrotiterplatte, wie in den Waschanweisungen angegeben, gründlich gespült wird. Unzureichendes Waschen führt zu erhöhten Hintergrundwerten und kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen. In den Vertiefungen zurückbleibender, restlicher Waschpuffer kann die Signalstärke reduzieren und die Reproduzierbarkeit vermindern.
14. Den Mikrotiterplatteninkubator I bei einem Kaltstart mindestens 60 Minuten auf  $65 \pm 2$  °C äquilibrieren lassen. Nichteinhaltung dieser Aufwärmperiode kann zum Schmelzen der Hybridisierungsmikrotiterplatte führen. Einzelheiten finden Sie in der Gebrauchsanweisung für den Mikrotiterplatteninkubator I.

## VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

1. Bewahren Sie den Kit nach Erhalt bei 2 – 8 °C auf. Waschpufferkonzentrat, Denaturierungsreagenz und Indikatorfarbstoff können gegebenenfalls bei 2 – 30 °C aufbewahrt werden.
2. Nicht über das neben dem Symbol  auf dem Verpackungsetikett angegebene Verfallsdatum oder das Verfallsdatum der vorbereiteten Reagenzien hinaus verwenden. (siehe unten).
3. Alle Reagenzien, außer dem Denaturierungsreagenz, dem GC-Sondengemisch und dem Waschpuffer werden gebrauchsfertig geliefert.

**Siehe zur Vorbereitung des GC-Sondengemischs, des Waschpuffers, des Nachweisreagenz 1 und des Nachweisreagenz 2 die Gebrauchsanweisung für das Rapid Capture-System, da die darin enthaltenen Anweisungen speziell für den Einsatz dieses Systems bei Tests mit großem Probendurchsatz bestimmt sind.**

### Vorbereitung der Reagenzien

<b>Denaturierungsreagenz</b>	<p><b>ZUERST VORBEREITEN</b></p> <p>Der Flasche mit dem Denaturierungsreagenz 5 Tropfen Indikatorfarbstoff zufügen und gründlich mischen. Das Denaturierungsreagenz sollte eine gleichmäßig dunkle, purpurrote Farbe aufweisen.</p> <p>Nach der Vorbereitung bleibt das Denaturierungsreagenz bei einer Lagerung bei 2 – 8 °C für 3 Monate stabil. Das Reagenz mit dem neuen Verfallsdatum kennzeichnen. Bei Verblässen der Farbe vor Gebrauch 3 Tropfen Indikatorfarbstoff zufügen und gründlich mischen.</p> <p><b>Vorsicht:</b> Das Denaturierungsreagenz ist ätzend. Geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Vorsichtig handhaben.</p>																		
<b>GC-Sondengemisch (hergestellt aus GC-Sonde und Sondenverdünner-Reagenzien)</b>	<p><b>VORBEREITUNG WÄHREND DER PROBEN-DENATURIERUNGSINKUBATION:</b></p> <p><b>WICHTIG: ZUWEILEN VERFÄNGT SICH DIE SONDE IM VERSCHLUSSDECKEL DES RÖHRCHENS.</b></p> <p>Hinweis: Diesen Schritt zur Verhinderung von RNase-Kontamination der Sonde und des Sondengemischs mit äußerster Vorsicht durchführen. Zum Pipettieren der Sonde aerosoldichte Pipettenspitzen verwenden. Das Sondenverdünnungsmittel ist viskös. <b>Bei der Vorbereitung des GC-Sondengemischs unbedingt auf gründliches Mischen achten. Während des Mischvorgangs muss sich ein sichtbarer Wirbel bilden. Unvollständiges Mischen kann zu einer Signalreduktion führen.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Das Röhrchen mit der GC-Sonde kurz zentrifugieren, damit sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens sammelt. Durch vorsichtiges Klopfen am Röhrchen mischen.</li> <li>• Die erforderliche Menge des Sondengemischs (25 µl/Test) ermitteln. Es wird empfohlen, zur Kompensation für das in den Pipettenspitzen oder an den Seiten des Röhrchens verloren gegangene Volumen etwas mehr Sondengemisch anzusetzen. Vorgeschlagene Volumina sind nachstehend aufgelistet. 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 Sonden und Sondenverdünnungsvolumina reduziert sein.</li> <li>• Die erforderliche Menge an Sondenverdünnungsmittel in einen neuen Einweg-Behälter überführen. Je nach Anzahl der Tests wird entweder ein 5-ml- oder 1,5-ml-Polypropylenröhrchen mit Schnappdeckel und rundem Boden empfohlen. Zur Vorbereitung des Sondengemischs eine Verdünnung von 1:25 der GC-Sonde in Sonden-Verdünnungsmittel ansetzen.</li> </ul> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Anzahl der Tests/Streifen</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volumen des Sondenverdünnungsmittels*</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volumen der Sonde*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">4,0 ml</td> <td style="text-align: center;">160,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> <td style="text-align: center;">120,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">2,0 ml</td> <td style="text-align: center;">80,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">1,0 ml</td> <td style="text-align: center;">40,0 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">pro Vertiefung</td> <td style="text-align: center;">0,045 ml</td> <td style="text-align: center;">1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">*Werte einschließlich der empfohlenen zusätzlichen Volumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Sonde in das Sondenverdünnungsmittel pipettieren, indem die Pipettenspitze gegen die Innenwand des Röhrchens knapp über dem Meniskus platziert und der Inhalt abgegeben wird. <b>Die Spitze nicht in das Sondenverdünnungsmittel eintauchen.</b></li> <li>• Zum gründlichen Mischen mindestens 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen. Es muss ein sichtbarer Wirbel entstehen. Mit "GC-Sondengemisch" beschriften und in einem trockenen geschlossenen Behälter bis zum Gebrauch aufbewahren. Nicht aufgebrauchtes Sondengemisch verwerfen.</li> </ul>	<u>Anzahl der Tests/Streifen</u>	<u>Volumen des Sondenverdünnungsmittels*</u>	<u>Volumen der Sonde*</u>	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	pro Vertiefung	0,045 ml	1,8 µl
<u>Anzahl der Tests/Streifen</u>	<u>Volumen des Sondenverdünnungsmittels*</u>	<u>Volumen der Sonde*</u>																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
pro Vertiefung	0,045 ml	1,8 µl																	

<b>Waschpuffer</b>	<p><b>VORBEREITUNG WÄHREND DES CAPTURE-SCHRITTES:</b>  <b>Für den automatischen Plattenspüler</b> kann der Waschpuffer wie nachstehend beschrieben vorbereitet und in einem abgedeckten Behälter aufbewahrt werden oder es wird 1 Liter hergestellt und in die Behälter des automatischen Plattenspülers gefüllt. Die Mischvolumina gehen aus der nachstehenden Tabelle hervor.</p> <p><b>Weitere Pflege- und Wartungsanleitungen entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler.</b></p> <p>Vorsicht: Das Waschpufferkonzentrat ist bei Verschlucken toxisch. Geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Um Verletzungen so gering wie möglich zu halten, das Waschpufferkonzentrat bei der Vorbereitung mit Wasser verdünnen.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Menge an <u>Waschpufferkonzentrat</u></th> <th style="text-align: center;">Menge an destilliertem oder entionisiertem <u>Wasser</u></th> <th style="text-align: center;">Endvolumen an Waschpuffer</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 l</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1,933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 l</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2,900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Hinweis: Die Stromversorgung des Automatischen Plattenspülers muss ständig eingeschaltet sein. Dies gewährleistet die Durchführung der Wartungsspülung, wenn das Gerät acht Stunden lang nicht in Betrieb ist.</b></p> <p><b>Vor jedem Assay sicherstellen, dass der Abwassertank leer und der Spülwassertank mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gefüllt ist.</b></p> <p>Weitere Pflege- und Wartungsanleitungen entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler.</p> <p><b>Manuelles Plattenspülverfahren:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Waschpuffer-Konzentrat gut mischen.</li> <li>• 100 ml Waschpuffer-Konzentrat mit 2,9 l destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen und gut mischen (Endvolumen: 3 l).</li> <li>• Behälter zur Verhinderung von Kontamination oder Verdunstung fest verschließen.</li> </ul> <p>Nach Vorbereitung ist der Waschpuffer drei Monate bei 2 – 30 °C stabil. Mit dem neuen Verfallsdatum kennzeichnen. Wenn der Waschpuffer im Kühlschrank aufbewahrt wurde, vor Gebrauch auf 20 – 25 °C äquilibrieren.</p> <p>Es wird empfohlen, dass der Spülapparat und die Schläuche zur Verhinderung einer möglichen Kontamination durch alkalische Phosphatase in Bakterien und Schimmelpilzen alle drei Monate mit Natriumhypochlorid-Lösung, 0,5 % gereinigt und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gründlich gespült werden.</p>	Menge an <u>Waschpufferkonzentrat</u>	Menge an destilliertem oder entionisiertem <u>Wasser</u>	Endvolumen an Waschpuffer	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
Menge an <u>Waschpufferkonzentrat</u>	Menge an destilliertem oder entionisiertem <u>Wasser</u>	Endvolumen an Waschpuffer											
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											

### Volumina für Gebrauchsfertige Reagenzien

Nachweisreagenz 1 und Nachweisreagenz 2	<p><b>UNMITTELBAR VOR GEBRAUCH:</b>  Reagenz gründlich mischen, dann das entsprechende Volumen von Nachweisreagenz 1 oder 2 unter Beachtung der nachstehenden Anleitung vorschriftsmäßig in einen sauberen Reagenzbehälter <b>abmessen</b>. Zur Verhinderung einer Kontamination <b>DÜRFEN</b> diese Reagenzien <b>NICHT</b> mehr in die Originalflaschen zurückgegeben werden: <b>Nicht aufgebrauchtes Material nach Gebrauch verwerfen</b>. Anstelle eines 8-Kanal-Dispensers kann auch ein geeigneter Direktverdrängungssystem-Dispenser verwendet werden. In diesem Fall sollten in einem Polypropylenröhrchen von ausreichender Größe zur Aufnahme des wie unten angegebenen erforderlichen Volumens Aliquots hergestellt werden.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Anzahl der <u>Tests/Streifen</u></th> <th style="text-align: center;">Volumen von <u>Nachweisreagenz 1 oder 2</u> Flascheninhalt</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 Test</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> </tbody> </table>	Anzahl der <u>Tests/Streifen</u>	Volumen von <u>Nachweisreagenz 1 oder 2</u> Flascheninhalt	96/12	7,0 ml	72/9	5,0 ml	48/6	3,0 ml	24/3	0,125 ml	1 Test	
Anzahl der <u>Tests/Streifen</u>	Volumen von <u>Nachweisreagenz 1 oder 2</u> Flascheninhalt												
96/12	7,0 ml												
72/9	5,0 ml												
48/6	3,0 ml												
24/3	0,125 ml												
1 Test													

## ENTNAHME UND HANDHABUNG DER PROBEN

Im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID dürfen nur Zervixproben verwendet werden, die mithilfe des *digene* HC2 DNA Collection Device (bestehend aus Zervixbürste und *digene* Specimen Transport Medium) und des *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (Tupfer und *digene* STM) entnommen und transportiert wurden oder Proben, die mit einem besenähnlichen Entnahmegesäß entnommen und in Hologic PreservCyt-Lösung gegeben wurden. Mit anderen Entnahmevorrichtungen 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 Kits 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 Gebrauchsanweisung für das *digene* HC2 DNA Collection Device.

### ZERVIXPROBEN IN STM

Die STM-Proben können bis zu 8 Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt und ungekühlt zum Testlabor versandt werden. Die Proben müssen per Kurierdienst in einem isolierten Behälter entweder über Nacht oder innerhalb von 2 Tagen versandt werden. Bei Durchführung des Assays innerhalb einer Woche sind die Proben im Testlabor bei 2 – 8 °C zu lagern. Erfolgt die Durchführung des Assays später als eine Woche, können die Proben bis zu 3 Monate lang bei -20 °C aufbewahrt werden. Zur Verzögerung von Bakterienwachstum und zur Beibehaltung der DNA-Integrität wurde dem *digene* Specimen Transport Medium ein Konservierungsmittel zugesetzt. Die Erhaltung der Lebensfähigkeit von Organismen oder Zellen ist **nicht beabsichtigt**. Im *digene* Specimen Transport Medium entnommene Proben können nicht zur Kultur oder für andere Testverfahren verwendet werden.

Auf der Grundlage eines firmeninternen Tests von 90 simulierten klinischen Proben wurde eine STM-Probenstabilität von 2 Wochen bei Raumtemperatur zuzüglich einer weiteren Woche bei 2 -8 °C festgestellt. Zu diesen 90 Proben gehörten 40 mit niedrigkonzentrierten GC-Organismen [bei oder nahe der Nachweisgrenze (limit of detection, LOD)], 35 moderat positive Proben (etwa das 2 - 5fache der Nachweisgrenze) und 5 hochpositive Proben, die über dem 10fachen der Nachweisgrenze lagen. Die verbleibenden 10 Proben waren GC-negativ, 5 Proben enthielten jedoch eine hohe Konzentration von CT-Organismen. Leistungsschätzungen für den Assay basieren auf Tests von Proben, die zwischen 2 und 8 °C gelagert bzw. eingefroren und binnen 1 - 2 Wochen nach Entnahme durchgeführt wurden.

#### Hinweise:

1. Ein nicht-denaturiertes Aliquot jeder dieser 90 Proben wurde zur Simulation von Transportbedingungen extremen Temperaturen ausgesetzt (3 Tage Lagerung bei -20 °C, anschließend 5 Tage bei 50 °C und weitere 2 Wochen bei Raumtemperatur). Zwar wurde unter diesen Bedingungen nach acht Tagen ein Signalverlust (RLU/CO) festgestellt, die qualitative Interpretation der Ergebnisse wurde jedoch nicht beeinträchtigt. Nach einer weiteren zweiwöchigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden bei Proben mit niedrigen Organismenkonzentrationen qualitative Unterschiede beobachtet.
2. So verhindern Sie, dass die Verschlussdeckel während des Versands oder der Aufbewahrung im eingefrorenen Zustand abspringen:
  - Decken Sie die Verschlussdeckel vor dem Versand der zuvor eingefrorenen Probenröhrchen mit Parafilm® ab. Die Proben können im gefrorenen Zustand oder bei 20 – 25 °C versandt werden.
  - Ersetzen Sie die Verschlussdeckel durch Schraubverschlüsse für Probesammelröhrchen, sobald die Proben zum Testen aus dem Gefrierschrank genommen werden.
3. Das *digene* HC2 DNA Collection Device darf nicht bei Schwangeren angewandt werden. Bei schwangeren Patientinnen dürfen Proben nur mit dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit entnommen werden.

## ZERVIXPROBEN IN HOLOGIC PRESERV CYT-LÖSUNG

Für den DNA-Test *digene* HC2 GC-ID können Proben benutzt werden, die mit einer besenähnlichen Entnahmevorrichtung entnommen und zur Herstellung von Hologic ThinPrep® Pap Test-Objektträgern in Hologic PreservCyt-Lösung gegeben wurden. Die Probeentnahme muss in der üblichen Weise erfolgen und die ThinPrep Pap Test-Objektträger müssen nach den Anweisungen von Hologic hergestellt werden.

Proben in PreservCyt-Lösung können bis zu einem Monat nach der Entnahme bis zur Durchführung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) aufbewahrt werden. Sie dürfen nicht eingefroren werden. Hinweise zur Handhabung dieser Proben finden Sie im Abschnitt *Verfahren zur Vorbereitung von PreservCyt-Proben*.

## TESTVERFAHREN

**Proben können infektiöse Bestandteile enthalten und sind entsprechend zu handhaben.** Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID kann gemäß den Anweisungen in dieser Gebrauchsanweisung manuell bzw. bei Tests mit großem Probendurchsatz mithilfe des Rapid Capture-Systems durchgeführt werden.

### TESTS MIT GROSSEM PROBENDURCHSATZ MITTELS RAPID CAPTURE-SYSTEM

Das Rapid Capture-System ist ein universelles automatisches Pipettier- und Verdünnungssystem, das mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID bei Tests mit großem Probendurchsatz eingesetzt werden kann. Dieses System verarbeitet bis zu 352 Proben in acht Stunden, wobei während einer Zeitspanne von 3,5 Stunden keine Benutzerintervention erforderlich ist. Bis zu 704 Probeergebnisse können so binnen 13 Stunden bereit gestellt werden. Die testvorbereitende Denaturierung der Proben wird wie bei der unten beschriebenen manuellen Methode des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID unabhängig vom RCS im Primärentrahmeröhrchen durchgeführt. Danach werden die Proben auf die RCS-Plattform aufgetragen. Der Chemilumineszenzsignalnachweis und die Ergebnisberichterstattung erfolgt mittels des separaten, von QIAGEN zugelassenen Luminometersystems, das sowohl bei der manuellen Methode als auch der RCS-Methode verwendet wird. Die Verfahrensschritte des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID werden in exakt derselben Abfolge 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.

**Beachten Sie für die Benutzung des Rapid Capture-Systems zusätzlich zu dieser Gebrauchsanweisung auch die *Gebrauchsanweisung für das Rapid Capture-System*, die zusammen mit dem Gerät geliefert wird.**

### MANUELLES VERFAHREN

#### Vorbereitung

1. Den Mikrotiterplatteninkubator I bei einem Kaltstart mindestens 60 Minuten auf  $65 \pm 2$  °C äquilibrieren lassen. Einzelheiten finden Sie in der Gebrauchsanweisung für den Mikrotiterplatteninkubator I.
2. Stellen Sie sicher, dass das Wasserbad eine Temperatur von 65 °C hat und der Füllstand zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens hoch genug ist.
3. Die Proben und **alle** erforderlichen Reagenzien **vor Beginn des Assays** aus dem Kühlschrank nehmen. Die Reagenzien in 15 – 30 Minuten auf 20 – 25 °C bringen.
4. Mithilfe der *digene* Testanalyse-Software und den *digene* Testprotokollen für GC eine Plattenanordnung erstellen. Näheres hierzu im Anwenderhandbuch der entsprechenden Software.
5. Der Negativkalibrator, der Positivkalibrator und die Qualitätskontrollen sind für jeden Assay **frisch** vorzubereiten. Mischen Sie die Kalibratoren und die Qualitätskontrollen gründlich. Bei Verwendung des MST Vortexer 2 jeweils 500 µl in ordnungsgemäß beschriftete leere Probensammelröhrchen geben. Alternativ können Sie auch jeweils 200 µl in ordnungsgemäß beschriftete 2-ml-Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen geben.

6. **Negativkalibrator** und **Positivkalibrator ZUERST dreifach** für jede getestete Charge **testen**. Qualitätskontrollen und Proben separat testen. Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben müssen in einer Konfiguration von 8 Mikrotiterspaltentestungen durchgeführt werden; dabei werden die Replikate der Negativkalibratoren (NC) in die Vertiefungen der Position A1, B1 und C1 gegeben. Der Positivkalibrator (PC) befindet sich in D1, E1 und F1, der QC CT in G1 und der QC GC in H1. Die Proben befinden sich in den Positionen beginnend bei A2. Vgl. nachfolgendes Layout-Beispiel. Nähere Angaben zur korrekten Einrichtung von Kalibrator, Qualitätskontrolle und Proben in der Software finden Sie im Benutzerhandbuch für das entsprechende von QIAGEN zugelassene Luminometer und im Anwenderhandbuch der entsprechenden *digene* Testanalyse-Software.

