

DNA-Test *digene*[®] HC2 CT-ID

Ein *In-Vitro*-Nukleinsäurehybridisierungsassay mit Signalamplifikation mithilfe von Mikrotiterplatten-Chemilumineszenz zum qualitativen DNA-Nachweis von *Chlamydia trachomatis* (CT) in Zervixproben.

Zur Verwendung mit:

digene[®] HC2 DNA Collection Device
digene[®] Female Swab Specimen Collection Kit
Hologic PreservCyt[®]-Lösung

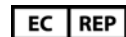
WICHTIGSTE VERÄNDERUNGEN SEIT DER LETZTEN ÜBERARBEITUNG DES BEIPACKZETTELS

1. Aktualisierter Markenname
2. Aktualisierte CE-Prüfstellennummer
3. Text und Daten zum Reflextest entfernt

Nur zum Laborgebrauch durch ausgebildetes 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

©2011 QIAGEN



REF 5135-1330

L2171DE Rev. 3



Durch das CE-Zeichen wird bestätigt, dass der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID den Anforderungen der Richtlinie 98/79/EG über *In-Vitro*-Diagnostika entspricht.

0197

INHALT

BEZEICHNUNG UND VERWENDUNGSZWECK	1
ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG	1
VERFAHRENSPRINZIP	2
MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	3
ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	4
WARN- UND SICHERHEITSHINWEISE	5
SICHERHEITSMASSNAHMEN	5
INFORMATIONEN ZU SICHERHEITS- UND ZU 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 <i>digene</i> STM	10
ZERVIXPROBEN IN HOLOGIC PRESERVCYT-LÖSUNG	11
TESTVERFAHREN	11
TESTS MIT GROSSEM PROBENDURCHSATZ MITTELS RAPID CAPTURE-SYSTEM	11
MANUELLES VERFAHREN	12
DENATURIERUNG	12
Verfahren zur vorbereitung von kalibratoren, qualitätskontrollen und stm-proben	13
Verfahren zur vorbereitung von proben in PreservCyt-lösung	14
Optionaler haltepunkt	18
HYBRIDISIERUNG	18
HYBRID-CAPTURE	19
HYBRIDNACHWEIS	20
SPÜLEN	20
SIGNALAMPLIFIKATION	22
VERIFIZIERUNGSKRITERIEN FÜR DIE ASSAY-KALIBRIERUNG	22
BERECHNUNG DER CUTOFF-WERTE	24
QUALITÄTSKONTROLLE	24
INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	25
VERFAHRENS-EINSCHRÄNKUNGEN	26
ERWARTETE ERGEBNISSE	27
PRÄVALENZ	27
POSITIVER UND NEGATIVER VORHERSAGEWERT	27
HÄUFIGKEITSVERTEILUNG: RLU/CO-ERGEBNISSE DES DNA-TESTS <i>digene</i> HC2 CT-ID	27
LEISTUNGSMERKMALE	28
KLINISCHE STUDIENERGEBNISSE FÜR DIE VERSCHIEDENEN PROBENTYPEN	28
REPRODUZIERBARKEIT	31
GENAUIGKEIT	33
Genauigkeit mit PreservCyt-proben	37
ANALYTISCHE SENSITIVITÄT	36
Zusätzliche überlegungen zu PreservCyt-proben	37
ANALYTISCHE SPEZIFITÄT	38
WIRKUNG VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF STM-PROBEN	40
WIRKUNG VON BLUT UND ANDEREN SUBSTANZEN AUF PROBEN IN PRESERVCYT-LÖSUNG	40
GENAUIGKEIT DES DNA-TESTS <i>digene</i> HC2 CT-ID AM CUTOFF MIT KLINISCHEN PROBEN IN STM	40
BISHERIGE VERFAHRENSWEISE	41
ÄQUIVALENZ ZWISCHEN PROBEN IN STM- UND PRESERVCYT-LÖSUNG	42
LITERATUR	43
LEITFADEN ZUR FEHLERSUCHE	45
KONTAMINATIONSTEST	50
QIAGEN-KONTAKTINFORMATIONEN	51
ZUSAMMENFASSUNG DNA-TEST <i>digene</i> HC2 CT-ID	52

BEZEICHNUNG UND VERWENDUNGSZWECK

Der DNA-Test *digene*[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) CT-ID ist ein *In-Vitro*-Nukleinsäurehybridisierungsassay mit Signalamplifikation mithilfe von Mikrotiterplatten-Chemilumineszenz zum qualitativen DNA-Nachweis von *Chlamydia trachomatis* (CT) in Zervixproben, die mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device [bestehend aus Zervixbürste und *digene* Specimen Transport Medium (STM)] sowie dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (Tupfer und STM) entnommen wurden. Gleichfalls eignen sich Proben, die mithilfe eines besenähnlichen Entnahmegeräts entnommen und in Hologic PreservCyt[®]-Lösung gegeben wurden. Der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID ist als Initialtest zur Identifikation symptombelasteter oder symptomfreier Patientinnen zum Nachweis von *Chlamydia trachomatis* ausgelegt.

Für Tests mit großem Probendurchsatz kann der *digene* HC2 CT-ID DNA-Test mithilfe des Rapid Capture[®]-Systems (RCS) durchgeführt werden.

Zur Verwendung in der *In-Vitro*-Diagnostik

IVD

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Chlamydien sind gramnegative Organismen mit einem zweiphasigen Lebenszyklus, der morphologisch unterschiedliche infektiöse und reproduktive Formen umfasst.¹ Das Genom von *Chlamydia trachomatis* ist mit ca. 1×10^6 Basenpaaren relativ klein.¹ Die infektiöse Form ist ein teilungsunfähiges Elementarkörperchen, das lediglich die Aufgabe erfüllt, die Infektion von Zelle zu Zelle zu transportieren. Sobald sich die Elementarkörperchen innerhalb einer Wirtszelle befinden, sammeln sie sich in membrangebundenen Vakuolen und produzieren dort stoffwechselaktive reproduktive Chlamydienformen bzw. Retikulärkörper. Die Vermehrung hängt vollständig von der ATP des Wirts ab³ und wird über Zweiteilung innerhalb der lichtbrechenden Zytoplasmainschlüsse realisiert, wobei eine neue Generation von Elementarkörperchen entsteht, die dann freigesetzt werden und andere Zellen infizieren. Chlamydien sind auch an einem membrangebundenen gattungsspezifischen Lipopolysaccharid zu erkennen, das als Antigenquelle für die Produktion diagnostischer Antikörper dient.