**BEISPIELHAFTE ANORDNUNG FÜR EINEN TEST MIT 24 MIKROTITERPLATTENVERTIEFUNGEN:**

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

**DENATURIERUNG**

**Hinweise:**

- **Vorsicht:** Das Denaturierungsreagenz ist ätzend. Geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Gehen Sie vorsichtig vor und tragen Sie ungepuderte Einweghandschuhe.
- **Wichtig:** Proben können Blut oder anderes Biomaterial enthalten, das den durch Zugabe des Denaturierungsreagenz hervorgerufenen Farbumschlag überdeckt. Proben, die bereits vor der Zugabe des Denaturierungsreagenzes eine dunkle Farbe haben, zeigen u. U. in diesem Schritt nicht den zu erwartenden Farbwechsel. In diesem Fall bedeutet ein Ausbleiben des erwarteten Farbwechsels keine Beeinträchtigung der Gültigkeit der Assayergebnisse. Ordnungsgemäßes Mischen kann durch Beobachtung des Farbwechsels der Kalibratoren und Qualitätskontrollen verifiziert werden.
- Während des Denaturierungsschrittes ist darauf zu achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in dem Röhrchen ausreichend ist.
- Die Proben können bis zu dem Denaturierungsschritt vorbereitet und über Nacht bei 2 - 8 °C oder bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden. Maximal dürfen 3 Gefrier-/Auftauzyklen mit einer maximalen Dauer von 2 Stunden bei Raumtemperatur pro Auftauzyklus durchgeführt werden Vor Gebrauch gut mischen.
- Kalibratoren und Qualitätskontrollen können bis zum Denaturierungsschritt vorbereitet und über Nacht bei 2 - 8 °C aufbewahrt, **aber dürfen nicht eingefroren werden**. Werden Kalibratoren und Qualitätskontrollen eingefroren, so müssen sie entsorgt werden.
- Nach der Denaturierung und Inkubation gelten die Proben als nicht mehr infektiös<sup>13</sup>; das Laborpersonal sollte jedoch weiterhin die geltenden Vorsichtsmaßnahmen beachten.

## VERFAHREN ZUR VORBEREITUNG VON KALIBRATOREN, QUALITÄTSKONTROLLEN UND STM-PROBEN

### Hinweise:

- Die Probenentnahmevorrichtung 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 Kontakt kommt. Ein weiterer entscheidender Schritt ist das Mischen nach Zufügen des 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, der die gesamte Innenfläche des Röhrchens bespült. Bei manuellem Vortexen sicherstellen, dass jeder Kalibrator, jede Qualitätskontrolle und jede Probe mindestens 5 Sekunden lang bei voller Geschwindigkeit auf dem Vortex durchmischt werden, damit der Flüssigkeitswirbel die gesamte Innenfläche des Röhrchens bespült, und das Röhrchen dann einmal umdrehen.**

1. Die Verschlussdeckel von Kalibratoren, Qualitätskontrolle und STM-Probenröhrchen abnehmen und entsorgen.

**Hinweis:** Von Probenröhrchen entfernte Verschlusskappen sind als potenziell infektiös zu betrachten. Immer gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgen.

2. Das Denaturierungsreagenz mit dem Indikatorfarbstoff mittels eines Direktverdrängers oder verstellbaren Dispensers in jeden Kalibrator, jede Qualitätskontrolle oder jede STM-Probe pipettieren. Darauf achten, dass die Seiten des Röhrchens nicht berührt werden, um das Auftreten einer Kreuzkontamination zu verhindern. Das Volumen des benötigten Denaturierungsreagenzes entspricht der Hälfte des Probenvolumens. Das genaue Volumen für jeden Kalibrator-, Qualitätskontroll- und Probentyp ist in der nachstehenden Tabelle aufgelistet.

- **Das verbleibende Denaturierungsreagenz ist vor der Entsorgung in der Flasche gemäß den nationalen/örtlichen Laborbestimmungen zu verdünnen.**

Kalibrator, Qualitätskontrollen oder Probe	Erforderliches Volumen des Denaturierungsreagenz
Negativkalibrator, Positivkalibrator und Qualitätskontrolle, 200 µl	100 µl
Negativkalibrator, Positivkalibrator und Qualitätskontrolle, 500 µl	250 µl
Zervixprobe, 1 ml	500 µl

3. Die Proben nach einem der beiden nachstehenden Verfahren mischen.

#### Verfahren mit Multi-Specimen Tube Vortexer 2

**Hinweis:** Bei QIAGEN-Proben, die mit dem MST Vortexer 2 gemischt werden, **muss** zur Hybridisierung das Verfahren mit der Hybridisierungsmikrotiterplatte und dem Mikrotiterplatteninkubator I angewandt werden. Weitere Anweisungen hierzu finden Sie bei Bedarf in der Gebrauchsanweisung für den MST Vortexer 2.

- a) Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Probenröhrchen mit DuraSeal<sup>®</sup>-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 befestigen. Die Folie mithilfe der Schneidevorrichtung zurechtschneiden.
- c) Das Gestell auf den MST-Vortexer 2 stellen und mit der Klemme befestigen. Vergewissern Sie sich, dass die Geschwindigkeit auf 100 (maximale Geschwindigkeit) eingestellt ist und bringen Sie den Vortexer-Schalter auf Position „EIN“. Die Röhrchen 10 Sekunden vortexen.

### Manuelles Vortexverfahren an einzelnen Röhrcchen

- a) Kalibratoren, Qualitätskontrollen und STM-Probenröhrcchen mit sauberen Schraubverschlüssen für Probesammelröhrcchen wieder verschließen.
  - b) Jedes Röhrcchen einzeln 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex gründlich mischen.
  - c) Jedes Probenröhrcchen zum Bespülen der Innenseite des Röhrcchens, des Verschlussdeckels und des Randes einmal umdrehen.
  - d) Das Röhrcchen wieder zurück in das Gestell stellen.
4. Unabhängig von dem verwendeten Vortexverfahren **muss während des Mischens ein sichtbarer Flüssigkeitswirbel auf der Innenseite eines jeden Röhrcchens sichtbar sein, der die gesamte Innenfläche des Röhrcchens bespült**. Die Farbe der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollte nach purpurrot umschlagen.
5. Die Röhrcchen in dem Gestell in einem Wasserbad bei  $65 \pm 2$  °C etwa  $45 \pm 5$  Minuten inkubieren (denaturierte Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben können sofort getestet werden. Kalibratoren und Qualitätskontrollen können wie in den vorstehenden **Hinweisen** beschrieben bei 2 - 8 °C über Nacht gelagert werden). Hinweise zur Probenaufbewahrung finden Sie im Abschnitt *Optionalen Haltepunkt*. Während dieser Inkubation das GC-Sondegemisch vorbereiten. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.

### VERFAHREN ZUR VORBEREITUNG VON PROBEN IN PRESERV CYT-LÖSUNG

#### **Hinweise:**

- Alle Einzelheiten zu dem *digene* HC2-Probenkonversionskit können der Gebrauchsanweisung entnommen werden.
- Die Verarbeitung eines 4-ml-Aliquots der PreservCyt-Lösung ergibt genug Lösung für zwei Tests, wenn manuell getestet wird. 4 ml ist das kleinste Volumen, das verarbeitet werden kann. Weitere Angaben zum Mindestrestvolumen finden Sie im Abschnitt „Äquivalenz zwischen Proben in STM und PreservCyt-Lösung“.
- Die PreservCyt-Lösung in Chargen von 36 oder weniger zubereiten; sonst können sich die Pellets beim Abdekantieren des Überstands verschieben. Dies ist wichtig, damit beim Abdekantieren die vollständigen Zellpellets erhalten bleiben. Mit der Vorbereitung zusätzlicher Gefäße mit PreservCyt-Lösung erst dann beginnen, wenn die Vorbereitung der ersten Charge beendet ist.

Verwenden Sie entweder das mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID mitgelieferte Denaturierungsreagenz (DNR) (siehe „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“) oder das mit dem *digene* HC2-Probenkonversionskit mitgelieferte DNR. Zur Vorbereitung des mit dem *digene* HC2-Probenkonversionskit gelieferten DNR 3 einen Tropfen Indikatorfarbstoff in die DNR-Flasche geben und gründlich mischen. Das Denaturierungsreagenz sollte eine gleichmäßig dunkle, purpurrote Farbe aufweisen. Erforderliches Volumen mithilfe von Tabelle 1 bestimmen.

**Tabelle 1.** Erforderliche Mengen: Vorbereitung der Reagenzien

Anzahl der Tests	Volumen der PreservCyt-Lösung	Volumen des Konversionspuffers
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Ein *digene* HC2-Probenkonversionsröhrcchen, ein konisches 10-ml-Sarstedt-Röhrcchen oder ein 15-ml-VWR-oder Corning-Röhrcchen mit der entsprechenden Probenidentifikationsnummer beschriften.
2. Nur eine Probe auf einmal verarbeiten:
  - a. PreservCyt-Gefäß 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 Röhrcchen pipettieren. Die PreservCyt-Lösung ganz unten in ein konisches Röhrcchen geben, damit möglichst wenig Zellmaterial an den Wänden 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 Vortexen von Proben in PreservCyt-Lösung mit Probenkonversionspuffer vor der Zentrifugation zugelassen und darf daher für diesen Schritt nicht benutzt werden.
5. Röhrchen im Ausschwingrotor  $15 \pm 2$  Minuten bei  $2900 \pm 150$  xg zentrifugieren.
6. Während der Zentrifugation gemäß Tabelle 2 eine Mischung aus *digene* Specimen Transport Medium und Denaturierungsreagenz (STM/DNR) 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-Lösung als Anhaltspunkt nehmen und dann die Volumina jedes STM- und DNR-Röhrchens mit der Anzahl der zu testenden Proben multiplizieren (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2.** Erforderliche Mengen: STM/DNR.

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

\*Die in diesen Spalten aufgelisteten Mengen dürfen den Probenröhrchen nicht direkt zugegeben werden.

- b. Lösung gründlich mit dem Vortexer mischen.
7. Röhrchen einzeln aus der Zentrifuge nehmen und in einen Halter oder ein Konversionsgestell stellen. In jedem Röhrchen sollte am Grund ein pink-/orangefarbenes Pellet zu sehen sein.  
**Hinweis:** Proben, die nach dem Zentrifugieren kein sichtbares Pellet aufweisen, müssen verworfen und dürfen nicht für den Test verwendet werden.
8. Individuelle Handhabung der Proben:
  - a. Verschlusskappe entfernen und auf ein sauberes, fusselfreies Papiertuch legen.
  - b. Überstand sorgfältig abdekantieren.
  - c. Röhrchen verkehrt herum halten und vorsichtig (ungefähr sechsmal) auf absorbierenden, fusselfreien Papiertüchern abtupfen, bis keine Flüssigkeit mehr aus dem Röhrchen tropft. Jedes Mal eine saubere Stelle auf dem Papiertuch benutzen. Das Pellet darf während des Abtupfens **nicht** am Röhrchen herabrutschen.

**Hinweise:**

- Nicht mehrmals auf dieselbe Stelle des absorbierenden, fusselfreien Papiertuchs tupfen.
  - Es ist wichtig, dass die höchstmögliche Menge an PreservCyt durch Abtupfen entfernt wird. Es ist jedoch normal, wenn nach dem Abtupfen noch ein Rest an PreservCyt-Lösung zu sehen ist.
- d. Röhrchen in einen Halter oder ins Konversionsgestell stellen.

## MISCHEN UND DENATURIEREN

### Manuelles Vortexverfahren

1. Zu jedem Pellet die entsprechende Menge STM/DNR-Lösung geben (siehe Tabelle 2). Jedes Röhrchen wieder verschließen und einzeln auf dem Vortexer mindestens 30 Sekunden lang auf der höchsten Geschwindigkeitsstufe resuspendieren. Wenn sich ein Pellet schwer suspendieren lässt, nochmals 10 - 30 Sekunden oder solange, bis das Pellet sich vom Röhrchengrund löst, mischen. Wenn sich das Pellet nach erneutem Mischen (insgesamt maximal 2 Minuten) immer noch nicht ablöst, Probenkennnummer notieren und zum nächsten Schritt übergehen.
2. Röhrchen in ein Gestell stellen.
3. Gestell  $15 \pm 2$  Minuten in ein  $65 \pm 2$  °C warmes Wasserbad stellen. Dabei darauf zu achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in den Röhrchen ausreichend ist.
4. Gestell mit Proben aus dem Wasserbad nehmen und Proben einzeln auf dem Vortexer 15 - 30 Sekunden mischen.
5. **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.
6. Gestell ins  $65 \pm 2$  °C warme Wasserbad zurückstellen und Denaturierung  $30 \pm 3$  Minuten fortsetzen.
7. Zur unten beschriebenen *Hybridisierung* übergehen oder Proben laut Abschnitt „*Optionaler Haltepunkt*“ über die Aufbewahrung und Behandlung denaturierter Proben behandeln.

### Verfahren mit Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

#### **Hinweise:**

- Das Verfahren mit dem Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 ist für die Behandlung von Proben in PreservCyt-Lösung nach dem Zentrifugieren und Abdekantieren des Überstands validiert.
- Für die Behandlung von Proben in PreservCyt-Lösung ist nur der MST Vortexer 2 geeignet.
- Das Konversionsgestell und der Deckel wurden speziell zur Aufnahme von *digene* HC2-Probenkonversionsröhrchen (VWR oder Corning, konische 15-ml-Röhrchen) entwickelt. Der Nutzer sollte mit dem Konversionsgestell nur einen Röhrchentyp zur selben Zeit verwenden. Andere Marken wurden nicht für die Verwendung validiert.

Die spezifizierten Mischzeiten für Konversionsgestell und Deckel sind genau einzuhalten.

- Konversionsgestell und -deckel können nicht zum Mischen der Kalibratoren oder Qualitätskontrollen des DNA-Testkits *digene* HC2 verwendet werden. Beim Gebrauch von Konversionsgestell und -deckel verhindert die Höhe der STM-Röhrchen das richtige Vortexen.
1. Jedes beschriftete konische 15-ml-Röhrchen abtupfen und dann an seine Position ins Konversionsgestell stellen.
  2. Jedem Pellet das richtige Volumen an STM/DNR-Mischung hinzufügen (Tabelle 2).
  3. Die konischen 15-ml-Röhrchen mit DuraSeal-Verschlussfolie abdecken (Folie über die Röhrchen im Gestell ziehen).
  4. Die Gestellabdeckung über die mit Folie abgedeckten Röhrchen bringen und mit den beiden Seitenclips befestigen. Die Folie mithilfe der Schneidevorrichtung zurechtschneiden, nachdem die Abdeckung sicher befestigt wurde.
  5. Den Hebel mit rotem Griff in 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 durch Ziehen des Hebels mit rotem Griff nach unten in senkrechte Position befestigen. Dadurch wird das Gestell fixiert.

7. Vergewissern Sie sich, dass die Geschwindigkeit auf 100 (maximale Geschwindigkeit) und der Kippschalter des Pulsers auf „AUS“ gestellt sind.
8. Vortexer-Schalter auf Position „EIN“ stellen. **Die Röhren 30 Sekunden vortexen.**
9. Vortexer-Schalter auf Position „AUS“ stellen.
10. Konversionsgestell und Deckel durch Anheben des roten Hebels vom MST Vortexer 2 abnehmen.
11. Das Gestell für  $15 \pm 2$  Minuten in einem Wasserbad bei  $65 \pm 2$  °C inkubieren. Dabei darauf achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in den Röhren ausreichend ist.
12. Nach 15-minütiger Inkubation Gestell mit den Röhren aus dem Wasserbad nehmen.
13. Zur Vermeidung von Spritzern überschüssiges Wasser vom Gestell abtrocknen, bevor es auf den MST Vortexer 2 gestellt wird.
14. Konversionsgestell und Deckel auf dem MST Vortexer 2 befestigen (siehe *Schritt 6*).
15. Vergewissern Sie sich, dass die Geschwindigkeit auf 100 (maximale Geschwindigkeit) eingestellt ist und stellen Sie den Vortexer-Schalter auf Position „EIN“. **Die Röhren 1 Minute vortexen.**
16. Vortexer-Schalter auf Position „AUS“ stellen.  
**Hinweis:** Beim MST Vortexer 2-Verfahren sind Mischgeschwindigkeit, -dauer und Vorgehensweise standardisiert. Daher ist im Gegensatz zum manuellen Vortexverfahren keine visuelle Kontrolle auf Zellpellets erforderlich.
17. Gestell erneut ins Wasserbad stellen und die Denaturierung für  $30 \pm 3$  Minuten bei  $65 \pm 2$  °C fortsetzen.
18. Gestell aus dem Wasserbad nehmen, abtrocknen und auf dem Vortexer befestigen.
19. Vortexer-Schalter auf Position „EIN“ stellen. **10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen.**
20. Vortexer-Schalter auf Position „AUS“ stellen. Gestell entfernen.
21. Gestellabdeckung sofort abnehmen und DuraSeal-Verschlussfolie von den Proben entfernen.
22. Zur unten beschriebenen *Hybridisierung* übergehen oder Proben laut Abschnitt „*Optionaler Haltepunkt*“ über die Aufbewahrung und Behandlung denaturierter Proben behandeln.

#### OPTIONALER HALTEPUNKT

Nach der Denaturierung können STM-Proben und konvertierte PreservCyt-Proben bei 2 – 8 °C über Nacht oder bei -20 °C bis zu drei Monate aufbewahrt werden. Über Nacht können die Proben im Konversionsgestell gekühlt werden. Die DuraSeal-Verschlussfolie und der Deckel müssen dann wieder aufgesetzt werden. Vor der Lagerung bei -20 °C müssen Gestelldeckel und DuraSeal-Verschlussfolie entfernt und die Röhren mit Deckeln verschlossen werden. In beiden Fällen müssen die Proben vor Fortsetzung mit dem Abschnitt „Hybridisierung“ auf 20 - 25 °C äquilibriert und sorgfältig gemischt werden.

**Hinweis:** Denaturierte Proben nicht auf Trockeneis aufbewahren oder versenden.

Die Proben dürfen maximal dreimal eingefroren/aufgetaut werden und zwischen den Auftauzyklen maximal 2 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

## HYBRIDISIERUNG

### Hinweise:

- Das GC-Sondengemisch ist viskös. Gründliches Mischen ist ebenso wichtig; wie das vollständige Abgeben der erforderlichen Menge in jede Mikrotiterplatten-Vertiefung. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.
- Wenn die denaturierte Probe bei -20°C gelagert wurde, muss sie auf 20 – 25 °C erwärmt und vor der Hybridisierung durch Vortexen gründlich gemischt werden.
- Den Mikrotiterplatteninkubator I vor Gebrauch mindestens 60 Minuten lang auf 65 ± 2 °C vorwärmen. Weitere Informationen finden Sie in der Gebrauchsanweisung für den Mikrotiterplatteninkubator I.

1. Eine Hybridisierungsmikrotiterplatte beschriften.
2. Die Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben nach der Inkubation aus dem Wasserbad nehmen. Bei Verwendung des MST-Vortexers 2 das gesamte Gestell mit STM-Proben mindestens 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeitseinstellung vortexen. Befinden sich die Proben in PreservCyt-Lösung, muss das gesamte Konversionsgestell mindestens 10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeitseinstellung gevortext werden. Alternativ kann jedes Röhrchen mindestens 5 Sekunden lang einzeln gevortext werden.
3. Jeweils 75 µl Kalibrator, Qualitätskontrolle oder Probe unter Beachtung der im Setup erstellten Plattenanordnungen auf den Boden einer leeren Vertiefung auf der Hybridisierungsmikrotiterplatte pipettieren. Dabei die Seiten der Vertiefungen nicht berühren und die Bildung von Luftbläschen vermeiden. Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination von Kalibratoren, Qualitätskontrollen oder Proben für jeden Transfer eine saubere, extralange Pipettenspitze verwenden. Bei STM-Proben die Probenentnahmeverrichtung nicht aus dem Probenstrahlröhrchen entfernen. Denaturierte Proben können mit einem Schraubverschluss für Probesammelröhrchen verschlossen und aufbewahrt werden. Dabei bleiben die Probenentnahmeverrichtungen in den Röhrchen. Denaturierte PreservCyt-Proben können mit Ihren Originaldeckeln verschlossen werden.

### Hinweise:

- **Wenn die Probenaliquots nicht sorgfältig überführt werden, kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Während der Probenüberführung darf die Pipette bei der Entnahme des 75 µl-Aliquots die Innenwände des Röhrchens nicht berühren.**
4. Nach dem Überführen der letzten Probe die Platte mit der Plattenabdeckung verschließen und die **Hybridisierungsmikrotiterplatte 10 Minuten bei 20 – 25 °C inkubieren.**
  5. Das vorbereitete und gründlich gevortexte Sondengemisch in einen Einweg-Reagenzbehälter aliquotieren. 25 µl des Sondengemischs in jede Vertiefung mit Kontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren. Dabei für jede Reihe einen 8-Kanal-Dispenser und frische Spitzen verwenden. In jede Hybridisierungsvertiefung das Sondengemischvolumen abgeben; dabei keine Flüssigkeit verspritzen. Die Seitenwände der Vertiefungen dürfen dabei nicht berührt werden. Das Gestell von unten prüfen und dadurch sicherstellen, dass alle Vertiefungen die entsprechende Menge an Sondengemisch erhalten haben.