Konventionelle Methoden zum direkten Nachweis von *Chlamydia trachomatis* in klinischen Proben sind Jod- oder Giemsa-Färbung des Organismus mit anschließender mikroskopischer Auswertung⁴ bzw. der Einsatz einer sensitiveren Methode unter Verwendung fluoreszierender Antikörper.⁴ Diese Methoden erreichen jedoch nur eine Empfindlichkeit von 70 – 85 % im Vergleich zu optimalen Zellkulturtechniken.⁴ Das gebräuchlichste Verfahren zum Chlamydiennachweis ist die Infizierung von McCoy-Zellen in Kultur. Die fluoreszeinkonjugierten Antikörper werden dann zum Nachweis von intrazytoplasmatischer Einschlusskörperchen eingesetzt, die in den infizierten Zellen durch fortpflanzungsfähige Chlamydienelemente produziert werden.⁷ Die optimale Zellkultur ist ein Nachweis von höchster Empfindlichkeit und Spezifität beim Nachweis von Chlamydien, er ist jedoch auch ein sehr kompliziertes, teures und zeitaufwändiges Verfahren. Die Ergebnisse sind erst nach 48 - 72 Stunden nach der Inokulation verfügbar.⁸ Enzym-Immunoassays werden auch zum Nachweis von Chlamydienantigenen⁸ eingesetzt und scheinen etwas empfindlicher und etwas weniger spezifisch als direkte Fluoreszenz-Antikörper-Ansätze zu sein.⁸ Nukleinsäuretests werden auch für den Nachweis verschiedener Chlamydientargets, etwa der chromosomalen DNA oder der mRNA sowie des kryptischen Plasmids verwendet, die in nahezu allen Stämmen der *Chlamydia trachomatis* enthalten sind. Diese Methoden unterscheiden sich in Spezifität und Sensitivität, wobei die Spezifität im Allgemeinen den Kulturmethoden ähnelt und die Sensitivität die Leistung der Kulturmethoden noch übertreffen kann.¹⁰⁻¹²

VERFAHRENSPRINZIP

Der *digene* HC2 CT-ID DNA-Test unter Verwendung der *digene* Hybrid Capture 2-Technologie ist ein Nukleinsäurehybridisierungsassay mit Signalamplifikation auf der Grundlage eines Chemilumineszenz-Nachweises auf Mikrotiterplatten. Die Ziel-DNA enthaltenden Proben hybridisieren mit einer spezifischen Chlamydien-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 Chlamydien-DNA in der Probe hin. Eine RLU-Messung, die unter einem bestimmten Verhältnis zum positiven Cutoff-Wert liegt, weist auf das Nichtvorhandensein von Chlamydien-DNA hin bzw. darauf, dass die Menge der Chlamydien-DNA unter der Nachweisgrenze des Assays liegt.

Die CT-Sonde enthält ein Sondengemisch, das so zusammengestellt wurde, dass die Kreuzreaktivität mit DNA-Sequenzen aus menschlichen Zellen, anderen Bakterienarten oder von *Neisseria trachomatis* abweichenden *Neisseria*-Arten unterbunden bzw. minimiert wird. Die im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID enthaltene CT-Sonde ist komplementär zu ca. 39300 bp bzw. 4 % der genomischen Chlamydien-DNA (1×10^6 bp).³ Eine Sonde ist komplementär zu 100 % des kryptischen Plasmids mit 7.500 bp.

Tests mit großem Probendurchsatz mittels des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID können mit einem universellen automatischen Pipettier- und Verdünnungssystem durchgeführt werden, das auch als Rapid Capture-System bezeichnet wird (RCS). Dieses Instrument verarbeitet mit einem für den DNA-Test *digene* HC2 CT-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 übernommen, mit Ausnahme von Probenidentifizierung, Chemilumineszenzsignalnachweis und Berichterstattung zu den Ergebnissen.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Es befinden sich 96 Tests in einem DNA-Test-Kit *digene* HC2 CT-ID (REF 5135-1330). Die Zahl der Patientenergebnisse schwankt in Abhängigkeit von der Benutzungshäufigkeit eines Kits:

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

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

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^B
Konversionsgestell mit Deckel (optional bei manueller Anwendung; erforderlich bei Anwendung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID auf einem Rapid Capture System mit PreservCyt-Proben)^B
digene-Probengestell mit Gestelldeckel (optional bei manueller Anwendung; erforderlich bei Anwendung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-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)^C
digene HC2 DNA Collection Device^D
digene Female Swab Specimen Collection Kit (besteht aus 2 Tupfern und *digene* Specimen Transport Medium)^D
Spender für Probenröhrchen-Verschlussfolie und Folien-Schneidevorrichtung (verwendet mit dem Multi-Specimen Tube Vortexer 2)

Rapid Capture-System (optional für Tests mit großem Probendurchsatz)^E
Wascheinrichtung
Hybridisierungsmikrotiterplatten
Mikrotiterplattendeckel
Leere Mikrotiterplattenstrips (erhältlich bei Costar, Modell-Nr. 2581); optional bei Verwendung des automatischen Plattenspülers
Extralange Pipettenspitzen zum Entnehmen der Probe
Probeentnahmeröhrchen
Probeentnahmeröhrchengestell (zur Bestückung der Probeentnahmeröhrchen)
Probenröhrchengestell
Schraubkappen für Probeentnahmeröhrchen
Einwegbehälter für Nachweisreagenzien
DuraSeal[®]-Film zum Verschließen der Röhrchen

Allgemeine Labor-Ausrüstungsgegenstände und -zubehörteile

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

Ausreichend großes Wasserbad bei 65 ± 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
Repeater-Direktverdränger wie etwa Eppendorf Repeater[®] Multipette oder gleichwertige Pipette
8-Kanal-Dispenser: einstellbar auf Volumina von 25 - 200 µl
Timer
Natriumhypochlorit-Lösung, 0,5 % m/V Endkonzentration (aus Haushaltsbleiche)
Parafilm[®] oder gleichwertiges Produkt
Aerosoldichte Einweg-Pipettenspitzen für den 1-Kanal-Dispenser (20 - 200 µl und 200 - 1000 µl)
Einwegspitzen für die Eppendorf Repeater Multipette (25 und 500 µl)
Einwegspitzen für 8-Kanal-Dispenser (25 - 200 µl)
Kimtowels[®]-Wischtücher oder gleichwertige fusselfarme Papiertücher
Einweg-Arbeitstischabdeckung
Puderfreie Handschuhe
Rundboden-Polypropylen-Röhrchen (5 ml bzw. 15 ml) mit Schnappverschluss (zur Sondenverdünnung)
2,0-ml-Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen mit Verschlussdeckeln

Zentrifuge mit Ausschwingrotor, bis zu 2900 ± 150 xg, für konische 10-ml- oder 15-ml-Propylenröhrchen
Serologische oder Transferpipetten (5 ml)
digene HC2-Probenkonversionskit^A
Einwegspitzen für die Eppendorf Repeater Multipette (50 und 100 µl)

Für manuelles Vortexverfahren:

digene HC2-Probenkonversionsröhrchen (15 ml, konisch)^F, konische
10-ml-Sarstedt[®]-Röhrchen mit Deckeln oder 15-ml Rundboden-Polypropylenröhrchen mit Deckeln der Marken VWR[®] oder Corning[®]
Röhrchenhalter für konische 10- oder 15-ml-Röhrchen

Für Vortexer 2-Verfahren mit Multi-Specimen Tubes:

digene HC2-Probenkonversionsröhrchen (15 ml, konisch)^F
Vortexer 2 für Multi-Specimen Tubes (MST)
Konversionsgestell mit Deckel (für konische 15-ml-Röhrchen)
Reagenzglas-Spender-Verschließ- und Schneidevorrichtung
DuraSeal Film zum Verschließen der Röhrchen (zum Gebrauch mit MST Vortexer 2)

^A Bei QIAGEN sind nur für den DNA-Test *digene* HC2 CT-ID validierte Ausrüstungsgegenstände und Zubehörteile erhältlich. Wenden Sie sich an Ihren QIAGEN-Vertreter.

^B Ist bei halbautomatischer RCS-Anwendung ebenfalls erforderlich.

- ^C 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.
- ^D Die Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurden ausschließlich unter Verwendung der genannten Entnahme-Kits ermittelt.
- ^E Anweisungen zum Einsatz dieses Systems für Tests mit großem Probendurchsatz in dieser Analyse finden Sie in der *Gebrauchsanweisung für das Rapid Capture-System*.
- ^F Die bei QIAGEN erhältlichen *digene* HC2-Probenkonversionsröhrchen (der Marken VWR oder Corning®) 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.^{13,14,15,16} 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 Spritzer von Proben sind mit einem tuberkelbakterientötenden Desinfektionsmittel - wie etwa 0,5 % Natriumhypochlorit - oder einem anderen geeigneten Desinfektionsmittel zu desinfizieren.^{17, 18}
5. Sämtliche Proben, Nachweisreagenzien und andere potenziell kontaminierte Materialien sind gemäß den vor Ort geltenden Bestimmungen zu dekontaminieren.^{19,20}

Einige Nachweisreagenzien 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) Einleiten einer 10 %igen Natriumhydroxydlösung, (3) diese 16 Stunden einwirken lassen, (4) gut mit Wasser ausspülen.

INFORMATIONEN ZU SICHERHEITS- UND ZU GESUNDHEITSRISIKEN

Die folgenden Materialien wurden entsprechend den Anforderungen der EG-Richtlinie 2001/59/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 CT-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 Nachweisreagenz volumen 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 Öle der Haut. **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 Repeating-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 zu reduzierten Signalen oder schlechter Reproduzierbarkeit führen.
14. Den Mikrotiterplatteninkubator I bei einem Kaltstart mindestens 60 Minuten auf $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ äquilibrieren lassen. Nichteinhaltung dieser Aufwärmperiode könnte zum Schmelzen der Hybridisierungsmikrotiterplatte führen. Einzelheiten finden Sie in der Gebrauchsanweisung für den Mikrotiterplatteninkubator I.

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

1. Den Kit nach Empfang bei 2 - 8 °C aufbewahren. 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 nachstehend).
3. Alle Reagenzien, außer dem Denaturierungsreagenz, dem CT-Sondengemisch und dem Waschpuffer werden gebrauchsfertig geliefert.

Siehe zur Vorbereitung des CT-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.

Vorgehensweise zur Vorbereitung der Reagenzien

Denaturierungsreagenz	<p>ERSTE VORBEREITUNGEN:</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 Verblasen der Farbe vor Gebrauch 3 Tropfen Indikatorfarbstoff zufügen und gründlich mischen.</p> <p>Vorsicht: Das Denaturierungsreagenz ist ätzend. Geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Vorsichtig handhaben.</p>																		
CT-Sonden-gemisch (hergestellt aus CT-Sonde und Sondenverdünner-Reagenzien)	<p>VORBEREITUNG WÄHREND DER PROBEN-DENATURIERUNGSINKUBATION:</p> <p>WICHTIG: ZUWEILEN VERFÄNGT SICH DIE SONDE IM VERSCHLUSSECKEL DES RÖHRCHENS.</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. Bei der Vorbereitung des CT-Sondengemischs unbedingt auf gründliches Mischen achten. Während des Mischvorgangs muss sich ein sichtbarer Wirbel bilden. Unvollständiges Mischen kann zu einem reduzierten Signal führen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Das Röhrchen mit der CT-Sonde kurz zentrifugieren, damit sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens sammelt. Durch vorsichtiges Klopfen am Röhrchen mischen. • Die Menge des erforderlichen 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. • Das erforderliche Sondenverdünnungsmittelvolumen in einen neuen Einweg-Behälter überführen. Abhängig von der 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 CT-Sonde in Sondenverdünnungsmittel ansetzen. <table border="0" data-bbox="568 1669 1323 1879"> <thead> <tr> <th>Anzahl der Tests/Streifen</th> <th>Volumen des Sondenverdünnungsmittels*</th> <th>Volumen des Sonde*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>pro Vertiefung</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Werte einschließlich der empfohlenen zusätzlichen Volumen.</p>	Anzahl der Tests/Streifen	Volumen des Sondenverdünnungsmittels*	Volumen des Sonde*	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
Anzahl der Tests/Streifen	Volumen des Sondenverdünnungsmittels*	Volumen des Sonde*																	
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																	

	<ul style="list-style-type: none"> Die Sonde in das Sondenverdünnungsmittel pipettieren, indem die Pipettenspitze gegen die Innenwand des Röhrchens knapp über dem Meniskus platziert und der Inhalt abgegeben wird. Die Spitze nicht in das Sondenverdünnungsmittel eintauchen. Zum gründlichen Mischen mindestens 5 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexten. Es muss ein sichtbarer Wirbel entstehen. Mit "CT-Sondengemisch" beschriftet und in einem trockenen geschlossenen Behälter bis zur Verwendung aufbewahren. Nicht aufgebrauchtes Sondengemisch verwerfen. 												
Waschpuffer	<p>VORBEREITUNG WÄHREND DES CAPTURE-SCHRITTES: Für den automatischen Plattenspüler 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. Aus der nachstehenden Tabelle gehen die Mischvolumina hervor:</p> <p>Weitere Pflege- und Wartungsanleitungen entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler.</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 border="0" data-bbox="527 724 1323 861"> <thead> <tr> <th>Menge <u>Waschpufferkonzentrat</u></th> <th>Menge an destilliertem oder entionisiertem Wasser</th> <th>Endvolumen <u>Waschpuffer</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 l</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1.933,4 ml</td> <td>2 l</td> </tr> <tr> <td>100,0 ml</td> <td>2.900,0 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>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.</p> <p>Vor jedem Assay sicherstellen, dass der Abwassertank leer und der Spülwassertank mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gefüllt ist.</p> <p>Weitere Pflege- und Wartungsanleitungen entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler.</p> <p>Manuelles Plattenspülverfahren:</p> <ul style="list-style-type: none"> Waschpuffer-Konzentrat gut mischen. 100 ml Waschpuffer-Konzentrat mit 2,9 l destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen und gut mischen (Endvolumen: 3 l). Behälter zur Verhinderung von Kontamination oder Verdunstung fest verschließen. <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 <u>Waschpufferkonzentrat</u>	Menge an destilliertem oder entionisiertem Wasser	Endvolumen <u>Waschpuffer</u>	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1.933,4 ml	2 l	100,0 ml	2.900,0 ml	3 l
Menge <u>Waschpufferkonzentrat</u>	Menge an destilliertem oder entionisiertem Wasser	Endvolumen <u>Waschpuffer</u>											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1.933,4 ml	2 l											
100,0 ml	2.900,0 ml	3 l											