**Hinweis:** Für obigen Schritt muss ein 8-Kanal-Dispenser verwendet werden, der mit Spitzen für 25 – 200 µl ausgerüstet ist und 25 – 75 µl abgeben kann. Bei wenigen Vertiefungen anstelle des 8-Kanal-Dispensers einen Einkanal-Dispenser verwenden (mit Spitzen für 25 – 200 µl).

6. Die Hybridisierungsmikrotiterplatte mit einem Deckel abdecken. Die Hybridisierungsmikrotiterplatte auf dem mit 1100 ±100 U/min laufenden Rotationsschüttler I etwa 3 ± 2 Minuten schütteln. Die Farbe der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollte nach dem Schütteln nach gelb umschlagen. Vertiefungen, die purpurrot bleiben, haben nicht die vorschriftsmäßige Menge an Sondengemisch erhalten. Den purpurrot gebliebenen Vertiefungen weitere 25 µl des Sondengemischs zufügen und erneut schütteln. Sind die Vertiefungen nach diesen Schritten noch immer purpurrot, muss der Test wiederholt werden.

7. Hybridisierungsmikrotiterplatte  $60 \pm 5$  Minuten lang in einem vorgewärmten und auf  $65 \pm 2$  °C äquilibrierten Mikrotiterplatteninkubator I inkubieren.

**Hinweise:**

- Beim Überführen der Hybridisierungsmikrotiterplatte in den Mikrotiterplatteninkubator „Microplate Heater I“ Spritzer vermeiden.
- Proben in PreservCyt-Lösung müssen nach dem Schütteln rosa statt gelb werden.

**HYBRID-CAPTURE**

1. In der Capture-Mikrotiterplatte bleibt nur die erforderliche Anzahl an Vertiefungen, der Rest wird herausgenommen. Nicht benötigte Mikrovertiefungen in den Originalbeutel zurückgeben und wieder verschließen. Jede Reihe mit einem Markierungsstift fortlaufend nummerieren (1, 2, 3 ...) und die Mikrotiterplatte mit einer geeigneten Kennzeichnung versehen. Die Proben werden den Vertiefungen nach dem unter *Setup* erstellten Muster hinzugefügt.
2. Die Hybridisierungs-Mikrotiterplatte mit Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben vorsichtig aus dem Mikrotiterplatteninkubator I nehmen. Sofort den Plattendeckel abnehmen und auf eine saubere Oberfläche legen.
3. Mit einem 8-Kanal-Dispenser den gesamten Inhalt (ca. 100 µl) der Kalibratoren, Qualitätskontrollen, und Proben aus den Vertiefungen der Hybridisierungs-Mikrotiterplatten in die entsprechenden Vertiefungen der Capture-Mikrotiterplatten geben. Für jede übertragene Spalte auf dem 8-Kanal-Dispenser neue Pipettenspitzen verwenden. Jede Pipettenspitze muss zur Gewährleistung eines vollständigen Transfers gut auslaufen. Der Dispenser kann stabilisiert werden, indem die Mitte der Pipettenspitzen gegen die obere Kante der Capture-Mikrovertiefungen gelehnt wird (siehe Abbildung 1).

**ABBILDUNG 1: RICHTIGES PIPETTIEREN**



4. Die Mikrotiterplatte mit dem Plattendeckel abdecken und  $60 \pm 5$  Minuten lang auf dem Rotationsschüttler I bei  $1100 \pm 100$  U/min und  $20 - 25$  °C schütteln.
5. Während dieser Inkubation den Waschpuffer vorbereiten und ggf. die Spül- und Abwassertanks des automatischen Plattenspülers überprüfen. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.
6. Wenn der Capture-Schritt abgeschlossen ist, die Capture-Mikrotiterplatte vom Rotationsschüttler I nehmen und den Plattendeckel vorsichtig abnehmen. Die Flüssigkeit aus den Vertiefungen entfernen und in den Ausguss gießen; dazu die Platte über dem Ausguss umdrehen und mit einer Bewegung nach unten kräftig schütteln. Dabei vorsichtig vorgehen und nicht zu dicht über dem Boden des Ausgusses dekantieren, damit kein Material verspritzt wird. **Die Platte nicht wieder umdrehen**, mit sauberen Kimtowels<sup>®</sup>-Wischtüchern oder entsprechenden fusselfarmen Papiertüchern 2 - 3 mal abtupfen. Vergewissern Sie sich, dass alle Flüssigkeit aus den Vertiefungen entfernt und die Oberseite der Platte trocken ist.

## HYBRIDNACHWEIS

### Hinweise:

- Alle Substanzen über die gesamte Platte mit einem 8-Kanal-Dispenser von links nach rechts zugeben.
  - Für eine möglichst einheitliche Reagenzabgabe wird die reverse Pipettiertechnik empfohlen. Bei dieser Technik werden die Pipettenspitzen zunächst unter Verwendung des zweiten Stopp-Punktes an der Aspirations-/Abgabekontrolle (Kolben) überfüllt. Siehe nachstehendes Verfahren. Die Spitzen vor dem Pipettieren in die Platte an dem Einweg-Reagenzbehälter oder auf einem fusselfarmen Papiertuch abstreifen, um überschüssiges Reagenz zu entfernen.
  - Der Dispenser kann stabilisiert werden, indem die Mitte der Pipettenspitzen gegen die obere Kante der Mikrovertiefungen gelehnt wird. Darauf achten, dass die Seitenwände der Mikrovertiefungen nicht berührt werden, da andernfalls eine Kreuzkontamination der Proben auftreten könnte. Siehe Abbildung 1 oben.
1. Das entsprechende Volumen des Nachweisreagenz 1 in einen Reagenzbehälter aliquotieren (siehe Abschnitt „*Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien*“). 75 µl des Nachweisreagenz 1 mit einem 8-Kanal-Dispenser und der reversen Pipettiertechnik vorsichtig in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren.

#### Reverse Pipettiertechnik:

- a) Die Spitzen auf einen 8-Kanal-Dispenser setzen und sicherstellen, dass alle Spitzen fest aufsitzen.
  - b) Den Dispenserkolben am ersten Stopp-Punkt vorbei auf den zweiten Stopp-Punkt drücken.
  - c) Die Spitzen in die Nachweisreagenzlösung 1 eintauchen.
  - d) Den Kolben langsam loslassen und die Spitzen mit Flüssigkeit füllen.
  - e) Die Lösung durch Drücken des Kolbens auf den ersten Stopp-Punkt in die Mikrovertiefungen abgeben (75 µl). Den Kolben nicht loslassen, bis die Pipettenspitzen erneut in die Lösung von Nachweisreagenz 1 getaucht wurden.
  - f) Spitzen erneut füllen und diesen Vorgang wiederholen, bis alle Vertiefungen gefüllt sind. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte von links nach rechts befüllen. *Vergewissern Sie sich, dass alle Vertiefungen befüllt wurden, indem Sie die Intensität der rosa Farbe beobachten. Die Farbintensität muss in allen Vertiefungen ähnlich sein.*
2. Die Platten mit einem Deckel abdecken und 30 - 45 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren.

## SPÜLEN

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

### VERFAHREN MIT AUTOMATISCHEM PLATTENSPÜLER

**Hinweis:** Den automatischen Plattenspüler I immer eingeschaltet lassen. Darauf achten, dass der Spülwassertank gefüllt und der Abwassertank leer ist. Der automatische Plattenspüler I spült regelmäßig das System zu Reinigungszwecken. Siehe Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler.

## VOR JEDEM GEBRAUCH:

- Vergewissern Sie sich, dass der Wassertank mindestens bis zur 1-Liter-Marke mit Waschpufferlösung gefüllt ist. Ist dies nicht der Fall, Waschpuffer-Lösung ansetzen. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.
- Vergewissern Sie sich, dass der Spülwassertank mit entionisiertem oder destilliertem Wasser gefüllt ist.
- Vergewissern Sie sich, dass der Abwassertank leer und der Verschlussdeckel sicher befestigt ist.
- Der automatische Plattenspüler bereitet sich vor jedem Spülvorgang selbsttätig vor und durchläuft nach jedem Spülvorgang eine Selbstreinigung.

1. Den Plattendeckel abnehmen und die Platte auf die Plattform des automatischen Plattenspülers legen.
2. Vergewissern Sie sich, dass der Strom eingeschaltet ist und auf dem Display „Digene Wash Ready“ oder „P1“ erscheint.

**Hinweis:** Auch wenn nur ein Teil einer Reihe mit Capture-Vertiefungen benötigt wird, müssen alle (d. h. auch die leeren) Mikrotiterplatten-Vertiefungen in die Capture-Platte gegeben werden, um die senkrechte Reihe vor dem Spülen zu vervollständigen. Bestellinformationen befinden sich im Abschnitt „Zubehörteile“.

3. Die Anzahl der zu spülenden Reihen durch Drücken der Taste „Rows“ und dann mit „+“ oder „-“ wählen. „Rows“ drücken, um zu „Digene Wash Ready“ oder „P1“ zurückzukehren.
4. Zum Starten „Start/Stop“ drücken.
5. Der automatische Plattenspüler führt sechs Füll- und Absaugzyklen durch, die ca. 10 Minuten dauern. Der Programmablauf enthält eine kurze Pause. Darauf achten, dass die Platte währenddessen nicht versehentlich frühzeitig entfernt wird. Wenn der automatische Plattenspüler das Spülen beendet hat, erscheint die Anzeige „Digene Wash Ready“ oder „P1“.
6. Mikrotiterplatte nach Programmende aus dem Plattenspüler nehmen. Die Platte muss weiß aussehen, es darf keine rosa Flüssigkeit in den Mikrovertiefungen zurückbleiben.

## MANUELLES SPÜLVERFAHREN

**Hinweis:** Unzureichendes Spülen kann zu einem verstärkten Hintergrund und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen (aufgrund von Rückständen alkalischer Phosphatase). Damit der Plattenspüler ausreichend spült, muss er mindestens 61 cm und höchstens 91 cm über dem Spülbereich platziert werden, so dass sich die Platte beim Spülen zwischen 61 cm und 91 cm unter dem Plattenspüler befindet. Der Absperrhahn des Plattenspülers muss bei Benutzung vollständig aufgedreht und bei Nichtbenutzung vollständig geschlossen sein. Während des Betriebs muss der Plattenspüler zur Aufrechterhaltung des erforderlichen Drucks mindestens 1,0 l Waschpuffer enthalten.

1. Das Nachweisreagenz 1 aus den Vertiefungen entfernen, indem saubere Kimtowels-Wischtücher oder entsprechende fusselarme Papiertücher oben auf die Platte gelegt werden und die Platte vorsichtig umgedreht wird. Vergewissern Sie sich vor dem Umdrehen der Platte, dass sich das Papier in Kontakt mit der gesamten Oberfläche der Platte befindet. Die Platte 1 - 2 Minuten auslaufen lassen. Auf sauberen Kimtowels-Wischtüchern oder entsprechenden fusselarmen Papiertüchern gut abtupfen. Die gebrauchten Papiertücher vorsichtig entsorgen, um eine Kontamination der späteren Schritte mit alkalischer Phosphatase zu vermeiden.
2. Die Platten mit dem Plattenspüler 6 Mal manuell spülen. Jede Vertiefung wird zum Entfernen von Konjugat von der Oberkante der Vertiefungen bis zum Überfließen gespült. Das Spülen beginnt bei Vertiefung A1 und wird im Zick-Zack-Verfahren nach rechts und unten fortgesetzt. Nachdem alle Vertiefungen befüllt wurden, die Flüssigkeit mit einer kräftigen Bewegung nach unten in den Ausguss dekantieren. Der zweite Spülvorgang beginnt bei Vertiefung H12 und verläuft im Zick-Zack-Verfahren nach links und oben. Diese aus 2 Spülvorgängen bestehende Abfolge wird noch zweimal wiederholt, was insgesamt 6 Spülvorgänge pro Vertiefung ergibt.

3. Platte nach dem Spülen durch Umdrehen auf sauberen Kimtowels-Wischtüchern oder entsprechenden fusselfarmen Papiertüchern abtupfen und 3 - 4 mal kräftig ausklopfen. Die fusselfarmen Papiertücher austauschen und erneut abtupfen. Die Platte umgedreht 5 Minuten auslaufen lassen. Anschließend die Platte nochmals abtupfen.
4. Die Platte muss weiß aussehen, d. h. es darf keine rosa Flüssigkeit in den Mikrovertiefungen zurückbleiben.

## SIGNALAMPLIFIKATION

### Hinweise:

- Zur Handhabung des Nachweisreagenz 2 ein neues Paar puderfreie Handschuhe verwenden.
  - Zur Vermeidung einer Kontamination von Nachweisreagenz 2 **nur** die zur Durchführung des Assays erforderliche Reagenzmenge in den Einweg-Reagenzbehälter aliquotieren. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“. **Das Nachweisreagenz 2 darf NICHT in die Originalflasche zurückgegeben werden. Nicht aufgebrauchtes Material nach Gebrauch verwerfen.**
  - Nachweisreagenz 2 stets kontinuierlich zugeben. Die Inkubationszeit aller Vertiefungen sollte möglichst gleich lang sein.
  - Darauf achten, dass die Seiten der Mikrovertiefungen nicht berührt werden oder Reagenz zurück auf die Spitzen gespritzt wird, da sonst eine Kreuzkontamination der Proben auftreten könnte (siehe Abbildung 1).
1. 75 µl von Nachweisreagenz 2 mit einem 8-Kanal-Dispenser und der reversen Pipettiertechnik vorsichtig in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. Alle Mikrovertiefungen sollten in eine gelbe Farbe umschlagen. Durch Beobachtung der Farbintensität verifizieren, dass alle Vertiefungen befüllt wurden. Alle Vertiefungen sollten eine ähnliche Intensität aufweisen.
  2. Die Mikrotiterplatten mit einem Plattendeckel oder sauberem Parafilm (oder entsprechendem Material) abdecken und 15 Minuten bei 20 – 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.
  3. Die Mikrotiterplatte nach mindestens 15 (und nicht mehr als 30) Minuten Inkubation in einem von QIAGEN zugelassenen Luminometer ablesen.
  4. In der *digene* Testanalyse-Software können sie relevante Assayinformationen direkt eingeben.
  5. Wenn eine Mikrotiterplatte nicht vollständig befüllt wurde, die verwendeten Mikrovertiefungen aus dem Mikroplattenhalter entfernen, das Gestell gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen, trocknen und für den nächsten Assay bereithalten.

## VERIFIZIERUNGSKRITERIEN FÜR DIE ASSAY-KALIBRIERUNG

Mit der Verifizierung der Assaykalibrierung wird sichergestellt, dass die Reagenzien und bereitgestellten Kalibrator- und Qualitätskontrollmaterialien vorschriftsmäßig funktionieren und damit eine genaue Ermittlung des Cutoff-Wertes für den Assay ermöglichen. Die Verifizierungskriterien werden automatisch errechnet und durch die *digene* Testanalyse-Software als gültig oder ungültig verifiziert. Beim DNA-Test *digene* HC2 GC-ID ist bei jedem Assay eine Kalibrierung erforderlich. Daher muss jeder Assay mit folgenden Kriterien verifiziert werden. Dieses Verifizierungsverfahren dient nicht als Ersatz für die interne Qualitätskontrollprüfung.

### 1. Negativkalibrator (NC)

Der Negativkalibrator muss bei jedem Assay dreimal getestet werden. Der Test kann nur dann fortgesetzt werden, wenn der Mittelwert des Negativkalibrators zwischen 10 und 150 RLU liegt. Der Variationskoeffizient (VK %) für die Replikate des Negativkalibrators darf nicht größer als 25 % sein. Liegt der VK (%) über 25, so wird der Kontrollwert mit einem RLU Wert, der sich am weitesten vom Mittelwert entfernt befindet, als Ausreißer verworfen und der Mittelwert unter Verwendung der beiden verbleibenden Replikate erneut berechnet. Der neu errechnete VK (%) darf ebenfalls nicht über 25 % liegen, **anderenfalls ist die Verifizierung der Assaykalibrierung ungültig und der Testlauf muss für sämtliche Patientenproben wiederholt werden. In diesem Fall dürfen die Patientenergebnisse nicht berücksichtigt werden.**

### 2. Positivkalibrator (PC)

Der Positivkalibrator (PC) muss bei jedem Assay dreimal getestet werden. Der VK (%) für die Replikate des Positivkalibrator darf nicht größer als 20 % sein. Liegt der VK (%) über 20, so wird der Kontrollwert mit einem RLU-Wert, der sich am weitesten vom Mittelwert entfernt befindet, als Ausreißer verworfen und der Mittelwert unter Verwendung der beiden verbleibenden Replikate erneut berechnet. Der neu errechnete VK (%) darf ebenfalls nicht über 20 % liegen, **anderenfalls ist die Verifizierung der Assaykalibrierung ungültig und der Testlauf muss für sämtliche Patientenproben wiederholt werden. In diesem Fall dürfen die Patientenergebnisse nicht berücksichtigt werden.**

### 3. Quotient aus mittlerem PC-Wert und mittlerem NC-Wert

Zur Berechnung des Quotienten aus mittlerem PC zu mittlerem NC werden die Mittelwerte der Replikate des Positivkalibrators (mittlerer PC-Wert) und der Mittelwerte der Replikate des Negativkalibrators (mittlerer NC-Wert) herangezogen. Diesen Quotienten errechnet die Software. Bevor die Probenergebnisse interpretiert werden können, müssen diese Quotienten den folgenden Kriterien zur Verifizierung der Assay-Kalibration entsprechen: Liegt der Quotient zwischen 2,0 und 20, so fährt die Software mit der Berechnung des Cutoff-Wertes fort. Liegt der Quotient unter 2,0 oder über 20, so **ist die Verifizierung der Assay-Kalibration ungültig und der Assay muss für sämtliche Patientenproben wiederholt werden. In diesem Fall dürfen die Patientenergebnisse nicht berücksichtigt werden.**

**Hinweis:** Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Kalibratoren für den DNA-Test *digene* HC2 GC-ID wurden die mit dem *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) bei internen Studien gewonnenen Ergebnisse, bei denen in 62 Assays das Rapid Capture-System und in 43 Assays das manuelle Verfahren verwendet wurde, zusammengestellt (Tabelle 3). Die Ergebnisse zeigten, dass der mittlere prozentuale VK für den Positivkalibrator in diesen 105 Assays bei 6,5 % oder darunter und für den Negativkalibrator bei 14,6 % oder darunter lag. Wie durch den mittleren RLU-Wert des Negativkalibrators von 43 im manuellen Assay im Vergleich zu einem mittleren RLU-Wert von 54 bei der Anwendung des RCS gezeigt wird, ergab die RCS-Anwendung für die Negativkalibration leicht höhere RLU-Werte im Verhältnis zum manuellen Verfahren. Es zeigte sich jedoch, dass diese Verschiebung keine Auswirkungen auf die mit beiden optionalen Verfahren erhaltenen Testergebnisse hat. Bei umfangreichen Tests während der Entwicklung der RCS-Anwendung wurde ein Mittelwert aller RLU-Werte für den Negativkalibrator berechnet. Ausgehend von einer statistischen Berechnung von  $\pm 3$  SD dieses beobachteten Mittelwertes wurde die Grenze für den mittleren RLU-Wert des Negativkalibrators für den DNA-Test *digene* HC2 CT/GC auf 250 RLU festgesetzt. Der obere Grenzwert dieses Bereiches von  $\pm 3$  SD wurde um zusätzliche 20 % erweitert, um sicherzustellen, dass der RLU-Grenzwert für den NC im klinischen Alltag erreicht werden kann.

Der RLU-Mittelwert der NC liegt routinemäßig unter 150 % und der VK unter 25 %. Jedes Labor sollte entsprechend den Angaben in Dokument C24-2A des US-amerikanischen „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS) regelmäßig Qualitätskontrollen und Kalibrierungen vornehmen. In der RCS-Anwendung kann der mittlere RLU-Wert gelegentlich den Wert 150 überschreiten (zuweilen begleitet von einer Verringerung des PC/NC-Quotienten), der laut Tabelle 3 bei der Kalibrierung einen Mittelwert von 8,29 annimmt. In diesem Fall sind die Ergebnisse annehmbar, vorausgesetzt, der NC-RLU-Wert liegt nicht über 250 und der PC/NC-Quotient nicht unter 2,0. Wenn der NC-RLU-Wert den Wert 250 überschreitet oder der PC/NC-Quotient unter 2,0 fällt oder über 20 ansteigt, ist der Assay ungültig.

**Tabelle 3.** Statistische Zusammenfassung der Negativ- und der Positivkalibrator-Werte für die RCS-Anwendung und für Assays nach manuellem Verfahren.

Verfahren	Anzahl der Platten	Errechnete Mittelwerte des PC/NC-Quotienten				Testkit-Qualitätskontrollen (Mittelwert RLU/CO)	
		Mittel	Median	Min.	Max.	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Manuell	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Verfahren	Kalibrator	Errechnete Mittelwerte des RLU-Werts				Errechnete Mittelwerte des VK (%)
		Mittel	Median	Min.	Max.	
RCS	Negativ	54	46	24	127	14,4
	Positiv	399	405	179	606	6,5
Manuell	Negativ	43	36	16	120	14,6
	Positiv	295	309	167	415	4,7

### BERECHNUNG DER CUTOFF-WERTE

Sobald ein Assay nach den vorstehenden Kriterien validiert wurde, werden auf Grund der gültigen Positivkalibrator-Replikate die RLU-Grenzwerte (Cutoff-Werte) für die Bestimmung der positiven Proben ermittelt. Die RLU-Grenzwerte werden wie folgt berechnet:

RLU-Cutoff-Wert = Mittlerer RLU-Wert des Positivkalibrators

#### Beispielhafte Berechnung Des Cutoff-Wertes:

	RLU-Werte für NC	RLU-Werte für PC
	97	312
	101	335
	91	307
Mittelwert	96	318
VK (%)	4,9	4,7
Quotient aus mittlerem PC-Wert und mittlerem NC-Wert	-	3,31

Der RLU-Cutoff-Wert entspricht demzufolge dem mittleren PC-Wert und ist gleich 318.

Für alle von den Proben erhaltenen RLU-Werte werden von der *digene* Testanalyse-Software die Quotienten mit dem entsprechenden RLU-Grenzwert gebildet. Beispielsweise sollten alle Assays in Form des Quotienten aus Proben-RLU und Cutoff-Wert (CO) ausgedrückt werden.

**Hinweis:** RLU/CO-Werte und positive/negative Ergebnisse für alle getesteten Proben sind im Datenanalysebericht der *digene* Testanalyse-Software dokumentiert.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID enthält Proben zur Qualitätskontrolle. Nähere Angaben zur Eingabe von Chargennummern und Verfallsdaten der Qualitätskontrollen finden Sie im Benutzerhandbuch der *digene* Testanalyse-Software. Diese Kontrollen müssen bei jedem Assay durchgeführt werden. Dabei müssen die RLU-/CO-Werte einer jeden Qualitätskontrolle innerhalb der folgenden zulässigen Bereiche liegen, damit der Assay als gültig eingestuft werden kann. **Wenn die Qualitätskontrollen nicht in diese Bereiche fallen, ist der Assay ungültig und muss wiederholt werden.** Demzufolge dürfen die Patientenergebnisse aus einem ungültigen Assay nicht berücksichtigt werden.

	QC CT	QC GC
Min. RLU/CO	0	1,0
Max. RLU/CO	0,9999	20,00
Max. VK (%)	20,00	20,00

1. Bei den im Kit enthaltenen Qualitätskontrollen handelt es sich um klonierte CT- und GC-DNA-Targets, die jeweils aus denselben Plasmidkonstrukten (eines für CT und eines für GC) stammen, wie der Positivkalibrator, der mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID mitgeliefert wird.
2. Dieses Kontrollmaterial unterscheidet sich von dem GC-Organismus in der Probenmatrix und ist keine geeignete Kontrolle für das *digene* Specimen Transport Medium oder die PreservCyt-Lösung.
3. Der Positivkalibrator dient der Standardisierung von Probenergebnissen durch Feststellung des RLU-Cutoffs. Zur internen Qualitätskontrolle müssen die in diesem Testkit enthaltenen Qualitätskontrollen verwendet werden. Zusätzliche Qualitätskontrollen können nach den anwendbaren Leitlinien bzw. Bestimmungen der örtlich zuständigen Behörden oder Zulassungsorgane durchgeführt werden.
4. Zum Testen der Wirksamkeit der Lyse und Denaturierung der Proben sollte das jeweilige Labor regelmäßig die Probenherstellung kontrollieren, indem mindestens 5000 KBE/ml *Neisseria gonorrhoeae* (Auxotyp 1, 5 oder Typen-Stamm aus der ATCC) in ein frisches Röhrchen mit Specimen Transport Medium (STM) gegeben werden. Die Probe muss vor dem Test mindestens 1 Stunde lang unter den gleichen Bedingungen wie die klinischen Proben inkubiert werden. Bei korrekter Probenaufbereitung sollte ein RLU/CO von mindestens 2,50 erhalten werden. Alternativ können zu diesem Zweck auf im Handel erhältliche Probenreihen mit GC-Organismen verwendet werden.
5. Nur für von QIAGEN zugelassene Luminometer wurden zulässige Schwankungsbreiten für die Negativ- und Positivkalibratoren ermittelt. Der Negativkalibrator und die Qualitätskontrollen dienen lediglich der Überwachung auf substanziellen Reagenzausfall und stellen nicht die Genauigkeit des Assay-Grenzwertes sicher.

## INTERPRETATION DER PROBENERGEBNISSE

Entsprechend den Kriterien des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID ist Folgendes festzustellen:

1. Proben mit einem RLU/CO-Quotienten von über 2,50 gelten als "positiv für DNA von *Neisseria gonorrhoeae*." Die Lebensfähigkeit und/oder Infektiosität der Organismen kann daraus nicht abgeleitet werden, da Ziel-DNA auch dann vorliegen kann, wenn keine lebensfähigen Organismen vorhanden sind.
2. Proben mit einem RLU/CO-Quotienten von unter 1,00 enthalten keine DNA von *Neisseria gonorrhoeae* bzw. enthalten DNA in einer Menge unterhalb der Nachweisgrenze des Assays. Solche Ergebnisse sollten interpretiert werden als „keine DNA von *Neisseria gonorrhoeae* nachweisbar". Ein negatives Ergebnis kann eine Infektion durch *Neisseria gonorrhoeae* nicht ausschließen, da die Ergebnisse auf der korrekten Entnahme der Proben und für einen Nachweis ausreichenden DNA-Mengen abhängen.
3. Proben mit einem RLU/CO-Quotienten zwischen 1,00 und 2,50 gelten als nicht eindeutig. Die Ergebnisse können als vorbehaltlich positiv für DNA von *Neisseria gonorrhoeae* angesehen werden. Es wird jedoch empfohlen, den Test mit einer neuen Probe desselben Patienten oder mit einem alternativen Testverfahren zu wiederholen, da die Aussagekraft eines positiven Ergebnisses mit solchen RLU-Cutoff-Werten gering ist.\*

4. Es wird außerdem empfohlen, positive Ergebnisse durch ein anderes Verfahren zu bestätigen, falls die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit *Neisseria gonorrhoeae* im Hinblick auf die klinischen Befunde oder andere Laborbefunde unsicher oder fragwürdig ist. Analytische Studien mit diesem Test haben gezeigt, dass es eine eingeschränkte Kreuzreaktivität mit bestimmten anderen DNA-Sequenzen gibt, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Vgl. dazu den Abschnitt über die analytische Spezifität.
- \* Bei der klinischen Evaluierung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID konnten 3 von 17 Ergebnissen in diesem Ambivalenzbereich durch Testen in GC-Kulturen als positiv bestätigt werden; die verbleibenden 14 Proben erwiesen sich als falsch positiv. Bei einer danach durchgeführten Evaluierung ergaben 5 Proben einen initialen RLU/CO-Wert zwischen 1,00 und 2,50, von denen drei in GC-Kulturen als positiv bestätigt wurden. Wiederholte Zweifachtests dieser drei Proben mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID ergaben einen RLU/CO-Wert von  $\geq 1,00$ . Die verbleibenden 2 Proben waren in der Kultur negativ und blieben auch nach zweifacher Wiederholung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID negativ.

## VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN

**Bei Tests mit diesem Assay mit großem Probendurchsatz beachten Sie die Einschränkungen des Verfahrens in der Gebrauchsanweisung für das Rapid Capture-System.**

- Nur zur Verwendung in der *In-Vitro*-Diagnostik
- Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, sind die Abläufe des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID, die Verifizierungskriterien für die Assay-Kalibrierung, die Qualitätskontrolle und die Interpretation der Probenergebnisse genau einzuhalten.
- Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID kann nur auf Zervixproben angewandt werden, die mithilfe des *digene* HC2 DNA Collection Device oder des *digene* Female Swab Specimen Collection Kit entnommen und in STM gegeben wurden. Ebenso sind Proben möglich, die mit einem besenähnlichen Entnahmegerät entnommen und in Hologic PreservCyt-Lösung gegeben wurden.
- Ergebnisse dieses Tests sollten nur in Verbindung mit Informationen aus der klinischen Untersuchung des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.
- Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID liefert qualitative Ergebnisse. Der für eine Patientenprobe bestimmte numerische Wert (Quotient) über dem Cutoff-Wert korreliert nicht mit der in der Patientenprobe vorhandenen Menge an GC-DNA.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion durch *Neisseria gonorrhoeae* nicht aus, da deren Nachweis von der in der Probe vorhandenen Anzahl von Organismen abhängt und durch Probenentnahmeverfahren, patientenbedingte Faktoren, das Infektionsstadium und/oder die Art des infizierenden *Neisseria gonorrhoeae*-Stammes beeinflusst wird.
- Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID trifft keine Aussage hinsichtlich eines Therapieerfolgs.
- Der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID wurde nur zur Anwendung mit dem automatischen Plattenspüler validiert, wobei die in den Anleitungen für den Assay spezifizierten Einstellungen verwendet wurden. Diese Validierungsstudie wurde beim Hersteller durchgeführt. Die Dokumentationsdaten, die diese gemeinsame Anwendung unterstützen, liegen QIAGEN vor. Andere Plattenspülvorrichtungen oder Einstellungen erwiesen sich für die Anwendung mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID als nicht geeignet.
- Zur Minimierung von Ergebnisschwankungen aus dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID sollte das durchführende Laborpersonal ausreichend mit der Technik vertraut sein. Jedes Labor sollte außerdem die technischen Fertigkeiten des Personals zur Durchführung des Assays überwachen. Dazu wird empfohlen, im Handel erhältliche Testreihen mit GC-Organismen oder GC-DNA regelmäßig im Rahmen der internen Qualitätskontrollmaßnahmen zu testen.

## ERWARTETE ERGEBNISSE

### PRÄVALENZ

Die Prävalenz von *Neisseria gonorrhoeae*-positiven Proben richtet sich nach populationsbedingten Faktoren, wie Alter, Geschlecht und Risikofaktoren. Die in der klinischen Studienpopulation unter Anwendung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID beobachtete Prävalenz von *Neisseria gonorrhoeae* liegt im Bereich zwischen 1,1 und 13,0 %. Bei der Berechnung dieses Wertes wurde davon ausgegangen, dass die 17 Proben mit nicht eindeutigen Ergebnissen in der Studie positiv für GC-DNA waren (Tabelle 4). Acht dieser 17 Proben wurden später in GC-Kulturen oder mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) als positiv bestätigt.

**Tabelle 4.** Prävalenz von positiven Ergebnissen des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID in verschiedenen Testlabors.

Testlabor	Anzahl positive/ Anzahl getestet	Prävalenz (%)
1	60/460	13,0
2	34/302	11,3
3	23/324	7,1
4	10/390	2,6
5	4/349	1,1
Insgesamt	131/1825	7,2

### POSITIVER UND NEGATIVER PRÄDIKTIVER WERT

Die Berechnung des hypothetischen, positiven und negativen prädiktiven Wertes (PPV und NPV) für unterschiedliche Prävalenzraten bei Anwendung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID erfolgte anhand der allgemeinen Sensitivität und Spezifität, die für mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device (Zervixbürste) und für mit dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (Tupfer) entnommene Proben jeweils individuell bestimmt wurden. Tabelle 5 gibt den hypothetischen PPV und NPV für Bürstenproben (allgemeine Sensitivität 92,6 % und Spezifität 98,5 %) und Tabelle 6 für Abstrichproben (allgemeine Sensitivität 93,0 % und Spezifität 98,8 %) wieder.

**Tabelle 5.** Hypothetische prädiktive Werte im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID bei unterschiedlichen Prävalenzraten (Bürstenproben).

Prävalenzrate (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,6

**Tabelle 6.** Hypothetische prädiktive Werte im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID bei unterschiedlichen Prävalenzraten (Abstrichproben).

Prävalenzrate (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

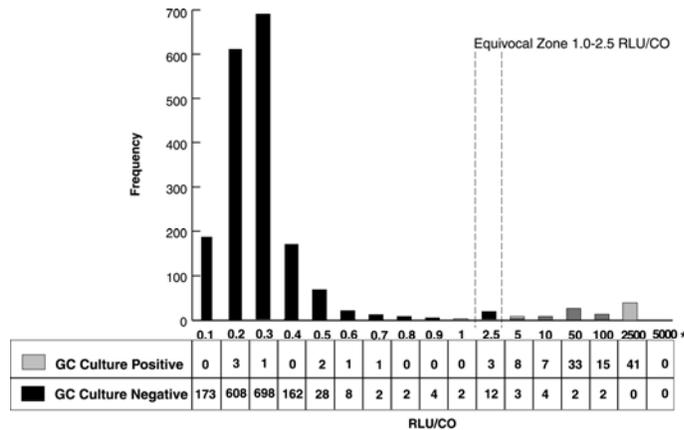
### HÄUFIGKEITSVERTEILUNG: RLU/CO-ERGEBNISSE AUS DEM DNA-Test *digene* HC2 GC-ID

Nachfolgend ist die bei der klinischen Multicenterstudie beobachtete Verteilung der RLU/CO-Quotienten aus dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID gezeigt (Abbildung 1). Diese Daten umfassen alle Proben, auf die der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID angewandt wurde und für die Ergebnisse aus GC-Kulturen vorlagen (n=1826). Die Ergebnisse wurden anhand folgender Kriterien interpretiert. Proben mit RLU/CO-Werten < 1,00 wurden als negativ eingestuft. Proben mit RLU/CO-Werten ≥ 2,50 wurden als positiv eingestuft. Proben mit RLU/CO-Werten zwischen 1,00 und 2,50 wurden als nicht eindeutig eingestuft.

Der RLU/CO-Quotient der im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID positiven Ergebnisse unterscheidet sich deutlich von dem der negativen Ergebnisse. Neunundneunzig Prozent (1676/1690) der im DNA-Test

*digene* HC2 GC-ID negativen Ergebnisse haben RLU/CO-Werte zwischen 0,0 und 0,5. Fünf (5/1690) der im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID negativen Ergebnisse ergaben RLU/CO-Werte zwischen 0,6 und 0,8. Insgesamt fällt weniger als ein Prozent (< 0,9 %, 17/1825) der Probenergebnisse in den Ambivalenzbereich des Assays, davon waren 47 % (8/17) in der GC-Kultur oder in der PCR positiv. Neunundachtzig Prozent (93/104) der im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID positiven Ergebnisse haben RLU/CO-Werte zwischen 10 und 2500.

**Diagramm 1.** Häufigkeitsverteilung der RLU/CO-Ergebnisse aus dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID.



\*Gezeigt ist das obere Ende des Bereiches, einschließlich des genannten Wertes.

## LEISTUNGSMERKMALE

### KLINISCHE STUDIENERGEBNISSE FÜR DIE VERSCHIEDENEN PROBENTYPEN

Die Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID wurden durch Vergleich der Assayergebnisse mit den Ergebnissen aus Gonorrhoe-Kulturen bestimmt. In insgesamt 5 verschiedenen Einrichtungen, einschließlich Familienplanungseinrichtungen und Kliniken für Frauenheilkunde und Geburtshilfe wurden eintausendachtundfünfzig (1825) Patientenproben, darunter Proben von Personen mit Geschlechtskrankheiten, getestet. Proben, die im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID positiv und in der Kultur negativ waren, wurden einer PCR unterzogen. Die Ergebnisse des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID wurden durch die Testergebnisse aus der PCT NICHT aufgelöst, die PCR hatte daher keinen Einfluss auf die Beurteilung der Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID. Die Ergebnisse aus der klinischen Studie für die mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device (Zervixbürste) entnommenen Proben sind in Tabelle 7 dokumentiert, die Ergebnisse der mit dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (Tupfer) gewonnenen Proben in Tabelle 8.

Die Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID wurden mit einem Cutoff-Wert von 1,0 bzw. 2,5 ermittelt - ohne Berücksichtigung von uneindeutig positiven Proben, die in den Ambivalenzbereich des Tests fallen. Vgl. hierzu den Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ in dieser Gebrauchsanweisung. Die Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID kann in Ihrem Labor daher unterschiedlich ausfallen; dies richtet sich nach der Verteilung der Werte, die in den Ambivalenzbereich fallen, und danach, wie die Ergebnisse der mit Vorbehalt als positiv gewerteten Proben bei einem zweiten Test (aus dem Ambivalenzbereich) ausfallen. Als Bezugspunkt gilt, dass weniger als 0,9 % der Proben (17/1825), die während der klinischen Multicenterstudie zur Ermittlung der Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID untersucht wurden, in diesen Bereich fielen. Weitere Informationen hierzu vermittelt die Häufigkeitsverteilung der RLU/CO-Ergebnisse im Abschnitt „Erwartete Ergebnisse“ dieser Gebrauchsanweisung.

Es liegen nicht genügend Daten vor, um genau zu bestimmen, ob die Sensitivität und der positive prädiktive Wert des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID bei Verwendung des *digene* Female Swab Specimen Collection Kit der Sensitivität und dem positiven prädiktiven Wert entsprechen, die bei mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device entnommenen Proben beobachtet werden. Da die Verwendung des *digene* HC2 DNA Collection Device zur Entnahme von Zervixproben bei Schwangeren kontraindiziert ist, kann

die Fähigkeit des Tests zum Nachweis von GC-DNA in dieser Patientenpopulation bzw. immer dann, wenn ein Tupfer verwendet wird, vermindert sein.

Leistungsschätzungen für den Assay basieren auf Tests von Proben, die zwischen 2 und 8 °C aufbewahrt bzw. eingefroren und binnen 1 - 2 Wochen nach Entnahme untersucht wurden.

Es wurde kein Vergleich der klinischen Sensitivität und Spezifität des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID zur Identifikation solcher Patienten mit klinisch aktiver Infektion, die auf Geschlechtspartner übertragen werden oder GC-bedingte Folgekrankheiten verursachen kann, zu den im Handel erhältlichen Nukleinsäureamplifikationsverfahren (NAA-Verfahren) zum Nachweis von GC-DNA durchgeführt. In klinischen Studien waren manche, im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID positive, in der Kultur jedoch negative, Proben beim Test mit einem modifizierten, kommerziell erhältlichen NAA-Assay ebenfalls positiv. Die geschätzte Sensitivität beruht auf der Anzahl der positiven Ergebnisse im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID bei Patienten, die in der Kultur positiv für *Neisseria gonorrhoeae* waren. Die Sensitivität des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID kann daher nur relativ zur Kulturpositivität mit einer Sensitivität von 60 – 85 % bestimmt werden.