VOLUMINA FÜR GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN

Nachweisreagenz 1 und Nachweisreagenz 2	UNMITTELBAR VOR GEBRAUCH: Reagenz gründlich mischen, dann das entsprechende Volumen von Nachweisreagenz 1 oder 2 unter Beachtung der nachstehenden Anleitung vorschriftsmäßig in einen sauberen Reagenzbehälter <u>abmessen</u> . Zur Verhinderung einer Kontamination DÜRFEN diese Reagenzien NICHT mehr in die Originalflaschen zurückgegeben werden: Nicht aufgebrauchtes Material nach Gebrauch entsorgen . 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.											
	<table><thead><tr><th>Anzahl der Volumen des Tests/Streifen</th><th>Nachweisreagenzes <u>1 oder 2</u></th></tr></thead><tbody><tr><td>96/12</td><td>Flascheninhalt</td></tr><tr><td>72/9</td><td>7,0 ml</td></tr><tr><td>48/6</td><td>5,0 ml</td></tr><tr><td>24/3</td><td>3,0 ml</td></tr><tr><td>1 Test</td><td>0,125 ml</td></tr></tbody></table>	Anzahl der Volumen des Tests/Streifen	Nachweisreagenzes <u>1 oder 2</u>	96/12	Flascheninhalt	72/9	7,0 ml	48/6	5,0 ml	24/3	3,0 ml	1 Test
Anzahl der Volumen des Tests/Streifen	Nachweisreagenzes <u>1 oder 2</u>											
96/12	Flascheninhalt											
72/9	7,0 ml											
48/6	5,0 ml											
24/3	3,0 ml											
1 Test	0,125 ml											

ENTNAHME UND HANDHABUNG DER PROBEN

Für den DNA-Test *digene* HC2 CT-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 bzw. Proben, die mit einem besenähnlichen Entnahmeggerät 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 *digene* STM

Die STM-Proben können bis zu 2 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 CT-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 CT-negativ, 5 Proben enthielten jedoch eine hohe Konzentration von GC-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 PRESERVCYT-LÖSUNG

Für den DNA-Test *digene* HC2 CT-ID können Proben benutzt werden, die mit einer besenähnlichen Entnahmevorrichtung entnommen und zur Herstellung von Hologic ThinPrep Pap Test-Objektträgern in 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 CT-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 CT-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 CT-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 unabhängig vom RCS im Primärentnahmeröhrchen durchgeführt. Dies geschieht auch bei der manuellen Methode des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID vor Auftragen auf die RCS-Plattform, wie im Folgenden beschrieben. 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 CT-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 und benötigte Informationen zum Verfahren enthält.

MANUELLES VERFAHREN

Vorbereitung

1. Den Mikrotiterplatteninkubator I bei einem Kaltstart mindestens 60 Minuten auf 65 ± 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 CT ein Plattenlayout erstellen. Nähere Angaben hierzu sind im Anwenderhandbuch der entsprechenden Software enthalten.
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 Multi-Specimen Tube 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. Kalibratoren, Qualitätskontrollen, und Proben müssen in einer Konfiguration von 8 Mikrotiterspalten getestet werden; dabei werden die Replikate des Negativkalibrators (NC) in die Vertiefungen der Position A1, B1 und C1 gegeben; der Positivkalibrator (PC) befindet sich in Position D1, E1 und F1, der QC CT befindet sich in G1; QC GC in H1 und 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:

Reihe	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 Zugabe des Denaturierungsreagenz eine dunkle Farbe aufweisen, 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. Es dürfen pro Auftauzyklus maximal 3 Gefrier-/Auftauzyklen von höchstens 2 Stunden bei Raumtemperatur 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 infektiös²¹; das Laborpersonal muß 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. Entscheidend ist weiterhin das Mischen nach Zufügen des Denaturierungsreagenzes: **Darauf achten, dass der Multi-Specimen Tube Vortexer 2 auf 100 (maximale Geschwindigkeit) eingestellt ist und während des Mischens ein sichtbarer Flüssigkeitswirbel dergestalt beobachtet wird, dass die Flüssigkeit 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. Sie sind gemäß den geltenden nationalen und örtlichen Bestimmungen zu 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, Qualitätskontrolle 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 unter Verwendung eines 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[®]-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 Röhrchen

- a) Die Kalibrator-, Kontroll- und STM-Probenröhrchen mit sauberen Schraubverschlüssen für Probesammelnröhrchen wieder verschließen.
 - b) Jedes Röhrchen einzeln 5 Sekunden bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortexer gründlich mischen.
 - c) Jedes Probenröhrchen zum Bespülen der Innenseite des Röhrchens, des Verschlussdeckels und des Randes einmal umdrehen.
 - d) Das Röhrchen wieder zurück in das Gestell stellen.
4. Unabhängig von dem verwendeten Vortexverfahren **muss während des Mischens ein sichtbarer Flüssigkeitswirbel auf der Innenseite eines jeden Röhrchens sichtbar sein, der die gesamte Innenfläche des Röhrchens bespült**. Die Farbe der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben muss nach purpurrot umschlagen.
 5. Die Röhrchen in dem Gestell in einem Wasserbad bei $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 45 ± 5 Minuten inkubieren (denaturierte Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben können sofort getestet werden). Kalibratoren und Qualitätskontrollen können wie in den vorstehenden **Hinweisen** beschrieben bei $2 - 8^\circ\text{C}$ über Nacht gelagert werden). Hinweise zur Probenaufbewahrung sind im Abschnitt *Optionaler Haltepunkt* nachzulesen. Während dieser Inkubation das CT-Sondengemisch vorbereiten. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.

VERFAHREN ZUR VORBEREITUNG VON PROBEN IN PRESERVCYT-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 bitte dem Abschnitt „Äquivalenz zwischen *digene* STM- und PreservCyt-Proben“ entnehmen.
- 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.

Vorbereitung der Reagenzien

Verwenden Sie entweder das mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-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 mitgelieferten DNR 3 Tropfen Indikatorfarbstoff in die DNR-Flasche geben und gründlich mischen. Die Flüssigkeit 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 des 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-Probenkonversionsröhrchen, ein konisches 10-ml-Sarstedt-Röhrchen oder ein konisches 15-ml-VWR-oder Corning-Röhrchen 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 Röhrchen pipettieren. Die PreservCyt Lösung ganz unten in ein konisches Röhrchen 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 validiert und darf daher für diesen Schritt nicht benutzt werden.
5. Röhrchen im Ausschwingrotor 15 ± 2 Minuten bei 2900 ± 150 xg. zentrifugieren.
6. Während der Zentrifugation Mischung aus *digene* Specimen Transport Medium und Denaturierungsreagenz (STM/DNR) gemäß Tabelle 2 im Verhältnis 2:1 vorbereiten.

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

- a. Zur Berechnung des Gesamtvolumens der benötigten STM/DNR-Mischung Ausgangsvolumen der Probe in PreservCyt-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. Röhrrchen einzeln aus der Zentrifuge nehmen und in einen Halter oder ein Konversionsgestell stellen. In jedem Röhrrchen 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, fusselarmes Papiertuch legen.
- b. Überstand sorgfältig abdekantieren.
- c. Röhrrchen verkehrt herum halten und vorsichtig (ungefähr sechsmal) auf absorbierenden, fusselarmen Papiertüchern abtupfen, bis keine Flüssigkeit mehr aus dem Röhrrchen tropft. Jedes Mal eine saubere Stelle auf dem Papiertuch benutzen. Das Pellet darf während des Abtupfens **nicht** am Röhrrchen herabrutschen.