**Tabelle 7.** *digene* HC2 GC-ID DNA-Test im Vergleich zu Ergebnissen aus der GC-Kultur bei Bürstenabstrichen. Nachfolgend sind die anhand der RLU/CO-Werte 1,0 bzw. 2,5 berechneten Leistungsmerkmale angegeben. In Klammern gesetzte Werte geben die Leistung bei einem RLU/CO-Cutoff von 2,5 wieder. Wenn sich die Punktschätzungen an jedem der evaluierten RLU/CO-Werte unterscheiden, schließen die 95 %igen Konfidenzintervalle beide Bereiche ein.

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

<sup>1</sup> Diese Information dient lediglich Informationszwecken; die Probenergebnisse konnten durch PCR nicht aufgelöst werden.

<sup>2</sup> Bei Einrichtung Nr. 5 lagen keine Bürstenabstriche von symptomatischen Patientinnen vor.

<sup>3</sup> In zwei Fällen wurde keine PCR durchgeführt.

\* - = nicht zutreffend

**Tabelle 8.** *digene* HC2 GC-ID DNA-Test im Vergleich zu Ergebnissen aus der GC-Kultur bei Tupferabstrichen. Nachfolgend sind die anhand der RLU/CO-Werte 1,0 und 2,5 berechneten Leistungsmerkmale angegeben. In Klammern gesetzte Werte geben die Leistung bei einem RLU/CO-Cutoff von 2,5 wieder. Wenn sich die Punktschätzungen an jedem der evaluierten RLU/CO-Werte unterscheiden, schließen die 95 %igen Konfidenzintervalle beide Bereiche ein.

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

<sup>1</sup> Diese Information dient lediglich zu Informationszwecken; die Probenergebnisse konnten durch PCR nicht aufgelöst werden.

<sup>2</sup> Bei Einrichtung Nr. 4 lagen keine Tupferabstriche von symptomatischen Patientinnen vor.

<sup>3</sup> In zwei Fällen wurde keine PCR durchgeführt.

\* - = nicht zutreffend

## REPRODUZIERBARKEIT

Als Teil der klinischen Multicenterstudie wurde eine Reproduzierbarkeitsstudie unter Verwendung eines Panels aus DNA-Targets von *Neisseria-gonorrhoeae* und klinischen Proben durchgeführt, die im *digene* HC2-GC-Test sowohl positiv als auch negativ getestet wurden. Die Studie untersuchte die Reproduzierbarkeit von Assay zu Assay, Tag zu Tag und Ort zu Ort sowie die Gesamt-Reproduzierbarkeit des DNA-Tests *digene* HC2 CT/GC.

Über drei Tage hinweg wurde zwei Mal am Tag an vier verschiedenen Orten (in 3 externen Labors und bei QIAGEN) ein 10-teiliges Panel maskierter denaturierter, klinischer und nichtklinischer (DNA-) Proben aus 8 positiven Proben sowie 2 negativen Proben in Replikaten zu jeweils sechs Stück getestet. Jedes Labor erstellte 36 Datenpunkte für jedes getestete Target. Alle Proben wurden denaturiert und vor der Untersuchung tiefgekühlt aufbewahrt. Bei den 1152 erwarteten positiven Ergebnissen wurde eine 100 %ige Übereinstimmung (1152/1152) erzielt. Bei den erwarteten negativen Ergebnissen wurde ebenfalls eine Übereinstimmung von 100 % erzielt (288/288). Die Übereinstimmung insgesamt betrug demnach 100 % (1440/1440), bei einem 95 %igen Konfidenzintervall von 99,7 - 100 und Kappa = 1,00. Es wurden keine signifikanten Schwankungen von Assay zu Assay, Tag zu Tag oder Ort zu Ort festgestellt, weshalb die Daten sämtlicher Assays von allen Labors kombiniert wurden (siehe Tabelle 9 unten).

**Tabelle 9.** Reproduzierbarkeit des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID in einer Multicenterstudie.

Target-Nr.	Labor 1		Labor 2		Labor 3		Labor 4		Gesamt		
	$\bar{x}$ RLU/CO	Übereinstimmung (%)	$\bar{x}$ RLU/CO	Ermittelt/erwartet	Übereinstimmung (%)						
1	2,5	100	2,1	100	2,7	100	2,6	100	2,5	144/144	100
2	4,8	100	4,2	100	5,0	100	5,2	100	4,8	144/144	100
3	29,4	100	23,3	100	30,1	100	30,4	100	28,3	144/144	100
4	51,5	100	43,0	100	52,1	100	54,1	100	50,2	144/144	100
5	2,5	100	2,0	100	2,5	100	2,5	100	2,4	144/144	100
6	4,7	100	3,5	100	4,9	100	4,8	100	4,5	144/144	100
7	14,0	100	10,6	100	13,9	100	14,1	100	13,2	144/144	100
8	16,7	100	12,7	100	17,4	100	18,2	100	16,3	144/144	100
9	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
GESAMT										1440/1440	100

In drei externen Labors wurde eine zweite Untersuchung zur Tauglichkeit und Reproduzierbarkeit des Tests durchgeführt, indem eine Pseudoprobenmatrix aus klinischen Epithelzellen mit ganzen Organismen der *Neisseria gonorrhoeae* (GC) versetzt wurde. Die 25 getesteten Proben umfassten negative sowie schwach (an der Nachweisgrenze liegende) und moderat positive Proben mit 2 GC-Stämmen, Mischinfektionen mit *Chlamydia trachomatis* (CT) und bluthaltige Proben. Zwölf Proben sollten erwartungsgemäß positiv ausfallen und dreizehn Proben sollten erwartungsgemäß negativ ausfallen. Die prozentuale Übereinstimmung zwischen beobachteten und erwarteten Ergebnissen aus dem DNA-Test *digene* HC2 GC-IDs in den drei Testlabors und für alle Labors kombiniert ist in Tabelle 10 dargestellt. Sensitivität, Spezifität, Übereinstimmung und die Kappa-Werte für jedes Labor sind in Tabelle 11 enthalten.

**Tabelle 10.** Prozentuale Übereinstimmung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID nach Testlabor.

Testlabor	Ermittelt/erwartet	Übereinstimmung <sup>a</sup> (%)
1	25/25	100 % (86,28 - 100 %)
2	25/25	100 % (86,28 - 100 %)
3	25/25	100 % (86,28 - 100 %)
Alle Testlabors kombiniert	75/75	100 % (95,20 - 100 %)

<sup>a</sup>Die Zahlenangaben in Klammern zeigen die 95 %-Konfidenzintervalle an.

**Tabelle 11.** Zusammenfassende Statistik des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID (Cutoff = 1,0).

Statistischer Wert	Testlabor 1	Testlabor 2	Testlabor 3	Gesamt
Sensitivität	100 % (73,54 - 100 %)*	100 % (73,54 - 100 %)	100 % (73,54 - 100 %)	100 % (90,26 - 100 %)
Spezifität	100 % (75,29 - 100 %)	100 % (75,29 - 100 %)	100 % (75,29 - 100 %)	100 % (90,97 - 100 %)
Übereinstimmung	100 % (86,28 - 100 %)	100 % (86,28 - 100 %)	100 % (86,28 - 100 %)	100 % (95,20 - 100 %)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

<sup>a</sup>Die Zahlenangaben in Klammern zeigen die 95 %-Konfidenzintervalle an.

Beim Routine-Labortest wurden 12 nicht eindeutige Proben identifiziert, von denen alle niedrig konzentrierte GC-Organismen ( $\sim 5 \times 10^4$  Organismen/ml), enthielten. Diese Proben in Tabelle 10 würden entsprechend dem Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ dieser Gebrauchsanweisung als positiv interpretiert. Der Assay demonstriert somit seine Fähigkeit zum Nachweis von GC-DNA in Proben mit Organismuskonzentrationen an oder nahe der Nachweisgrenze des Assays. Dies wurde außerdem durch Untersuchung einer vorliegenden Reihe von Proben untermauert, deren geringe Anzahl an Organismen in einem Bereich liegt, der mittels Nukleinsäureamplifikation nachweisbar ist. Tests in drei verschiedenen externen Labors und bei QIAGEN ergaben zu 100 % positive Ergebnisse (bzw. vorbehaltlich positive Ergebnisse) für die Proben dieser Reihe mit GC-Organismen. In zwei Fällen fielen die RLU/CO-Werte in den Ambivalenzbereich des Assays (siehe Tabelle 12 unten).

**Tabelle 12.** Ergebnisse aus der CT- und GC-Probenreihe.

Ergebnisse aus dem DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID			
Test-labor	RLU/CO	Interpretation	Erwartetes Ergebnis
1	0,12	NEG.	NEG.
	10,45	POS.	POS.
	10,26	POS.	POS.
	9,74	POS.	POS.
	0,14	NEG.	NEG.
2	0,09	NEG.	NEG.
	9,31	POS.	POS.
	9,93	POS.	POS.
	9,69	POS.	POS.
	0,09	NEG.	NEG.
3	0,11	NEG.	NEG.
	11,00	POS.	POS.
	12,08	POS.	POS.
	9,45	POS.	POS.
4	0,10	NEG.	NEG.
	0,07	NEG.	NEG.
	8,54	POS.	POS.
	7,27	POS.	POS.
	8,09	POS.	POS.
	0,08	NEG.	NEG.

## GENAUIGKEIT

In drei Testlabors wurde eine Studie zur Bestimmung der Genauigkeit der einzelnen Schritte eines Assays und der Gesamtgenauigkeit des DNA-Tests *digene* HC2 CT/GC mit einer Reihe positiver und negativer, maskierter, simulierter klinischer Proben durchgeführt. Zusätzlich wurde anhand derselben Probenreihe die Genauigkeit des Gerätes selbst und die Genauigkeit mehrerer Geräte untereinander mittels zweier separater Luminometer bewertet. Bei den beiden Luminometern handelte es sich um das DML 2000, das eines der für den Gebrauch mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID empfohlenen Luminometer ist, und um das Luminometer MLX. Das MLX gehörte zu den während der klinischen Evaluation verwendeten Luminometern, ist jedoch inzwischen nicht mehr erhältlich. In einem der drei Testlabors kam es zu technikbedingten Problemen mit anderen *digene* HC2-Tests, die im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurden, was wahrscheinlich auf falsche oder unzureichende Schulung des Personals zurückzuführen war. Obgleich die Ergebnisse der Genauigkeitsprüfung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID davon unbeeinflusst blieben, wurde das für die Tests zuständige Personal erneut in die richtige Technik eingewiesen.

Tabelle 13 zeigt die Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID für alle Testlabors zusammen (einschließlich des Labors mit den technischen Problemen vor der erneuten Unterweisung des Laborpersonals in der richtigen Assay-Technik). Nach erfolgreicher erneuter Einweisung des Personals zeigte der Assay eine vergleichbare Genauigkeit. Die festgestellten RLU/CO-Werte für Panelteil 3 der Testreihe (mit geringen Konzentrationen an GC-Organismen) lagen jedoch innerhalb bzw. in der Nähe des Ambivalenzbereichs des Assays von 1,0 - 2,5. Für die Analyse dieser Daten wurden alle RLU/CO-Werte, die in den Ambivalenzbereich fielen bzw. den Wert 2,5 überschritten, als positiv angenommen. Obgleich dies aus der folgenden Tabelle nicht hervorgeht, lag die Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse mit den erwarteten Ergebnissen in allen drei Labors bei 100 % (54/54) (93,4 - 100 %, 95%-KI).

**Tabelle 13.** Geräteinterne und geräteübergreifende Genauigkeitsschätzungen sowie Genauigkeitsschätzungen innerhalb eines Assays und auf den Gesamtversuch bezogen für RLU/CO je nach Test und Target.

Panelteil	n	Mittelwert	Geräte-intern		Geräte-übergreifend		Assay-intern		Gesamt	
			(*SD)	(% VK)	(SD)	(% VK)	(SD)	(% VK)	(SD)	(% VK)
	54	0,0974	0,0104	10,6818	0,0017	1,7328	0,0275	28,2556	0,0275	28,1978
2	54	0,0967	0,0111	11,5031	0,0015	1,5618	0,0338	34,9362	0,0342	35,4230
3	54	3,2335	0,1502	4,6462	0,0356	1,0997	0,3520	10,8869	0,3866	11,9551
4	54	3,8407	0,2078	5,4092	0,0525	1,3671	0,3401	8,8541	0,3487	9,0802
5	54	16,1676	1,0507	6,4986	0,1122	0,6940	2,1788	13,4766	2,1437	13,2589
6	54	18,0704	1,0539	5,8321	0,3456	1,9124	2,3701	13,1158	2,3316	12,9027

\* SD = Standardabweichung

Zur Analyse dieser Daten wurden alle RLU/CO-Werte, die in den Ambivalenzbereich fielen bzw. den Wert 2,5 überschritten, als positiv angenommen. Bei QIAGEN wurde eine weitere Studie zur Bestimmung der Gesamtgenauigkeit des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID durchgeführt, wobei das DML 2000 verwendet wurde. Dazu wurde eine aus sechs Proben bestehende Testreihe unter Verwendung einer simulierten klinischen Probenmatrix aus kultivierten Epithelzellen im *digene* STM vorbereitet, bestehend aus zwei Negativproben, zwei schwach positiven Proben und zwei moderat positiven Proben, von denen alle mit Bürstenabstrichen entnommen worden waren. Jede Testreihe wurde von zwei Technikern innerhalb von 5 Tagen in dreifacher Ausführung getestet und zwar jeweils zwei Testreihen pro Platte. Die pro Platte verwendeten Testreihen wurden jeweils frisch denaturiert. Die Ergebnisse der Gesamtgenauigkeit für den DNA-Test *digene* HC2 GC-ID für alle 5 Untersuchungstage sind in Tabelle 14 aufgeführt. Obgleich dies aus den folgenden Tabellen nicht hervorgeht, lag die Übereinstimmung der qualitativen Interpretation der Ergebnisse mit den erwarteten Ergebnissen bei Anwendung eines RLU/CO von 1,0 bei 100 % (120/120; 96,97 - 100 %, 95%-KI).

**Tabelle 14.** Gesamtgenauigkeit für DNA-Test *digene* HC2 GC-ID.

Panelteil	n	(Mittelwert RLU/CO)	SD	VK (%)	Mittelwert – 2 x SD	Mittelwert + 2 x SD
1	120	0,11	0,0361	32,28	0,04	0,18
2	120	0,11	0,0283	26,45	0,05	0,16
3	120	3,03	0,3212	10,62	2,38	3,67
4	120	4,06	0,4151	10,23	3,23	4,89
5	120	14,41	2,2239	15,44	9,96	18,85
6	120	13,34	1,7298	12,97	9,88	16,80

## GENAUIGKEIT MIT PRESERV CYT-PROBEN

Zur Bestimmung der Assaygenauigkeit beim Testen von Proben in PreservCyt-Lösung zwischen Labors und an verschiedenen Tagen wurde eine Multicenter-Studie durchgeführt. An zwei Standorten, die nicht zu QIAGEN gehören, wurde ein zwölfteiliges Panel simulierter, in PreservCyt-Lösung gesammelter Patientenproben getestet. In jedem Labor wurde das Panel dann über drei Tage hinweg zweimal täglich drei Mal unter Verwendung von zur selben Charge gehörenden Reagenzien getestet. Das zwölfteilige Panel simulierter PreservCyt-Proben wurde mit verschiedenen Mengen an GC (Auxotyp 22, ATCC 27631) präpariert, um das in Tabelle 15 dargestellte Panel zu schaffen:

**Tabelle 15.** Genauigkeitspanel mit simulierten Proben in PreservCyt-Lösung für DNA-Test *digene* HC2 GC-IDs.

Bulkprobe	Panelteil*	Erwartetes Ergebnis des DNA-Tests <i>digene</i> HC2 GC-ID	Ungefährer RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Schwach GC-positiv	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Mäßig GC-positiv	~10
C	5N, 11N	Negativ	~0,20
D	6N, 12N	Negativ	~0,20

\*Die Proben-ID gibt den bekannten Status von *Neisseria gonorrhoeae* an [positiv (P) oder negativ (N)]

Zur Datenanalyse wurden Panelteile, die aus derselben Bulkprobe stammten, kombiniert.

**Tabelle 16.** Qualitative Ergebnisse pro Bulkprobe – DNA-Test *digene* HC2 GC-ID

Bulkproben- Pool	GC-positiv n (%)	Uneindeutig n (%)	Negativ n (%)	Insgesamt
<b>Negativ (5N, 11N)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
<b>Negativ (6N, 12N)</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
<b>Negativ insgesamt</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
<b>Schwach positiv (1P, 2P, 7P, 8P)</b>	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
<b>Mäßig positiv (3P, 4P, 9P, 10P)</b>	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
<b>Positiv insgesamt</b>	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Tabelle 17.** Standardabweichungen (SD) und Variationskoeffizienten (VK) für die Genauigkeit in verschiedenen Labors bzw. an verschiedenen Tagen: DNA-Test *digene* HC2 GC-ID in PreservCyt

Probe	N	Mittelwert RLU/CO	SD Assay-intern	SD Assay-übergreifend	SD Tages-übergreifend	SD Labor-übergreifend	SD insgesamt	VK (%)
Negativ (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negativ (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
Mäßig GC-positiv (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
Schwach GC-positiv (1P, 2P, 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

\* Negative Abweichungen wurden auf Null gesetzt

## ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze) des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID wurde durch direktes Testen einer Verdünnungsreihe einer Probenserie aus 114 gesonderten Isolaten von *Neisseria gonorrhoeae* bestimmt. Die 114 Isolate repräsentierten 13 Auxotypen, 5 Serotypen, 10 antibiotikaresistente Stämme, 6 plasmidfreie Stämme sowie 2 uncharakterisierte, in der Multicenterstudie für diskordant befundene Isolate. Von jedem Isolat wurde eine Reihe von Vierfachverdünnungen hergestellt und im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID zur Feststellung der Nachweisgrenzen einmal getestet. Die Nachweisgrenze für jeden *Neisseria*-Auxotyp ist in Tabelle 18 zusammengefasst. Die angegebene Nachweisgrenze entspricht derjenigen Verdünnung eines jeden Auxotyps, die Ergebnisse innerhalb des Ambivalenzbereichs des Assays (RLU/CO: 1,0 - 2,5) oder in dessen unmittelbarer Nähe lieferte.

Die analytische Sensitivität des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID variierte in Bezug auf die 114 getesteten *Neisseria*-Isolate zwischen 25 und 50.000 KBE/Assay, einschließlich Auxotypen, Serotypen sowie plasmidfreier und antibiotikaresistenter Stämme. Nur einer der sechs getesteten plasmidfreien Stämme und einer der fünf getesteten *Neisseria gonorrhoeae* IA-5 Serotypen wurde bei einer Konzentration von 50.000 KBE/Assay nachgewiesen; bei Konzentrationen über 5.000 KBE/Assay wurde keines der anderen 112 Isolate nachgewiesen. Die durchschnittliche Nachweisgrenze für alle 114 Isolate lag zwischen 974 und 2887 KBE/Assay unter Berücksichtigung der Isolatverdünnungen, die Ergebnisse innerhalb des Ambivalenzbereichs und über 2,5 RLU/CO lieferten. Die durchschnittliche Nachweisgrenze lag insgesamt bei 1931 KBE/Assay ( $3,8 \times 10^4$  KBE/ml). Klinische Proben, die Organismen in einer Konzentration an oder nahe bei der Nachweisgrenze enthalten, müssen gegebenenfalls in einem alternativen Verfahren erneut getestet werden oder der Patientin muss eine neue Probe entnommen und getestet werden (vgl. hierzu den Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ in dieser Gebrauchsanweisung).

**Tabelle 18.** Zusammenfassung: Nachweisgrenzen der Sensitivität für GC-Auxotypen und –Serotypen sowie plasmidfreie und antibiotikaresistente Stämme.