Hinweise:

- Nicht mehrmals auf dieselbe Stelle des absorbierenden, fusselarmen 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. Röhrrchen 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 Röhrrchen 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 Röhrrchengrund 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. Röhrrchen in ein Gestell stellen.
3. Gestell 15 ± 2 Minuten in ein 65 ± 2 °C warmes Wasserbad stellen. Dabei darauf achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in den Röhrrchen ausreichend ist.
4. Gestell mit Proben aus dem Wasserbad nehmen und Proben einzeln auf dem Vortexer 15 - 30 Sekunden mischen.

Hinweis: Überprüfen, dass zu diesem Zeitpunkt alle Pellets vollständig resuspendiert sind. Proben, die noch immer sichtbare Pellets aufweisen, sind für den Test ungeeignet und müssen verworfen werden.

5. Gestell ins 65 ± 2 °C warme Wasserbad zurückstellen und Denaturierung 30 ± 3 Minuten fortsetzen.
6. Zur unten beschriebenen *Hybridisierung* übergehen oder Proben laut Abschnitt „*Optionalen 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-Probenkonversionsröhrrchen (VWR oder Corning, konische 15-ml-Röhrrchen) entwickelt. Der Benutzer darf nur einen Röhrrchentyp 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 Deckel 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 Röhrchen 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 ± 2 Minuten in einem Wasserbad bei 65 ± 2 °C inkubieren. Dabei darauf achten, dass der Wasserspiegel im Wasserbad zum Eintauchen des gesamten Probenvolumens in den Röhrchen ausreichend ist.
 12. Nach 15-minütiger Inkubation Gestell mit den Röhrchen 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 Röhrchen 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 ± 3 Minuten bei 65 ± 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. Sofort Gestelldeckel 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 angebracht werden. Vor der Lagerung bei -20 °C müssen Gestelldeckel und DuraSeal-Verschlussfolie entfernt und die Röhrchen 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 CT-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 nehmen und 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. Unter Beachtung des im Setup erstellten Plattenlayouts jeweils 75 µl Kalibrator, Qualitätskontrolle oder Probe auf den **Boden** einer leeren 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 Probenentransportröhrchen 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 Innenseite 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 Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben pipettieren. Dabei für jede Reihe einen 8-Kanal-Dispenser und frische Spitzen verwenden. In jede Hybridisierungsvertiefung das Sondengemisch geben; dabei keine Flüssigkeit verspritzen. Die Seiten der Vertiefungen dürfen dabei nicht berührt werden.

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. Für eine geringe Zahl an Vertiefungen anstelle des 8-Kanal-Dispensers einen Einkanal-Dispenser verwenden (mit 25 - 200 µl Spitzen ausgerüstet)

- Die Hybridisierungsmikrotiterplatte mit einem Deckel abdecken. Die Hybridisierungsmikrotiterplatte auf einem bei 1100 ± 100 U/min eingestellten Rotationsschüttler 3 ± 2 Minuten schütteln. Die Farbe der Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben muss nach purpurrot umschlagen. Vertiefungen, die purpurrot bleiben, haben nicht die vorschriftsmäßige Menge des Sondengemischs erhalten. Den purpurrot gebliebenen Proben zusätzlich 25 µl des Sondengemischs zufügen und erneut schütteln. Sind die Vertiefungen nach diesen Schritten noch immer purpurrot, muss der Test wiederholt werden.
- Hybridisierungsmikrotiterplatte 60 ± 5 Minuten lang in einem vorgewärmten und auf 65 ± 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

- 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 forlaufend nummerieren (1, 2, 3 ...) und die Mikrotiterplatte mit einer geeigneten ID versehen. Die Proben werden den Vertiefungen nach dem unter *Setup* erstellten Muster hinzugefügt.
- Die Hybridisierungsmikrotiterplatte mit Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Proben vorsichtig aus dem Mikrotiterplatteninkubator I nehmen. Plattendeckel sofort abnehmen und auf eine saubere Oberfläche legen.
- 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



- Die Mikrotiterplatte mit dem Plattendeckel abdecken und 60 ± 5 Minuten lang auf dem Rotationsschüttler I bei 1100 ± 100 U/min und $20 - 25$ °C schütteln.
- Während dieser Inkubation den Waschpuffer vorbereiten und ggf. die Spül- und Abwassertanks des automatischen Plattenspülers überprüfen. Siehe Abschnitt „Vorbereitung und Aufbewahrung der Reagenzien“.
- 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®-Wischtüchern oder entsprechenden fusselarmen 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 sauberen, 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 Farbtintensität 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 immer eingeschaltet lassen. Darauf achten, dass der Spülwassertank gefüllt und der Abwassertank leer ist. Der automatische Plattenspüler spült regelmäßig das System zu Reinigungszwecken. Siehe die Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler.

VOR JEDEM GEBRAUCH:

- Vergewissern Sie sich, dass der Wassertank mindestens bis zur 1-l-Marke mit Waschpufferlösung gefüllt ist. Wenn nicht, 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 geben.
 2. Vergewissern Sie sich, dass der Strom eingeschaltet und auf dem Display „Digene Wash Ready“ oder „P1“ erscheint.

Hinweis: Wird nur ein Teil einer Reihe der Capture-Vertiefungen benötigt, müssen 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 fusselfreie 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 saubere Kimtowels-Wischtüchern oder entsprechenden fusselfreie 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 des Nachweisreagenz 1 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 für insgesamt 6 Spülvorgänge pro Vertiefung wiederholt.

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 des Nachweisreagenz 2 mit einem 8-Kanal-Dispenser und der reversen Pipettier Technik vorsichtig in jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. *Alle Mikrovertiefungen müssen einen gelben Farbumschlag aufweisen.* Durch Beobachtung der Farbintensität sicherstellen, dass alle Vertiefungen befüllt wurden. Die Farbintensität muss in allen Vertiefungen ähnlich sein.
 2. Die Mikrotiterplatten mit einem Plattendeckel oder sauberem Parafilm (bzw. entsprechendem Material) abdecken und 15 Minuten bei 20 – 25 °C inkubieren. Direkte Sonnenlichteinstrahlung 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 Assay-Grenzwertes ermöglichen. Die Verifizierungskriterien werden automatisch errechnet und durch die *digene* Testanalyse-Software als gültig oder ungültig verifiziert. Beim DNA-Test *digene* HC2 CT-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

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 (Positiver Kalibrator, 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 Assaykalibrierung 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 CT-ID wurden die mit dem *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) bei internen Studien gewonnenen Ergebnisse, bei denen in 63 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 für diese 106 Assays bei 5,8 % oder darunter und für den Negativkalibrator bei 11,2 % oder darunter lag. Obwohl der maximale RLU-Mittelwert für den Negativkalibrator in manuellen Assays 88 betrug, lagen die durchschnittlichen RLU-Werte für den NC der RCS-Anwendung nachweislich über denen der manuellen Methode. Es hat sich gezeigt, dass diese Differenz zu keinen unterschiedlichen Ergebnissen in der Anwendung beider Optionen führt. Der durchschnittliche RLU-Grenzwert für die Negativkalibration wurde auf 250 RLU festgesetzt. Dies basiert auf einer statistischen Berechnung von ± 3 SD jener RLU-Mittelwerte, die für den Negativkalibrator im DNA-Test *digene* HC2 CT/GC bei umfangreichen Untersuchungen während der Entwicklung der RCS-Anwendung beobachtet wurden. Der obere Grenzwert dieses Bereiches von ± 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 bei maximal 150 % und der VK bei maximal 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. Der RLU-Mittelwert kann der RCS-Anwendung gelegentlich über 150 liegen, u. U. mit einem entsprechenden Rückgang der Werte für PC bzw. NC, der erfahrungsgemäß bei Kalibrierung einen Durchschnittswert von 7,11 liefert (siehe Tabelle 3). In diesem Fall sind die Ergebnisse annehmbar, vorausgesetzt, der RLU-Wert für NC liegt nicht über 250 und der PC/NC-Quotient nicht unter 2,0. Wenn der RLU-Wert für NC über 250 liegt 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	Plattenanzahl	Errechnete Mittelwerte des PC/NC-Quotienten				Testkit-Qualitätskontrollen (Mittelwert RLU/CO)	
		Mittelwert	Median	Min.	Max.	QC CT	QC GC
RCS	63	7,11	6,87	5,24	10,23	3.8	0.24
Manuell	43	6,75	5,70	4,60	11,25	3.5	0.16

Verfahren	Kalibrator	Errechnete Mittelwerte des RLU-Werts				Errechnete Mittelwerte des VK (%)
		Mittel	Median	Min.	Max.	
RCS	Negativ	52	50	29	84	9,2
	Positiv	362	369	179	505	5,3
Manuell	Negativ	41	37	28	88	11,2
	Positiv	275	274	135	428	5,8

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 Datenanalyserport der *digene* Testanalyse-Software dokumentiert.

QUALITÄTSKONTROLLE

Der DNA-Test *digene* HC2 CT-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	1,00	0
Max. RLU/CO	20,00	0,9999
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 Qualitätskontrollmaterial unterscheidet sich von dem CT-Organismus in der Probenmatrix und ist keine geeignete Qualitätskontrolle 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. Zur Kontrolle der Probenlyse und –denaturierung sollte die Labors regelmäßig >100.000 *C. trachomatis* Elementarkörper (vorzugsweise Serotypen E oder J, von ATCC jeweils als ATCC VR348B und VR886 erhältlich) in ein frisches STM-Röhrchen geben. Mindestens 1 Stunde vor dem Test nach dem Verfahren für normale klinische Proben inkubieren. Bei ordnungsgemäßer Verarbeitung der Probe muss der RLU/CO-Wert mindestens 2,50 betragen. Alternativ können hierfür auch handelsübliche Probetestpaneele mit CT-Organismen verwendet werden.
5. Nur für von QIAGEN zugelassene Luminometer wurden zulässige Schwankungsbreiten für die Negativ- und Positivkalibratoren ermittelt. Die Negativ- und Positivkalibratoren dienen lediglich der Überwachung auf substanziellen Reagenzausfall und stellen nicht die Genauigkeit des Assay-Grenzwertes sicher.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

1. Proben mit RLU/CO-Quotienten über 2,50 werden als "Positiv auf DNA von *Chlamydia trachomatis*" eingestuft. Die Lebensfähigkeit bzw. Infektiosität von *Chlamydia trachomatis*-Organismen kann nicht beeinträchtigt werden, da die Ziel-DNA auch ohne lebensfähige Organismen weiter bestehen kann.
2. Proben mit einem RLU/CO-Quotienten unter 1,00 enthalten keine DNA von *Chlamydia trachomatis* bzw. nur in einer Menge unterhalb der Nachweisgrenze des Assays. Diese sollten als "Keine DNA von *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen" interpretiert werden. Ein negatives Ergebnis schließt eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* nicht aus, da die Ergebnisse von einer adäquaten Probenentnahme und dem Nachweis von ausreichend DNA 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 *Chlamydia trachomatis* angesehen werden. Aufgrund des geringeren prädiktiven Wertes eines positiven Ergebnisses mit diesen RLU/CO-Werten wird jedoch eine erneute Untersuchung mit einer frischen Patientenprobe oder eine ergänzende Untersuchung mittels eines anderen Testverfahrens empfohlen.*
4. Ist die Wahrscheinlichkeit einer *C. trachomatis*- Infektion ungeklärt oder fraglich, so wird die Verifizierung eines u. U. positiven Ergebnisses durch eine andere Methode empfohlen. Analytische Studien mit diesem Test haben gezeigt, dass mit bestimmten anderen DNA-Sequenzen eine Kreuzreaktivität möglich ist. Das kann zu einem falsch-positiven Ergebnis führen. Zwar wurde die Häufigkeit von pBR322 und andere DNA-Sequenzen in Genitalproben nicht vollständig ausgewertet, dennoch war bei 1818 Patienten, von denen 106 CT-positive Proben auf pBR322 getestet wurden, keine pBR322-Kreuzreaktivität zu beobachten. Hierbei handelt es sich um eine repräsentative Patientengruppe. Das bedeutet, dass diese Ergebnisse die Verbreitung von pBR322 nicht unbedingt für alle getesteten Patientengruppen wiedergeben. Nähere Informationen Sie im Abschnitt „Analytische Spezifität“.

- * Bei der klinischen Evaluation des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurden 7 von 14 dieser uneindeutigen Ergebnisse bei der Untersuchung in Kultur, mit dem DFA-Test oder der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als positiv verifiziert; die übrigen 7 waren offenbar falsch positiv. Diese 7 falsch positiven Proben befanden sich allerdings in einer Gruppe von insgesamt gerade einmal 11 Proben, die mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID aus 1643 in Kultur als CT-negativ verifizierte Proben, für nicht negativ befunden wurden (99,3 % wurden bezüglich Kultur/DFA bei Berücksichtigung der PCR-Testergebnisse korrekt identifiziert). In einer anschließend durchgeführten Evaluation hatten diese 7 ursprünglichen Positivproben laut Initialtest einen RLU/CO von 1,00 - 2,50, wobei 3 dieser Proben bei allen anderen Untersuchungen negativ bewertet wurden (alle 3 dieser Proben waren nach zweimaliger Wiederholung mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID negativ). Für die verbleibenden 4 Proben waren alle Kultur-DFA-PCR-positiv, und beide DNA-Wiederholungstests *digene* HC2 CT-ID Replikate lagen mindestens bei 1,00 RLU/CO.