Auxotyp	Nachweisbare Konzentration	
	KBE/ml	KBE/Assay
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp 12	500 - 5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp 16	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp 22	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp 5	500 - 5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp 9	5 x 10 <sup>4</sup>	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp AHU (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp Arg (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp AU (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp PAU (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp Pro (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotyp Proto (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> , moderate Resistenz gegen Ciprofloxacin (Cipl) (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> , Ciprofloxacin-resistent (Cip R) (4 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> , Andere - 5423	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Andere - 5658	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>6</sup>	50 - 50000
<i>N. gonorrhoeae</i> , plasmidfreie Stämme (6 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> , Serotyp I A-1 oder IA-2 (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup>	500 - 50000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotyp I A-5 (4 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotyp I B-1 (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serotyp I B-4 oder IB-15 (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> , Spectinomycin-resistent (SpecR)	10 <sup>5</sup>	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 Isolate)	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Amerika (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Niederlande (5 Isolate)	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	500 - 5000
Stamm vom Typ <i>N. gonorrhoeae</i>	500 - 5000	25 - 250

#### ZUSÄTZLICHE ÜBERLEGUNGEN ZU PRESERV CYT-PROBEN

Die im vorangegangenen Abschnitt für STM beschriebenen Untersuchungen zur Bestimmung der analytischen Empfindlichkeits-Nachweisgrenzen wurden für Proben in PreservCyt-Lösung nicht wiederholt, da davon ausgegangen wurde, dass die analytische Empfindlichkeit unabhängig davon ist, ob es sich um STM-Proben oder Proben in PreservCyt-Lösung handelt – dies besonders, da Proben in PreservCyt-Lösung dem in dieser Anleitung beschriebenen *Verfahren zur Vorbereitung von Proben in PreservCyt-Lösung* unterworfen werden. Nach der Behandlung mit diesem Verfahren gleichen die Proben in PreservCyt-Lösung in ihrer Zusammensetzung den STM-Proben vor ihrem Einsatz im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID.

Da aber die Proben in PreservCyt-Lösung bei der Präparation zentrifugiert werden, war es notwendig, den potenziellen Einfluss der Zentrifugation auf die analytische Empfindlichkeit des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID abzuschätzen. Um den potenziellen Einfluss der Zentrifugation auf die analytische Empfindlichkeit abzuschätzen, wurden achtundachtzig (88) Paare DNA-negativer *Neisseria-gonorrhoeae*-Proben in STM und PreservCyt-Lösung mit gleichen Mengen an *Neisseria-gonorrhoeae*-Organismen (plasmidloser Stamm NRL 33151) präpariert. Die gepaarten Proben wurden getestet und die analytische Empfindlichkeit wurde durch Vergleich der gemessenen mittleren RLU/CO-Werte abgeschätzt [(PreservCyt:STM) x 100].

**Tabelle 19.** Vergleich der analytischen Empfindlichkeit – DNA-Test *digene* HC2 GC-ID – Gepaarte Proben in PreservCyt-Lösung und STM.

	DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
<b>Probenanzahl</b>	88	88	-
<b>Mittelwert RLU/CO</b>	3,97	4,91	1,24
<b>Median RLU/CO</b>	4,01	4,93	1,23
<b>Standardabweichung</b>	0,34	1,00	-
<b>Min. RLU/CO</b>	3,06	2,30	-
<b>Max. RLU/CO</b>	4,77	7,10	-

Eine zusätzliche Studie mit gepaarten, simulierten Proben lieferte einen ähnlichen Vergleich. Patientenproben in PreservCyt-Lösung von einem nicht zu QIAGEN gehörenden Testlabor wurden mithilfe des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID gescreent, um positive Proben zu identifizieren. Diese positiven Patientenproben wurden kombiniert, so dass 10 konzentrierte PreservCyt-Probenpools gebildet wurden. Von diesen Pools wurden zwei Aliquots vorbereitet und behandelt, um Pellets zu erhalten. Die Zellpellets wurden in phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendiert. Das resuspendierte Pellet von Aliquot A wurde in STM gegeben und das von Aliquot B in PreservCyt. Beide Aliquots wurden mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID mit folgenden Ergebnissen getestet:

**Tabelle 20.** Vergleich der analytischen Empfindlichkeit – DNA-Test *digene* HC2 GC-ID - Simulierte (gepoolte) Patientenproben in PreservCyt-Lösung gepaart mit Proben in STM.

	DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		PC: STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
<b>Probenanzahl</b>	10	10	-
<b>Mittelwert RLU/CO</b>	4,80	4,32	0,90
<b>Median RLU/CO</b>	2,66	2,47	0,93
<b>Standardabweichung</b>	5,44	5,08	-
<b>Min. RLU/CO</b>	1,16	1,02	-
<b>Max. RLU/CO</b>	18,97	17,26	-

## ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurde eine Reihe im weiblichen Anogenitaltrakt potenziell auffindbarer Bakterien, Viren, Plasmide sowie humanes Zellmaterial und Blutprodukte untersucht mit dem Ziel, zu bestimmen, ob es mit den für den *digene* HC2 GC-Test verwendeten GC-Sonden zu Kreuzreaktivität kommen würde. Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Mikroorganismen bei Konzentrationen von  $10^5$  und  $10^7$  Organismen bzw. KBE pro ml und, soweit möglich, bei einer Konzentration von  $10^9$  Organismen pro ml untersucht. Wie im Folgenden angegeben, wurden gereinigte DNA von Viren und Plasmiden bei verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Getestete Bakterien:

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 Isolate) <sup>e</sup>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 Isolate) <sup>f</sup>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Neisseria cinerea</i> (6 Isolate)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 Isolate)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria</i> -Spezies <sup>g</sup> *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 Isolate) <sup>d</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (Gruppe A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 Isolate) <sup>d</sup>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 Isolate)	<i>Neisseria sicca</i> (6 Isolate)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>flava</i> (5 Isolate)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> <sup>b</sup>	<i>Neisseria subflava</i> biovar <i>perflava</i> (4 Isolate) <sup>h</sup>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>a</sup> (2 Stämme)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> <sup>b</sup> (Serotyp B, Ba, E, J, L3) <sup>c</sup>	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (klinische Isolate) <sup>†</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> (HB101) <sup>†</sup>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Gemella heamolysans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gr. B)
<i>Kingella denitrificans</i> <sup>d</sup>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Gr. A)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> <sup>i</sup>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	

---

### Getestete Konzentrationen (Organismen/ml bzw. KBE/ml für *Neisseria*-Arten):

a  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^4$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^8$

b  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^7$  und  $2 \times 10^8$

c  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$

d  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$

e  $1,1 \times 10^5$ ,  $1,1 \times 10^7$ ,  $1,1 \times 10^9$

f  $9,7 \times 10^5$ ,  $9,7 \times 10^6$ ,  $9,7 \times 10^8$

g  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  und  $2 \times 10^9$

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

i  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$

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

\*ATCC *Neisseria* Stamm mit Merkmalen sowohl von *Neisseria gonorrhoeae* als auch von *Neisseria meningitidis* (ATCC-Nr. 43831).

Alle Bakterien aus dem Urogenitaltrakt, bei denen es sich um *Neisseria gonorrhoeae* handelte, testeten im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID negativ, mit Ausnahme der drei kommensalen Neisseria-Stämme und *Chlamydia psittaci*. Mit *Chlamydia psittaci* und *Neisseria lactamica* ergab sich nur mäßig starke Kreuzreaktivität, die als vorbehaltlich positiv interpretiert werden würde. Die Interpretation der Ergebnisse der Urogenitalproben mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID sollte durch solche Kreuzreaktivität nicht beeinflusst werden. Im Folgenden sind Organismen genannt, die eine gewisse Kreuzreaktivität gezeigt haben:

	Interpretation	Konzentration, bei der Kreuzreaktivität auftrat
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 von 2 Isolaten)	Vorbehaltlich positiv*	$1 \times 10^7$ Organismen/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 von 6 Isolaten)	Vorbehaltlich positiv*	$1 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (Gruppe Y, 1 von 2 Isolaten)	Positiv	$1 \times 10^7$ KBE/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 von 6 Isolaten)	Positiv	$5 \times 10^5$ KBE/ml

\* RLU/CO fiel in den Ambivalenzbereich des Assays von 1,00 bis 2,50.

Die drei kommensalen *Neisseria*-Stämme, *N. lactamica*, *N. meningitidis* und *N. mucosa* kommen alle vorrangig im Nasopharynx und in den oberen Atemwegen vor. Sie werden selten bis nie aus dem Urogenitalsystem isoliert.<sup>13,14</sup> Das kreuzreaktive Isolat von *Neisseria meningitidis*, Gruppe Y, erwies sich als untypisierbar in Bezug auf die Lipopolysaccharide und kommt in der Allgemeinbevölkerung selten vor. *Chlamydia psittaci* kommt u. U. auf der Haut von Personen vor, die mit Vögeln in Kontakt kommen, wurde jedoch im Anogenitalbereich nicht nachgewiesen.<sup>15</sup>

Darüber hinaus waren nicht alle Isolate dieses speziellen Stammes im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID kreuzreaktiv, was die Wahrscheinlichkeit vermindert, dass mit einer klinischen Probe ein falsch positives Ergebnis erhalten wird, wenn dieser Stamm vorhanden ist. So waren beispielsweise fünf der sechs analysierten Isolate von *N. lactamica* oder *N. mucosa* im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID negativ; dasselbe trifft für einen der zwei getesteten *Chlamydia psittaci*-Stämme zu. Es wird daher nicht erwartet, dass die mit den drei kommensalen Neisseria-Stämmen und *Chlamydia psittaci* beobachtete Kreuzreaktivität im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID beim Testen von Anogenitalproben zu einer unkorrekten klinischen Interpretation eines positiven Ergebnisses führt.

Es folgt eine Liste mit getesteter viraler DNA, Plasmid-DNA sowie humanem Zellmaterial und Blutprodukten mitsamt deren getesteten Konzentrationen:

Cytomegalovirus <sup>a</sup>	Humanes Papillomavirus Typ 6 <sup>f</sup>
Epstein-Barr-Virus <sup>b</sup>	Humanes Papillomavirus Typ 11 <sup>f</sup>
Hepatitis-B-Surface-Antigen-positives Serum <sup>c</sup>	Humanes Papillomavirus Typ 16 <sup>f</sup>
Herpes simplex I <sup>d</sup>	Humanes Papillomavirus Typ 18 <sup>f</sup>
Herpes simplex II <sup>d</sup>	pBR322 <sup>i</sup>
Human Immunodeficiency Virus (HIV) <sup>b,g</sup>	SV40 <sup>j</sup>
Genomische Human-DNA <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Z <sup>i</sup>
Humane Plazenta-DNA <sup>e</sup>	PGEM <sup>®</sup> 3Zf(-) <sup>j</sup>
Humanes Vollblut <sup>h</sup>	Humane Epithelzellen <sup>k</sup>

Getestete Konzentrationen:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Keines der getesteten Viren zeigte Kreuzreaktivität mit dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID, dagegen ergab sich Kreuzreaktivität mit den Plasmiden pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Z und pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). Sämtliche andere DNA, einschließlich der menschlichen DNA, war negativ. Humane Blut- und Epithelzellen haben im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID nicht kreuzreagiert. Kreuzreaktivität zwischen pBR322 und dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID ist aufgrund der Art und Weise, auf welche die GCS-Sonde hergestellt wird, nicht unerwartet. Das Vorhandensein homologer Sequenzen zu pBR322 in humanen Genitalproben ist bekannt, bei Vorliegen hoher Konzentrationen an Bakterienplasmiden sind daher falsch positive Ergebnisse möglich. Keine der 103 getesteten Proben aus einer US-amerikanischen klinischen Multicenterstudie, die sich im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID als positiv für *Neisseria gonorrhoeae* erwiesen, wurde jedoch aufgrund kreuzreaktiver pBR322-Sequenzen als falsch positiv identifiziert. Die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse für klinische Proben durch Kreuzreaktivität mit homologen pBR22-Sequenzen im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID ist daher gering. Obgleich der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID potenziell mit *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM und mehreren kommensalen Neisseria-Spezies kreuzreagieren kann, ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass diese Organismen die Interpretation des Tests beeinflussen könnten, wie die Ergebnisse der klinischen Multicenterstudie zeigten.

### HOMOLOGIE DER SONDEN MIT GESAMTPLASMID-DNA UND GENOMISCHER DNA

Die genomischen Sonden sind zu etwa 0,5 % des Genoms von *Neisseria gonorrhoeae* homolog. Die Sonden im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID setzen sich folgendermaßen zusammen:

Sonde	Typ	Ungefähre Größe des Inserts (bp)	% des Genoms
pGC1	Genomisch	6.400	0,34 %
pGC2		3300	0,17 %
		9.700 (gesamt)	0,51 %
pGC3	Kryptisches Plasmid	4200	-*

\*Dies entspricht der gesamten Sequenz der Sonde.

### WIRKUNG VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF STM-PROBEN

Der Einfluss von Blut und anderen potenziell störenden definierten Substanzen auf den DNA-Test *digene* HC2 GC-ID wurde bestimmt. Positiv getesteten Proben (klinischen Probenpools) wurde Vollblut, handelsübliches Duschbad, antifungale Creme und empfängnisverhütendes Gel (allesamt Substanzen, die häufig in Zervixproben gefunden werden können) in Konzentrationen hinzugefügt, die in Zervixproben üblicherweise vorkommen (siehe Tabelle 21). Mit keiner der vier Substanzen und bei keiner der Konzentrationen wurden falsch positive Ergebnisse festgestellt. Eine Untersuchung nicht definierter Substanzen in einer Population von 100 negativen klinischen Proben zeigte, dass nicht definierte Substanzen die Bildung eines positiven Signals im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID nicht zu beeinträchtigen scheinen. Als Vergleich wurde das bei einem Test von GC-Organismen in STM erzeugte Signal herangezogen.

**Tabelle 21.** Einwirkung von Substanzen auf Testergebnisse.

Ergebnisse aus dem DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID							
Getestete Substanz	Konz.	Gepoolte klinische Proben				Specimen Transport Media	
		Negativ		Positiv*		Positiv*	
		RLU/CO	Beobachtet	RLU/CO	Beobachtet	RLU/CO	Beobachtet
Blut	1%	0,15	-	3,41	-	2,70	-
	5 %	0,21	+37 %	3,17	-7 %	3,21	+19 %
Duschbad	1 %	0,19	+22 %	3,11	-9 %	3,05	+13 %
	5 %	0,21	+37 %	3,48	+2 %	2,80	+4 %
Antifungale Creme	1 %	0,18	+20 %	3,47	+2 %	3,20	+18 %
	5 %	0,19	+20 %	3,60	+5 %	2,95	+9 %
Empfängnis verhütendes Gel	1 %	0,20	+30 %	3,52	+3 %	3,09	+14 %
	5 %	0,08	-54 %	3,18	-7 %	2,98	+10 %
	5 %	0,08	-54 %	3,24	+5 %	3,10	+15 %

\* mit 10<sup>5</sup> KBE/ml *Neisseria gonorrhoeae*, Auxotyp 1.

## WIRKUNG VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN PRESERV CYT-LÖSUNG

Für den Gebrauch von PreservCyt-Proben wurden keine Abschätzungen bestimmter störender Substanzen durchgeführt, wie dies im vorangegangenen Abschnitt für STM-Proben beschrieben wurde. Man geht jedoch nicht davon aus, dass sich das Interferenzprofil von PreservCyt-Proben von dem der STM-Proben unterscheidet, da die Entnahme der Endozervixproben für PreservCyt- und für STM-Proben an derselben anatomischen Stelle erfolgt und da eine PreservCyt-Probe einem Präparationsverfahren unterworfen wird (Einzelheiten siehe Gebrauchsanweisung für den *digene* HC2-Probenkonversionskit), durch das sie einer STM-Probe von der Zusammensetzung her vergleichbar wird.

In vollständig konvertierten PreservCyt-Proben können Spuren von zurückbleibendem Sample Conversation Buffer (SCB)<sup>1</sup> enthalten sein. Daher wurde eine analytische Studie durchgeführt, um die analytische Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID bei verschiedenen SCB-Mengen zu überprüfen. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Plasmid-GC-DNA in STM präpariert. Anschließend wurde den Proben SCB im Überschuss zugegeben, und es wurden drei Aliquots von jeder Probe getestet, um für jede Probe einen RLU/CO-Mittelwert in Gegenwart von PreservCyt-Lösung bzw. SCB zu ermitteln. Der Vergleich dieser RLU/CO-Mittelwerte jeder Probe mit den RLU/CO-Mittelwerten jeder STM-Kontrollprobe ergab keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse.

<sup>1</sup> Der Sample Conversion Buffer ist eine gepufferte Lösung mit Eosin Y und 0,05 % (w/v) Natriumazid, die für die Konversion von Proben, welche in PreservCyt-Lösung vorliegen, benötigt wird. Genaue Informationen hierzu finden Sie in der Gebrauchsanweisung des *digene* HC2 Sample Conversion Kit von QIAGEN.

## GENAUIGKEIT DES DNA-TESTS *digene* HC2 GC-ID AM CUTOFF MIT KLINISCHEN PROBEN IN STM

Die Reproduzierbarkeit des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID mit klinischen Proben in STM wurde in einer Studie anhand von 30 klinischen Pools (15 positive und 15 negative) bestimmt, die durch Kombination zuvor denaturierter und getesteter Zervix-Bürstenabstriche in STM hergestellt wurden. Die Proben wurden vierfach täglich über 5 Tage hinweg getestet, d. h. jede Probe wurde insgesamt 20 Mal getestet. Zum Testen wurde der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID verwendet. Für jede Probe wurden über 5 Tage hinweg der mittlere RLU/CO-Wert, die 95 %-Konfidenzintervalle über dem Mittelwert (95-%-KI) und der prozentuale Anteil positiver Ergebnisse bestimmt (siehe Tabelle 22).

**Tabelle 22.** Mittlerer RLU/CO-Wert mit Konfidenzintervallen und prozentualer Anteil der positiven Ergebnisse im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID (in absteigender Reihenfolge nach mittlerem RLU/CO-Wert)

Nr.	RLU/CO	95-%-KI	Positive Proben (%)
1	1,92	1,31 - 2,00	100 (20/20)
2	1,22	1,16 - 1,29	100 (20/20)
3	1,21	1,16 - 1,25	100 (20/20)
4	1,21	1,16 - 1,25	90 (18/20)
5	1,17	1,03 - 1,28	100 (20/20)
6	1,14	1,09 - 1,18	90 (18/20)
7	1,08	1,04 - 1,12	80 (16/20)
8	1,05	1,00 - 1,09	70 (14/20)
9	1,05	1,01 - 1,09	70 (14/20)
10	1,02	0,98 - 1,06	65 (13/20)
11	1,00	0,96 - 1,03	65 (13/20)
12	1,00	0,97 - 1,03	45 (9/20)
13	1,00	0,96 - 1,03	40 (8/20)
14	0,98	0,95 - 1,02	45 (9/20)
15	0,91	0,89 - 0,94	10 (2/20)
16	0,90	0,87 - 0,92	0 (0/20)
17	0,87	0,84 - 0,91	5 (1/20)
18	0,86	0,83 - 0,89	0 (0/20)
19	0,84	0,82 - 0,85	0 (0/20)
20	0,82	0,79 - 0,85	0 (0/20)
21	0,79	0,75 - 0,82	0 (0/20)
22	0,77	0,78 - 0,80	0 (0/20)
23	0,76	0,74 - 0,79	0 (0/20)
24	0,75	0,78 - 0,79	0 (0/20)
25	0,73	0,70 - 0,75	0 (0/20)
26	0,56	0,54 - 0,59	0 (0/20)
27	0,56	0,54 - 0,59	0 (0/20)
28	0,56	0,53 - 0,59	0 (0/20)
29	0,54	0,52 - 0,56	0 (0/20)
30	0,12	0,11 - 0,13	0 (0/20)

Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr über dem Cutoff waren in 97 % der Fälle positiv bzw. vorbehaltlich positiv, während Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr unter dem Cutoff in 100 % der Fälle negativ waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass Proben, deren Wert 20 % oder mehr vom Cutoff abweicht, im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID übereinstimmende Ergebnisse liefern.