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
- Das Verfahren für den DNA-Test *digene* HC2 CT-ID, die Qualitätskontrolle und die Interpretation der Probenergebnisse sind zum Erreichen sicherer Testergebnisse strikt einzuhalten.
- Für den DNA-Test *digene* HC2 CT-ID dürfen nur Zervixproben verwendet werden, die mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device oder dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit entnommen und in STM überführt wurden bzw. Proben, die mit einem besenähnlichen Entnahmegesäß entnommen und in PreservCyt-Lösung gegeben wurden.
- Ergebnisse dieses Assays dürfen nur in Verbindung mit Informationen aus der klinischen Untersuchung des Patienten und anderen diagnostischen Verfahren interpretiert werden.
- Der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID liefert qualitative Ergebnisse. Es wurde nicht gezeigt, dass der Zahlenwert (das Verhältnis) über dem für die Patientenprobe festgelegten Grenzwert mit dem CT-DNA-Wert der Patientenprobe korreliert.
- Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion mit *Chlamydia trachomatis* nicht aus, da der Nachweis von der Organismenzahl in der Probe abhängt und vom gewählten Probeentnahmeverfahren, von Patientenfaktoren, vom Infektionsstadium bzw. dem jeweiligen *Chlamydia trachomatis*-Stamm beeinflusst werden kann.
- Wie bei grundsätzlich allen Nicht-Kultur-Methoden kann eine positive Probe nicht als Indikator für lebensfähige *Chlamydia trachomatis* angesehen werden.
- Der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID eignet sich nicht für Aussagen zum Therapieerfolg.
- Der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID ist für die Benutzung mit dem automatischen Plattenspüler nur mit den in den Assay-Anweisungen genannten Einstellungen validiert. Die Validierungsstudie wurde firmenintern durchgeführt. Die ihrer Verwendung zugrunde liegenden Daten sind bei QIAGEN gespeichert. Andere Plattenspüler oder andere Plattenspüleinrichtungen sind bei Verwendung mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID nicht zulässig.
- Zur Minimierung der Ergebnisvariabilität beim Einsatz des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID muss das den Assay durchführende Laborpersonal die erforderlichen fachlichen Fertigkeiten besitzen. Jedes Labor muss außerdem die technisch korrekte Durchführung des Assays überwachen. Es wird vorgeschlagen, dass hierfür handelsübliche Probestestpaneele mit CT-Organismen oder CT- und CT-DNA gemäß den jeweiligen firmeninternen Qualitätsverfahren regelmäßig getestet werden.

ERWARTETE ERGEBNISSE

PRÄVALENZ

Die Prävalenz von *Chlamydia-trachomatis*-positiven Proben schwankt in Abhängigkeit von Patientenmerkmalen wie Alter, Geschlecht und Risikofaktoren. Die Prävalenz von im Rahmen der klinischen Untersuchung mittels DNA-Test *digene* HC2 CT-ID festgestellter *Chlamydia trachomatis* lag zwischen 3,3 % und 14,6 %. Bei der Berechnung dieses Wertes wurde davon ausgegangen, dass die 14 Proben mit nicht eindeutigen Ergebnissen in der Studie positiv für CT-DNA waren (Tabelle 4). Sieben dieser 14 Proben wurden mit CT-Kultur/DFA oder CT-PCR positiv verifiziert.

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

Testlabor	Anzahl positive/Anzahl getestete	Prävalenz (%)
1	67/460	14,6
2	42/307	13,7
3	38/308	12,3
4	23/414	5,6
5	11/329	3,3
Insgesamt	181/1818	10,0

POSITIVER UND NEGATIVER VORHERSAGEWERT

Der hypothetische positive Vorhersagewert (positive predictive value, PPV) und der hypothetische negative Vorhersagewert (negative predictive value, NPV) für verschiedene Prävalenzraten mittels des DNA-Test *digene* HC2 CT-ID basiert auf der Gesamtempfindlichkeit und Spezifität in Bezug auf CT-Kultur/DFA für mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device (Zervixbürste) und dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (Tupfer) entnommene und individuell bestimmte Proben. Tabelle 5 gibt den hypothetischen PPV und NPV für Bürstenproben (allgemeine Sensitivität 97,71 % und Spezifität 98,15 %) und Tabelle 6 für Abstrichproben (allgemeine Sensitivität 87,50 % und Spezifität 98,36 %) wieder.

Tabelle 5. DNA-Test *digene* HC2 CT-ID Hypothetische Vorhersagewerte bei verschiedenen Prävalenzraten (Bürste).

Prävalenzrate (%)	Empfindlichkeit (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	97,7	98,2	73,5	99,9
10	97,7	98,2	85,4	99,7
15	97,7	98,2	90,3	96,6
20	97,7	98,2	93,0	99,4

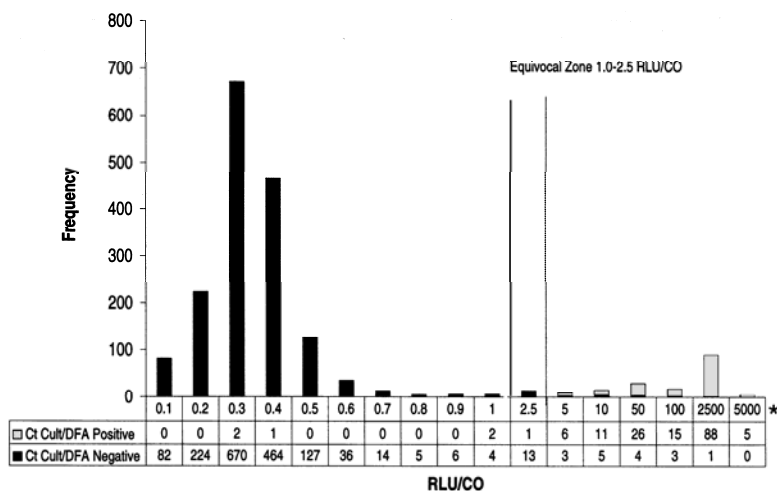
Tabelle 6. DNA-Test *digene* HC2 CT-ID Hypothetische Vorhersagewerte bei verschiedenen Prävalenzraten (Tupfer).

Prävalenzrate (%)	Empfindlichkeit (%)	Spezifität (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	87,5	98,4	73,4	99,4
10	87,5	98,4	83,2	98,9
15	87,5	98,4	87,2	98,4
20	87,5	98,4	89,3	97,9

HÄUFIGKEITSVERTEILUNG: RLU/CO-ERGEBNISSE DES DNA-TESTS *digene* HC2 CT-ID

Die Verteilung der während der klinischen Multicenterstudie beobachteten RLU/CO-Verhältnisse des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wird nachstehend angegeben (Abbildung 1). Diese Daten berücksichtigen sämtliche Proben, die mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID untersucht wurden und für die Ergebnisse über CT-Kultur/DFA vorlagen (n = 1818). Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt nach folgenden Kriterien: Proben mit RLU/CO-Werten unter 1,00 wurden als negativ eingestuft. Proben mit RLU/CO-Werten von mindestens 2,50 wurden als positiv bewertet. Proben mit einem RLU/CO-Quotienten zwischen 1,00 und 2,50 gelten als nicht eindeutig.

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



Der RLU/CO-Quotient der im *digene* HC2 CT-ID DNA-Test positiven Ergebnisse unterscheidet sich deutlich von dem der negativen Ergebnisse. Neunundneunzig Prozent (99 %, 1620/1637) der im DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID negativen Ergebnisse haben RLU/CO-Werte zwischen 0 und 0,7. Insgesamt fällt weniger als 1 % (14/1818) der Probenergebnisse in den Ambivalenzbereich des Assays, davon waren 7,1 % (1/14) laut CT-Kultur/DFA positiv und weitere 6 (46 %) laut CT-PCR positiv. Neunundneunzig Prozent (85 %, 142/167) der Negativergebnisse des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID haben RLU/CO-Werte zwischen 10 und 5000.