Proben mit Werten in der Nähe des Cutoffs des Assays waren überwiegend positiv bzw. negativ. Proben, die höchstens 20 % über dem Cutoff des Assays lagen, blieben in 69,4 % der Fälle positiv bzw. positiv unter Vorbehalt. Proben, die höchstens 20 % unter dem Cutoff des Assays lagen, blieben in 91,4 % der Fälle negativ.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der DNA-Test *digene* HC2 GC-ID mit klinischen Proben in STM reproduzierbare Ergebnisse liefert, wenn die RLU/CO-Werte dieser Proben höchstens 20% über oder unter dem Cutoff des Assays liegen.

## BISHERIGE VERFAHRENSWEISE

Früher wurde zur Gewinnung von Daten und zur Bestimmung der Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID außer dem DML 2000 auch das Luminometer MLX von Dynex verwendet. Das Luminometer MLX ist inzwischen nicht mehr erhältlich; nur das DML 2000 wird noch zur Generierung von Ergebnissen verwendet. Die nachstehenden Daten wurden aus der klinischen Multicenterstudie zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Positiv- und Negativkalibrators generiert und werden weiter unten als rein historische Informationen zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Positiv- und Negativkalibrators und zur Schätzung der Häufigkeit, mit der eine manuelle Neuermittlung erforderlich sein könnte, wurden die Ergebnisse aus drei (von 79) klinischen Tests mit denen aus dem DNA-Test *digene* HC2 GC-ID zusammengetragen (Tabelle 23). Die Ergebnisse zeigten, dass der mittlere prozentuale VK für diese 79 Assays bei 5,79 % lag und kein Mittelwert eines Negativkalibrators den Wert von 150 RLU überschritt. Unter Berücksichtigung aller 3 Replikate des Positivkalibrators pro Assay ergab sich, dass eine Kalibratorreproduzierbarkeit über einem VK von 20 % nur bei 1 von 79 (1,3 %) Assays vorlag, woraufhin der VK neu berechnet wurde. Nach der Neuberechnung blieb der prozentuale VK unter 15 %, d. h. alle Assays waren gültig.

**Tabelle 23.** Leistung der Positiv- und Negativkalibratoren - Gesamtdaten aus der klinischen Multicenterstudie und der Genauigkeitsstudie (n = 79 Assays)

Gerät	Anzahl Assays	Mittelwert S/N-Quotient	Kalibratortyp	Durchschnitt der errechneten Mittelwerte (RLU)		Mittelwert des errechneten VK (%) Um	
				Drei Replikate	Um Ausreißer bereinigt	Drei Replikate	Ausreißer bereinigt
DML 2000	9	7,71	Negativ	40,300	34,470	18,960	12,240
MLX*	70	4,52	Positiv	292,370	292,370	6,670	6,670
			Negativ	0,076	0,070	13,830	12,360
			Positiv	0,292	0,292	5,674	5,674

\*Nicht mehr erhältlich.

## ÄQUIVALENZ ZWISCHEN PROBEN IN STM- UND PRESERVCYT-LÖSUNG

Die Äquivalenz zwischen Proben in STM- und PreservCyt-Lösung wurde in einer klinischen Bewertung von 1252 gepaarten Zervixproben untersucht. Eine PreservCyt-Probe wurde entsprechend der Gebrauchsanweisung des *digene* HC2-Probenkonversionskits vorbereitet und zusammen mit einer gepaarten STM-Probe im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID getestet. Die Ergebnisse dieser Bewertung sind in Tabelle 24 dargestellt. Die klinische Leistungsfähigkeit wurde anhand von Proben in PreservCyt-Lösung mit einem Restvolumen von mehr als 6,5 ml ermittelt. Tests an Proben mit einem Restvolumen zwischen 4,0 und 6,5 ml sind vom jeweiligen Labor zu validieren.

**Tabelle 24.** Zusammenfassung der statistischen Daten zur Übereinstimmung im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID von gepaarten Zervixproben in STM und PreservCyt-Lösung.

Patientengruppe	Kappa 95%-KI	Positive Übereinstimmung (n/N) 95%-KI	Negative Übereinstimmung (n/N) 95%-KI	Gesamt-Übereinstimmung (n/N) 95%-KI
Daten aus Ambivalenzbereich ausgeschlossen	0,96 0,92; 0,99	98,00 (49/50) 89,35; 99,95	99,75 (1181/1184) 99,26; 99,95	99,68 (1230/1234) 99,17; 99,91
Nachtest-Algorithmus für Daten aus Ambivalenzbereich*	0,93 0,88; 0,98	91,80 (56/61) 81,90; 97,28	99,75 (1188/1191) 99,27; 99,95	99,36 (1244/1252) 98,74; 99,72

\*Proben in einem RLU/CO-Bereich von 1,0 bis 2,5 wurden zweimal nachgetestet. Die Probenklassifizierung erfolgte nach der „2 von 3“-Regel.

Die Reproduzierbarkeit des DNA-Tests *digene* HC2 GC-ID wurde als Teil einer klinischen Studie abgeschätzt, um zu zeigen, dass übereinstimmende Ergebnisse im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID erzielt werden, wenn ein Panel mit 20 Proben in PreservCyt-Lösung über drei Tage in drei Labors getestet wird. Die Ergebnisse dieser Reproduzierbarkeitsstudie sind in der folgenden Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25.** Prozentuale Übereinstimmung im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID pro Labor.

<b>Testlabor</b>	<b>Ermittelt/ erwartet *</b>	<b>% Übereinstimmung (95%-KI)</b>
<b>1</b>	60/60	100 (94,04; 100)
<b>2</b>	60/60	100 (94,04; 100)
<b>3</b>	59/60	98,33 (91,06; 99,96)
<b>Testlabors insgesamt</b>	179/180	99,44 (96,94; 99,99)

\*20 Teile x 3 Tage x 3 Testlabors.

## LITERATUR

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

## ANLEITUNG ZUR FEHLERSUCHE

DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		
BEOBACHTUNG	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
<b>Falscher oder kein Farbumschlag während der Denaturierung.</b>	Kein Denaturierungsreagenz hinzugefügt oder Denaturierungsreagenz nicht sachgemäß angesetzt.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verifizieren, dass das Denaturierungsreagenz den Indikator-Farbstoff enthält und eine dunkel purpurrote Farbe aufweist.</li> <li>2. Durch Messen des Probenvolumens verifizieren, dass das Denaturierungsreagenz der Probe zugefügt wurde (erwartet werden 1,5 ml). Wenn anhand des Volumens ersichtlich ist, dass das Denaturierungsreagenz nicht zugefügt wurde, den entsprechenden Zusatz vornehmen, mischen und mit dem Assay fortfahren, wenn der richtige Farbumschlag beobachtet wurde.</li> </ol>
	Blut in den Proben kann den Farbumschlag verdecken.	Mit dieser Art von Proben wird der beschriebene genaue Farbumschlag nicht erwartet; die Testergebnisse sollten jedoch nicht nachteilig beeinflusst werden.
	Der pH-Wert der Probe kann ungewöhnlich sauer sein.	Die Probe kann einen ungewöhnlich sauren pH-Wert haben, weshalb es nicht zum erwarteten Farbumschlag kommt. Eine neue Probe <u>vor</u> Applikation von Essigsäure auf die Zervix entnehmen, da sich ein falscher pH-Wert der Proben nachteilig auf die Testergebnisse auswirkt.
<b>Qualitätskontrolle ergibt falsche Ergebnisse</b>	Falsches Software-Protokoll für den Test gewählt.	Falls das falsche Software-Protokoll für den Test gewählt wurde, sollte die Platte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Nachweisreagenz 2 noch einmal mit dem richtigen Protokoll gelesen werden.
	Umgekehrte Platzierung von QC CT und QC GC.	Proben erneut testen.
<b>Beobachtung eines falschen Farbumschlags während der Hybridisierung.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unzureichendes Mischen des Sondengemisches mit denaturiertem Kalibrator, Qualitätskontrollen und/oder Proben.</li> <li>• Es wurde kein Sondengemisch zugegeben.</li> <li>• Es wurde ein falsches Reagenzvolumen zugegeben.</li> </ul>	Hybridisierungsplatte für weitere 2 Minuten schütteln. Wenn Vertiefungen vorhanden sind, die weiterhin purpurrot oder grau bleiben, sollten zusätzliche 25 µl des entsprechenden Sondengemischs zugefügt und gut gemischt werden. Wenn nach der Sondenzugabe und erneutem Mischen die vorschriftsmäßige Farbänderung nicht auftritt und die Probe kein Blut oder andere Materialien enthielt, die Probe erneut testen.
	Blut in den Proben kann den Farbumschlag verdecken.	Mit dieser Art von Proben wird der beschriebene genaue Farbumschlag nicht erwartet; die Testergebnisse sollten jedoch nicht nachteilig beeinflusst werden.
	Probe enthält < 1000 µl <i>digene</i> Specimen Transport Medium (STM).	Das Volumen der Originalprobe prüfen. Das Volumen sollte 1425 µl ± 20 µl betragen (nach Entnahme von 75 µl). Wenn das Volumen < 1405 µl beträgt, enthielt die Originalprobe < 1000 µl STM. Eine neue Probe entnehmen.
<b>Assay erfüllt nicht die Verifizierungskriterien für die Assay-Kalibrierung. In Positivkalibrator, Qualitätskontrollen oder Proben kein Signal beobachtet.</b>	Dem Sondenverdünnungsmittel wurde keine Sonde zugefügt.	Das GC-Sondengemisch wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben vorbereiten. Gründlich mischen. Röhrchen richtig beschriften. Assay mit frischem Sondengemisch wiederholen.
	Kontamination der Sonde mit RNase während der Vorbereitung.	Beim Pipettieren der Sonde aerosoldichte Pipettenspitzen verwenden und Handschuhe tragen. Sonde in einem sterilen Behälter verdünnen. Ausschließlich frische, saubere Einwegbehälter für die Reagenzien verwenden.
	Unzureichendes Mischen von Sonde und Sondenverdünnungsmittel.	Nachdem die Sonde dem Sondenverdünnungsmittel zugefügt wurde, 5 Sekunden durch Vortexen bei hoher Geschwindigkeit sehr gründlich mischen. Es muss ein sichtbarer Wirbel entstehen.
	Unzureichendes Mischen von verdünnter Sonde und denaturierter Probe.	Nach Zugabe des Sondengemischs zu den denaturierten Proben die Hybridisierungsmikrotiterplatte abdecken und auf dem auf 1100 ± 100 U/min eingestellten Rotationsschüttler 13 ± 2 Minuten lang schütteln, wie unter Testverfahren, Abschnitt „Hybridisierung“, Schritt 6 in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben. Es sollte in jeder Vertiefung ein Farbumschlag von purpurrot nach gelb auftreten.

DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		
BEOBACHTUNG	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
	Falsche Dauer oder Temperatur des Hybridisierungsschrittes.	Wie in Schritt 7 des Abschnitts „Hybridisierung“ unter „Testverfahren“ in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben ist, muss die Hybridisierung 60 ± 5 Minuten lang bei 65 ± 2 °C erfolgen. Überprüfen Sie die Temperatur des Mikrotiterplatteninkubators I. Der Inkubator wird vor dem Gebrauch 1 Stunde lang vorgewärmt und muss so eingestellt sein, dass die Proben auf die richtige Temperatur erwärmt werden.
	Unzureichendes Mischen während des Capture-Schrittes.	Wie in Schritt 7 des Abschnitts „Hybridisierung“ unter „Testverfahren“ in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben ist, muss die Platte auf dem Rotationsschüttler I bei 1100 ±100 U/min für 60 ± 5 Minuten bei 20 – 25 °C geschüttelt werden. Die Geschwindigkeit des Rotationsschüttlers I durch Kalibration wie in der Bedienungsanweisung für den Rotationsschüttler I im Abschnitt über die Kalibration der Schüttlergeschwindigkeit angegeben, überprüfen.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es wurde die falsche Menge an Nachweisreagenz 1 zugegeben.</li> <li>• Die Inkubationsdauer ist inkorrekt.</li> </ul>	75 µl Nachweisreagenz 1 mit einem 8-Kanal-Dispenser in jede Vertiefung pipettieren. 30 - 45 Minuten lang bei 20 – 25 °C inkubieren.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es wurde die falsche Menge an Nachweisreagenz 2 zugegeben.</li> <li>• Die Inkubationsdauer ist inkorrekt.</li> </ul>	75 µl Nachweisreagenz 2 mit einem 8-Kanal-Dispenser in jede Vertiefung pipettieren. 15 bis 30 Minuten lang bei 20 – 25 °C inkubieren.
	Funktionsstörung oder falsche Programmierung des Luminometers.	Weitere Anweisungen hierzu finden Sie in den Abschnitten zu Wartung und Fehleranalyse im Benutzerhandbuch der entsprechenden <i>digene</i> Testanalyse-Software. Alternativ können Sie auch den Technischen Service von QIAGEN anrufen.
<b>Erhöhte RLU-Werte in den Kalibratoren, Qualitätskontrollen und/oder in den Proben (≥ 150 RLU in vielen oder allen Vertiefungen). Der Assay entspricht möglicherweise nicht den Validierungskriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es wurde kein Denaturierungsreagenz zugefügt; oder es wurde das falsche Reagenzvolumen zugefügt; oder das Denaturierungsreagenz wurde unzureichend mit den Proben, Kalibratoren oder Qualitätskontrollen gemischt.</li> <li>• Wasserbad hat falsche Temperatur und unzureichenden Füllstand.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergewissern Sie sich vor dem Zufügen des Denaturierungsreagenzes, dass der Direktverdrängungssystem-Dispenser genaue Mengen abgibt. Kalibrierte Dispenser sind unerlässlich. Jedem Röhrchen die Hälfte des Denaturierungsreagenzvolumens zufügen und gut mischen. Zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen muss sichergestellt sein, dass die Flüssigkeit alle Innenwände des Röhrchens bespült (das Röhrchen beim Mischen von Hand 1 x auf den Kopf stellen). Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben sollten nach Zufügen des Denaturierungsreagenzes nach purpurrot umschlagen. Die Kalibrierung der Geschwindigkeit des Multi-Specimen Tube Vortexer 2 überprüfen.</li> <li>• Füllstand und Temperatur des Wasserbads überprüfen.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lichtleck im Luminometer.</li> <li>• Abdichtung undicht.</li> <li>• Tür nicht verschlossen.</li> </ul>	Hintergrundmesswerte des Luminometers durch Messen einer leeren Mikrotiterplatte überprüfen. Höhere Werte als 50 RLUs deuten darauf hin, dass eine undichte Stelle vorliegen könnte. Für weitere Informationen beachten Sie bitte die Abschnitte zu Wartung und Fehleranalyse im Benutzerhandbuch der entsprechenden <i>digene</i> Testanalyse-Software. Alternativ können Sie auch den Technischen Service von QIAGEN anrufen.
	Kontamination des Nachweisreagenz 2 oder der Capture-Mikrovertiefungen durch Nachweisreagenz 1 oder exogene alkalische Phosphatase.	Siehe Kontaminationstest in diesem Leitfaden zur Fehlersuche
	Kontaminierter Waschpuffer.	Siehe Kontaminationstest in diesem Leitfaden zur Fehlersuche
	Kontaminierter automatischer Plattenspüler I.	Siehe Kontaminationstest in diesem Leitfaden zur Fehlersuche
	Unzureichendes Spülen der Capture-Mikrovertiefungen nach der Inkubation mit dem Nachweisreagenz 1.	Die Mikrovertiefungen 6 mal gründlich mit Waschpuffer spülen, indem die Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder der automatische Plattenspüler verwendet wird. In den Vertiefungen sollte nach dem Spülen keine rosa Farbe mehr sichtbar sein. Anleitungen zum Testen auf Kontamination oder Funktionsstörungen bitte der Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler zu entnehmen.
	Kontamination der Mikrovertiefungen mit Nachweisreagenz 1.	Sicherstellen, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Bei der Verwendung des Nachweisreagenz 1 vorsichtig vorgehen. Verspritzen vermeiden.

DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		
BEOBACHTUNG	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
	Abtropfen der Hybridisierungslösung auf der gleichen Stelle der Kimtowels-Wischtücher oder entsprechenden fusselfarmen Papiertüchern Verwendung falscher Saugtücher.	Das Abtropfen der Hybridisierungslösung darf nicht auf der gleichen Stelle der Papiertücher erfolgen.  Zum Abtupfen Kimtowels-Wischtücher oder geeignete fusselfarme Papiertücher verwenden.
	GC-Qualitätskontrollmaterial als Positivkalibrator benutzt. Assayvalidierung erfolglos.	Überprüfen, ob die Kalibratoren und Qualitätskontrollen richtig platziert sind.
<b>Geringe PC/NC-Quotienten oder hohe Anzahl schwach positiver Proben (&gt;20% der Gesamtproben) mit einem RLU/CO-Quotienten von &lt;2,0. Der Assay entspricht nicht den Validierungskriterien.</b>	Unzureichende Probenvorbereitung.	Das entsprechende Volumen des Denaturierungsreagenzes zufügen und mittels Vortexen gründlich mischen. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse sicherstellen, dass die Flüssigkeit alle Innenwände des Röhrchens bespült, indem mindestens 5 Sekunden lang nach dem Verfahren mit dem Multi-Specimen Tube Vortexer 2 gemischt wird ( bei der manuellen Methode sollte mindestens 5 Sekunden lang gevortext und das Röhrchen danach einmal umgedreht werden). Es sollte ein eindeutiger Farbumschlag von klar nach purpurrot auftreten. 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. Besonders bei der Verwendung von Proben in PreservCyt-Lösung ist das Vorkommen dieser Hybride an den Innenwänden des Probenkonversionsröhrchens wahrscheinlich. Um eine eventuelle verschleppte Kontamination durch dieses nicht-denaturierte Zellmaterial zu vermeiden, darf die Pipettenspitze während des Transfers der denaturierten Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur GC-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren. Die Einzelheiten des Verfahrens bitte der Gebrauchsanweisung des <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit entnehmen.
	Unzureichendes Mischen der Sonde, oder den Assays wurde eine ungenügende Sondenmenge zugefügt.	Die Sondenmischungen wie beschrieben vorbereiten. Durch Vortexen gründlich mischen und darauf achten, dass ein sichtbarer Wirbel produziert wird. Das Sondenmisch muss den Vertiefungen mit einer Multikanalpipette oder mit einem Direktverdrängungssystem-Dispenser hinzugefügt werden, um eine genaue Zugabe zu gewährleisten.
	Den Vertiefungen der Hybridisierungsmikrotiterplatte wurde ein unzureichendes Volumen des Sondenmischs zugegeben.	Vor Zufügen des Sondenmischs zu den Vertiefungen der Hybridisierungsmikrotiterplatte sicherstellen, dass der 8-Kanal-Dispenser die genaue Menge abgibt. Auf den Boden jeder Mikrovertiefung mit denaturierten Proben 25 µl Sondenmisch geben. Vor Zufügen des Sondenmischs zu den Vertiefungen der Hybridisierungsmikrotiterplatte sicherstellen, dass der 8-Kanal-Dispenser die genaue Menge abgibt. Nach dem Zufügen und gründlichen Mischen des Sondenmischs sollte ein Farbumschlag von dunkel purpurrot nach gelb auftreten.
	Verlust der Aktivität des Nachweisreagenz 1.	Nachweisreagenz 1 bei 2 – 8 °C aufbewahren. Vor dem außen am Behälter des Kits angegebenen Verfallsdatum verwenden.
	Capture der RNA/ DNA-Hybride unzureichend.	Der Capture-Schritt sollte unter Verwendung des auf 1100 ± 100 U/min eingestellten Rotationsschüttlers I durchgeführt werden. Die Geschwindigkeit des Rotationsschüttlers I durch Kalibration wie in der Bedienungsanweisung für den Rotationsschüttler I im Abschnitt über die Kalibration der Schüttlergeschwindigkeit angegeben, überprüfen.
	Unzureichendes Spülen.	Die Mikrovertiefungen sechsmal gründlich mit Waschpuffer spülen, die Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen füllen oder den automatischen Plattenspüler verwenden.
	Kontaminierter Waschpuffer.	Siehe Kontaminationstest in diesem Leitfaden zur Fehlersuche
<b>Reihe positiver Proben mit annähernd den gleichen RLU-Werten</b>	Kontamination von Capture-Mikrovertiefungen während der Assay-Durchführung.	Die Capture-Mikrovertiefungen während aller Inkubationen abdecken. Während der Durchführung des Assays müssen die Mikrovertiefungen vor einer Kontamination mit Spritzern geschützt werden. Während der Durchführung ungepuderte Handschuhe tragen.
	Kontamination des Nachweisreagenz 2.	Darauf achten, dass die Lösung beim Pipettieren des Nachweisreagenz 2 in die Capture-Mikrovertiefungen nicht kontaminiert wird. Unbedingt eine Kontamination des Nachweisreagenz 2 durch Spritzer aus dem Nachweisreagenz 1 oder aus dem Laborstaub usw. vermeiden.

DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		
BEOBSACHTUNG	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
	Funktionsstörung des automatischen Plattenspülers.	Siehe unter „Kontaminationstest“ in diesem Leitfaden zur Fehlersuche oder in den Anleitungen zum Testen auf Kontamination oder zur Identifizierung von Funktionsstörungen in der Bedienungsanweisung für den automatischen Plattenspüler.
<b>Breiter Wertebereich des VK (%) zwischen den Wiederholungsbestimmungen.</b>	Ungenau pipettieren (d. h. Luftbläschen, Pipette ist nicht kalibriert).	Am Dispenser überprüfen, ob gleichbleibende Volumina abgegeben werden. Die Dispenser regelmäßig kalibrieren.
	Unzureichendes Mischen.	Bei allen Schritten gründlich mischen. Vor und nach der Denaturierungsinubation vortexen. Darauf achten, dass sich ein sichtbarer Wirbel bildet.
	Unvollständige Überführung von Flüssigkeit aus der Hybridisierungsmikrotiterplatte in die Capture-Mikrovertiefungen.	Während des Überführungsschrittes aus den Hybridisierungsmikrovertiefungen darauf achten, dass gleichbleibende Volumina überführt werden.
	Ungeeignete Bedingungen beim Spülen der Platten.	Die Mikrovertiefungen mit Waschpuffer 6 mal gründlich spülen, indem die Mikrovertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder der automatische Plattenspüler verwendet und die dafür vorgesehenen vorschriftsmäßigen Protokolle befolgt werden.
	Kontamination der Mikrovertiefungen mit Nachweisreagenz 1.	Sicherstellen, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Bei der Verwendung des Nachweisreagenz 1 vorsichtig vorgehen. Verspritzen vermeiden.
	Kontamination der Pipettenspitze mit nicht-denaturiertem Material während des Transfers der denaturierten Probe in die Vertiefung der Mikrotiterplatte, die zur GC-Sondenhybridisierung benutzt wird.	Der Denaturierungsschritt im Verfahren zur Probenbehandlung muss wie in dieser Anleitung beschrieben durchgeführt werden. Unsachgemäßes Vortexen der Proben oder unsachgemäßes Umdrehen und Schütteln der Röhrchen kann zur unvollständigen Denaturierung unspezifischer RNA/DNA-Hybride in den Zervixproben führen. Besonders bei der Verwendung von PreservCyt-Lösung-Proben ist das Vorkommen dieser Hybride an den Innenwänden des Probenkonversionsröhrchens wahrscheinlich. Um eine eventuelle verschleppte Kontamination durch dieses nicht-denaturierte Zellmaterial zu vermeiden, darf die Pipettenspitze während des Transfers der denaturierten Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur CT-/GC-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren.
	Abtupfen auf derselben Stelle des Wischtuches über mehrere Reihen.	Nicht erneut auf zuvor verwendeten Bereichen der Wischtücher abtupfen.
<b>Falsch positive Ergebnisse aus bekannterweise negativen Proben.</b>	Kontamination von Nachweisreagenz 2.	Zur Verhinderung einer Kreuzkontamination der Proben beim Zugeben von Nachweisreagenz 2 zu den einzelnen Proben mit Vorsicht vorgehen. Wird nur ein Teil des Kits verwendet, ist das für diesen Assay benötigte Volumen vor Befüllen des Dispensers in einen sauberen Einweg-Reagenzbehälter zu aliquotieren.
	Kontamination von Mikrotiterplattenvertiefungen mit Nachweisreagenz 1.	Die Mikrovertiefungen sechsmal gründlich mit Waschpuffer spülen, indem die Vertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder der automatische Plattenspüler verwendet wird. In den Vertiefungen sollte nach dem Spülen keine rosa Farbe mehr sichtbar sein.
	Kontamination der Pipettenspitze mit nicht-denaturiertem Material während des Transfers der denaturierten Probe in die Vertiefung der Mikrotiterplatte, die zur GC-Sondenhybridisierung benutzt wird.	Der Denaturierungsschritt im Verfahren zur Probenbehandlung muss wie in dieser Anleitung beschrieben durchgeführt werden. Unsachgemäßes Vortexen der Proben oder unsachgemäßes Umdrehen und Schütteln der Röhrchen kann zur unvollständigen Denaturierung unspezifischer RNA/DNA-Hybride in den Zervixproben führen. Besonders bei der Verwendung von PreservCyt-Lösung-Proben ist das Vorkommen dieser Hybride an den Innenwänden des Probenkonversionsröhrchens wahrscheinlich. Um eine eventuelle verschleppte Kontamination durch dieses nicht-denaturierte Zellmaterial zu vermeiden, darf die Pipettenspitze während des Transfers der denaturierten Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur CT-/GC-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren.

DNA-Test <i>digene</i> HC2 GC-ID		
BEOBACHTUNG	MÖGLICHE URSACHEN	LÖSUNG
	Unzureichende Probenvorbereitung.	Das entsprechende Volumen des Denaturierungsreagenzes zufügen und mittels Vortexen gründlich mischen. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse sicherstellen, dass die Flüssigkeit alle Innenwände des Röhrchens bespült, indem mindestens 5 Sekunden lang nach dem Vortexer I-Verfahren für Multi-Specimen Tube gemischt wird ( bei der manuellen Methode sollte mindestens 5 Sekunden lang gevortext und das Röhrchen danach einmal umgedreht werden). Es sollte ein eindeutiger Farbumschlag von klar nach purpurrot auftreten. 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2° C inkubieren. Besonders bei der Verwendung von PreservCyt-Lösung-Proben ist das Vorkommen dieser Hybride an den Innenwänden des Probenkonversionsröhrchens wahrscheinlich. Um eine eventuelle verschleppte Kontamination durch dieses nicht-denaturierte Zellmaterial zu vermeiden, darf die Pipettenspitze während des Transfers der denaturierten Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte zur CT-/GC-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren. Die Einzelheiten des Verfahrens bitte der Gebrauchsanweisung des <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit entnehmen.
	Ungeeignete Bedingungen beim Spülen der Platten.	Die Mikrovertiefungen mit Waschpuffer 6 mal gründlich spülen, indem die Mikrovertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder der automatische Plattenspüler verwendet und die dafür vorgesehenen vorschriftsmäßigen Protokolle befolgt werden.
<b>Erhöhte RLU-Werte des Negativkalibrators (&gt; 150 RLU). Die Leistung des übrigen Assays ist wie erwartet.</b>	Das Nachweisreagenz 2 wurde bei einer höheren Temperatur als 20 - 25 °C inkubiert.	Test ist wegen hoher-Negativkalibratorwerte ungültig. Den Test wiederholen, und darauf achten, dass die Capture- und Nachweisschritte bei 20 – 25 °C inkubiert werden.
	Das Nachweisreagenz 2 wurde länger als 30 Minuten inkubiert.	Die Platten nach mindestens 15 (und nicht mehr als 30) Minuten Inkubation bei 20 - 25°C ablesen.
	Das Nachweisreagenz 2 oder der Waschpuffer ist mit alkalischer Phosphatase oder Nachweisreagenz 1 kontaminiert.	Siehe Kontaminationstest in diesem Leitfaden zur Fehlersuche

## KONTAMINATIONSTEST

Getestetes Reagenz	Kontaminationstest-Verfahren	Interpretation der Ergebnisse
<p><i>Hinweis:</i> Beim Pipettieren von Nachweisreagenz 2 vorsichtig vorgehen, um Kontaminationen zu vermeiden. Handschuhe tragen und Berührungen der Arbeitsoberfläche mit den Pipettenspitzen vermeiden.</p>		
<p><b>Nachweisreagenz 2</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 75 µl von Nachweisreagenz 2 aus dem angebrochenen oder dem Originalfläschchen in eine leere Vertiefung einer Capture-Mikrotiterplatte geben.</li> <li>• 15 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.</li> <li>• Die Mikrotiterplatte in das Luminometer einlesen.</li> </ul> <p><b>Hinweis:</b> Der Test von Nachweisreagenz 2 in Replikaten von 3 erlaubt eine optimale Leistungsüberprüfung.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der Kontrollwert des Nachweisreagenz 2 sollte &lt; 50 RLU betragen.</li> <li>• Wenn die Werte des Nachweisreagenz 2 unter 50 RLU liegen, kann das Nachweisreagenz 2 benutzt werden, um den Test zu wiederholen.</li> <li>• Falls eine Kontamination vorliegt (&gt; 50 RLU), einen neuen Kit benutzen und den Test wiederholen.</li> </ul>
<p><b>Waschsystem und/oder Wasseranschluss</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 75 µl von Nachweisreagenz 2 in 4 leere Vertiefungen einer Capture-Mikrotiterplatte geben.</li> <li>• Die Vertiefungen mit 1 - 4 bezeichnen.</li> <li>• Vertiefung 1 dient als Kontrolle für das Nachweisreagenz 2. Aus dem Behälter für Waschflüssigkeit 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 2 geben.</li> <li>• Waschpuffer durch die Schläuche der Wascheinrichtung laufen lassen.</li> <li>• Aus den Schläuchen 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 3 pipettieren.</li> <li>• Etwas von dem Wasser nehmen, das zur Herstellung des Waschpuffers benutzt wird.</li> <li>• Von dem Wasser 10 µl in Vertiefung 4 pipettieren.</li> <li>• 15 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.</li> <li>• Die Mikrotiterplatte in das Luminometer einlesen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) sollte unter 50 RLU liegen.</li> <li>• Die RLU-Werte der Vertiefungen 2, 3 und 4 mit dem Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) vergleichen. Die RLU Werte der Vertiefungen 2, 3 und 4 sollten den RLU Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) um nicht mehr als 50 RLU überschreiten.</li> <li>• Werte, die mehr als 50 RLU über dem Wert der Kontrolle für das Nachweisreagenz 2 liegen, sind ein Zeichen für eine Kontamination. Hinweise zur Reinigung und Pflege des Plattenspülers finden sich im Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.</li> </ul>
<p><b>Automatischer Plattenspüler</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 75 µl des Nachweisreagenz 2 in 5 leere Vertiefungen einer Capture-Mikrotiterplatte geben.</li> <li>• Die Vertiefungen mit 1 - 5 bezeichnen.</li> <li>• Vertiefung 1 dient als Kontrolle für das Nachweisreagenz 2.</li> <li>• Aus dem mit <i>Wash</i> bezeichneten Behälter des Plattenspülers 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 2 geben.</li> <li>• Aus dem mit <i>Rinse</i> bezeichneten Behälter des Plattenspülers 10 µl Spülflüssigkeit in Vertiefung 3 geben.</li> <li>• Den Schalter „Prime“ auf der Tastatur des Plattenspülers betätigen, damit Waschpuffer durch die Leitungen fließen kann.</li> <li>• Aus dem Behälter 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 4 pipettieren.</li> <li>• Den Schalter „Rinse“ auf der Tastatur des Plattenspülers betätigen, damit Spülflüssigkeit durch die Leitungen fließen kann.</li> <li>• Aus dem Behälter 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 5 pipettieren.</li> <li>• Abdecken und 15 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden.</li> <li>• Die Mikrotiterplatte in das Luminometer einlesen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) sollte unter 50 RLU liegen.</li> <li>• Die RLU Werte der Vertiefungen 2, 3, 4 und 5 mit dem Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) vergleichen. Die RLU Werte der Vertiefungen 2, 3, 4 und 5 sollten den RLU Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) um nicht mehr als 50 RLU überschreiten.</li> <li>• Werte, die mehr als 50 RLU über dem Wert der Kontrolle für das Nachweisreagenz 2 liegen sind ein Zeichen für eine Kontamination des Plattenspülers.</li> <li>• Siehe Bedienungsanleitung des automatischen Plattenspülers, Kapitel „Dekontamination“.</li> </ul>

## QIAGEN -KONTAKTINFORMATIONEN

Kontaktanschriften Ihrer örtlichen QIAGEN -Niederlassung entnehmen Sie bitte dem beigelegten Informationsblatt.

QIAGEN<sup>®</sup>, *digene*<sup>®</sup>, Hybrid Capture<sup>®</sup> und Rapid Capture<sup>®</sup> sind eingetragene Handelsmarken von QIAGEN.

Die Hybrid Capture-Technologie ist durch das Europäische Patent Nr. 0 667 918, eingetragen in Belgien, der Schweiz, Liechtenstein, Deutschland, Dänemark, Spanien, Frankreich, Großbritannien, Griechenland, Irland, Italien, Luxemburg, den Niederlanden, Österreich und Schweden, geschützt.

US-Patentnummer für Hybrid Capture: 6,228,578B1.

Im Text verwendete Handelsmarken und deren Eigentümer:

ThinPrep<sup>®</sup> und PreservCyt<sup>®</sup>: Hologic Corporation

Kimtowels<sup>®</sup>: Kimberly-Clark Corporation

Eppendorf<sup>®</sup> und Repeater<sup>®</sup>: Eppendorf-Netheler-Hinz

CDP-Star<sup>®</sup>: Tropix, Inc.

Parafilm<sup>®</sup>: American Can Co.

DuraSeal<sup>®</sup>: Diversified Biotech, Inc

Sarstedt<sup>®</sup>: SARSTEDT AG & Co.

pGEM<sup>®</sup>: Promega Corporation

VWR<sup>®</sup>: VWR International, Inc.

Corning<sup>®</sup>: Corning, Inc

## ZUSAMMENFASSUNG DES DNA-TESTS *digene* HC2 GC-ID

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

VERFAHREN					
<b>Denaturierung</b> (Die Behandlung von Proben in PreservCyt-Lösung wird im Abschnitt „Verfahren zur Vorbereitung von Proben in PreservCyt-Lösung“ beschrieben)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Manuelles Vortex-Verfahren</th> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Verfahren mit Multi Specimen Tube Vortexer 2</th> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                             Plattenanordnung erstellen                              Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften.                              Denaturierungsreagenz vorbereiten.                              ↓                              Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren.                              Jede Probe und Qualitätskontrolle 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit einzeln vortexen (nähere Einzelheiten siehe diese Gebrauchsanweisung).                              ↓                              Überprüfen, ob alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen.                              ↓                              45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren.                              ↓                              Das GC-Sondengemisch vorbereiten.                              ↓                              ↓                              ↓                              ↓                         </td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                             Plattenanordnung erstellen                              Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften.                              Denaturierungsreagenz vorbereiten.                              ↓                              Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren.                              Überprüfen, ob alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen.                              ↓                              Das Gestell mit Folie und Verschlussdeckel abdecken.                              ↓                              10 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit vortexen.                              ↓                              45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren.                              ↓                              Das GC-Sondengemisch vorbereiten.                              ↓                         </td> </tr> </table>	Manuelles Vortex-Verfahren	Verfahren mit Multi Specimen Tube Vortexer 2	Plattenanordnung erstellen Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften. Denaturierungsreagenz vorbereiten. ↓ Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren. Jede Probe und Qualitätskontrolle 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit einzeln vortexen (nähere Einzelheiten siehe diese Gebrauchsanweisung). ↓ Überprüfen, ob alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen. ↓ 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Das GC-Sondengemisch vorbereiten. ↓ ↓ ↓ ↓	Plattenanordnung erstellen Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften. Denaturierungsreagenz vorbereiten. ↓ Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren. Überprüfen, ob alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen. ↓ Das Gestell mit Folie und Verschlussdeckel abdecken. ↓ 10 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit vortexen. ↓ 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Das GC-Sondengemisch vorbereiten. ↓
Manuelles Vortex-Verfahren	Verfahren mit Multi Specimen Tube Vortexer 2				
Plattenanordnung erstellen Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften. Denaturierungsreagenz vorbereiten. ↓ Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren. Jede Probe und Qualitätskontrolle 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit einzeln vortexen (nähere Einzelheiten siehe diese Gebrauchsanweisung). ↓ Überprüfen, ob alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen. ↓ 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Das GC-Sondengemisch vorbereiten. ↓ ↓ ↓ ↓	Plattenanordnung erstellen Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften. Denaturierungsreagenz vorbereiten. ↓ Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren. Überprüfen, ob alle Röhrchen eine purpurrote Farbe aufweisen. ↓ Das Gestell mit Folie und Verschlussdeckel abdecken. ↓ 10 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit vortexen. ↓ 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Das GC-Sondengemisch vorbereiten. ↓				
<b>Hybridisierung</b>	Denaturierte Proben gut mischen, anschließend 75 µl des denaturierten Kalibrators bzw. der Qualitätskontrollen oder Proben in die entsprechenden Mikrotiterplatten-Vertiefungen geben. ↓ Mikrotiterplatte 10 ± 2 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren. ↓ 25µl GC-Sondengemisch in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettieren. ↓ Die Mikrotiterplatte mit einem Plattendeckel abdecken und auf einem Rotationsschüttler 13 ± 2 Minuten bei 1100 ± 100 U/min schütteln. Überprüfen, ob alle Vertiefungen eine gelbe Farbe aufweisen. (Proben in PreservCyt-Lösung werden rosa.) ↓ 60 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Die Capture-Mikrotiterplatte vorbereiten. ↓				
<b>Hybrid-Capture</b>	Inhalt aus jeder Vertiefung der Hybridisierungsplatte (Mikrotiterplatte zur Hybridisierung) mithilfe eines 8-Kanal-Dispensers in die entsprechende Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte überführen. ↓ Mit einem Deckel oder Folie abdecken. ↓ 60 ± 5 Minuten bei 20 – 25 °C bei 1100 ± 100 U/min schütteln. Waschpuffer vorbereiten. ↓ Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten siehe diese Gebrauchsanweisung). ↓				
<b>Hybridnachweis</b>	75 µl Nachweisreagenz 1 in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. Die Capture-Mikrotiterplatte mit einem Plattendeckel, Parafilm oder entsprechendem Material abdecken. 30 - 45 Minuten bei 20 – 25 °C inkubieren. Platte mit dem gewünschten Verfahren spülen. ↓				
<b>Spülen</b>	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Manuelles Spülverfahren</th> <th style="width: 50%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;">Verfahren mit dem automatischen Plattenspüler</th> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                             Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten siehe Packungsbeilage).                              ↓                              6 mal spülen.                              ↓                              Auf fusselfreien Papiertüchern abtupfen                              ↓                         </td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">                             Die Platte auf den Spüler geben und zum Beginnen „START/STOP“ drücken.                              ↓                              ↓                              ↓                              ↓                         </td> </tr> </table>	Manuelles Spülverfahren	Verfahren mit dem automatischen Plattenspüler	Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten siehe Packungsbeilage). ↓ 6 mal spülen. ↓ Auf fusselfreien Papiertüchern abtupfen ↓	Die Platte auf den Spüler geben und zum Beginnen „START/STOP“ drücken. ↓ ↓ ↓ ↓
Manuelles Spülverfahren	Verfahren mit dem automatischen Plattenspüler				
Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten siehe Packungsbeilage). ↓ 6 mal spülen. ↓ Auf fusselfreien Papiertüchern abtupfen ↓	Die Platte auf den Spüler geben und zum Beginnen „START/STOP“ drücken. ↓ ↓ ↓ ↓				
<b>Signalamplifikation</b>	75 µl Nachweisreagenz 2 in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. <b>Mit einem Plattendeckel abdecken. 15 - 30 Minuten bei 20 – 25 °C inkubieren.</b> ↓				
<b>Messen</b>	Die Capture-Mikrotiterplatte im von QIAGEN zugelassenen Luminometer messen. ↓ <b>Assay validieren und Probenergebnisse interpretieren.</b>				