LEISTUNGSMERKMALE

KLINISCHE STUDIENERGEBNISSE FÜR DIE VERSCHIEDENEN PROBENTYPEN

Die Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurden durch Vergleich der Assayergebnisse mit den Ergebnissen der Chlamydia-Kulturen und der DFA-Tests bestimmt. Eintausendachtundachtzehn (1818) Patienten wurden in 5 verschiedenen Einrichtungen (einschließlich Einrichtungen für sexuell übertragbare Krankheiten, Familienplanung sowie Geburtshilfe und Gynäkologie) Proben entnommen und später getestet. Am Sediment des CT-Kultur-Transportmediums wurden nach Zentrifugierung DFA-Tests für Proben durchgeführt, die im DNA-Test *digene* HC2-CT-ID positiv und in Kultur negativ waren. An den im DNA-Test *digene* HC2-CT-ID positiven und in Kultur und im DFA-Test negativen Proben wurden anschliessend PCR-Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID basierten NICHT auf den Ergebnissen der PCR-Tests, die PCR hat die Berechnungen der Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID daher nicht beeinflusst. Die Daten für die Bestimmung der Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurden anhand zwei verschiedener Luminometermodelle (die Dynex-Modelle MLX und ML2200) generiert. 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) entnommenen Proben in Tabelle 8 .

Tabelle 7. DNA-Test *digene* HC2 CT-ID im Vergleich zu Ergebnissen aus CT-Kultur und DFA für Bürstenproben.

Nachfolgend sind die anhand des RLU/CO-Werts 1,0 berechneten Leistungsmerkmale angegeben. Werte in Klammern benennen die Leistung bei einem RLU/CO-Wert von 2,5. Die Konfidenzintervalle (KI) von 95 % schließen beide Bereiche ein, wenn Punktschätzungen bei beiden der bewerteten RLU/CO-Werte verschieden sind.

Testlabor	CT-ID : Kultur: DFA: n	POS. POS.	POS. NEG. POS.	POS. NEG. NEG ¹	NEG. POS.	NEG. NEG. - ³	Empfindlichkeit	Spezifität	NPV	PPV	CT-ID+ Kultur- DFA: PCR ² +	
Symptombelastet												
95 % KI	1	351	42	5	7 (4)	2	295 (298)	95,92 86,0-99,5	97,68 (98,68) 95,3-99,6	99,33 97,6-99,9	87,04 (92,16) 75,1-97,8	5/7 (3/4)
95 % KI	2	192	11	5	6 (5)	0	170 (171)	100,00 79,4-100	96,59 (97,16) 92,7-99,1	100 97,9-100	72,73 (76,19) 49,8-91,8	6/6 (5/5)
95 % KI	3	219	34	0	3 (1)	1	181 (183)	97,14 81,5-100	98,38 (99,46) 94,4-100	99,45 (99,46) 97,0-100	91,89 (97,14) 78,1-99,9	1/2 ⁴ (1/1)
95 % KI	4	177	6	3 (2)	0	0 (1)	168	100,00 (88,89) 51,8-100	100,00 97,8-100	100,00 (99,41) 96,8-100	100,00 63,1-100	-
95 % KI	Alle	939	93	13 (12)	16 (10)	3 (4)	814 (820)	97,25 (96,33) 90,9-99,4	98,07 (98,80) 96,9-98,9	99,63 (99,51) 98,8-99,9	86,89 (91,30) 79,6-95,8	12/15⁴ (9/10)
Symptomfrei												
95 % KI	1	101	8	0	2 (0)	0	91 (93)	100,00 63,1-100	97,85 (100,00) 92,5-100	100,00 96,0-100	80,00 (100,00) 44,4-100	0/2 (k.A.)
95 % KI	2	12	1	0	1	0	10	100,00 2,50-100	90,91 58,7-99,8	100,00 69,2-100	50,00 1,3-98,7	1/1
95 % KI	3	81	3	0	0	0	78	100,00 29,2-100	100,00 95,4-100	100,00 95,4-100	100,00 29,2-100	-
95 % KI	4	236	9	1	4 (2)	0	222 (224)	100,00 69,2-100	98,23 (99,12) 95,5-99,9	100,00 98,4-100	71,43 (83,33) 41,9-97,9	3/4 ⁴ (1/1 ⁴)
95 % KI	5	1	0	0	0	0	1	- 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	-	-
95 % KI	Alle	431	21	1	7 (3)	0	402 (406)	100,00 84,6-100	98,29 (99,27) 96,5-99,9	100 99,1-100	75,86 (88,00) 56,5-97,5	4/7⁴ (2/3⁴)
Patientenpopulation gesamt												
95 % KI	1	452	50	5	9 (4)	2	386 (391)	96,49 87,9-99,6	97,72 (98,99) 95,7-99,7	99,48 (99,49) 98,2-99,9	85,90 (93,22) 75,0-98,1	5/9 (3/4)
95 % KI	2	204	12	5	7 (6)	0	180 (181)	100,00 80,5-100	96,26 (96,79) 92,4-98,8	100,00 98,0-100	70,83 (73,91) 48,9-89,8	7/7 (6/6)
95 % KI	3	300	37	0	3 (1)	1	259 (261)	97,37 86,2-99,9	98,86 (99,62) 96,7-100	99,62 97,9-100	92,50 (97,37) 79,6-99,9	1/2 ⁴ (1/1)
95 % KI	4	413	15	4 (3)	4 (2)	0 (1)	390 (392)	100,00 (94,74) 74,0-100	98,98 (99,49) 97,4-99,9	100,00 (99,75) 98,6-100	82,61 (90,00) 61,2-98,8	3/3 ⁴ (1/1 ⁴)
95 % KI	5	1	0	0	0	0	1	- 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	-	-
95 % KI	Alle	1370	114	14 (13)	23 (13)	3 (4)	1216 (1226)	97,71 (96,85) 92,4-99,5	98,15 (98,95) 97,2-99,4	99,75 (99,67) 99,2-100	84,77 (90,71) 78,0-95,0	16/21⁵ (11/12⁴)

1 In zwei Fällen war DFA erforderlich, wurde jedoch nicht durchgeführt.

2 Nur zu Ihrer Information; Probenergebnisse wurden nicht mit PCR festgestellt.

3 Eine im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID und in Kultur negative Probe wurde, obwohl nicht erforderlich, mit DFA getestet und ergab dort ein positives Resultat. Dieses Ergebnis wurde in die Berechnungen zur Leistungsfähigkeit mit einbezogen als im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID falsch-negatives Ergebnis.

4 An einer Probe wurde keine PCR durchgeführt.

5 In einem Fall war DFA nötig, wurde aber nicht durchgeführt.

- = Nicht zutreffend.

Tabelle 8. DNA-Test *digene* HC2 CT-ID im Vergleich zu Ergebnissen aus CT-Kultur und DFA für Tupferproben.

Nachfolgend sind die anhand des RLU/CO-Werts 1,0 berechneten Leistungsmerkmale angegeben. Werte in Klammern benennen die Leistung bei einem RLU/CO-Wert von 2,5. Die Konfidenzintervalle (KI) von 95 % schließen beide Bereiche ein, wenn Punktschätzungen bei beiden der bewerteten RLU/CO-Werte verschieden sind.

Testlabor	CT-ID : Kultur: DFA: n	POS. POS.	POS. NEG. POS.	POS. NEG. NEG. ¹	NEG. POS.	NEG. NEG. - ³	Empfindlichkeit	Spezifität	NPV	PPV	CT-ID+ Kultur- DFA: PCR ² +	
Symptombelastet												
95 % KI	1	358	31 (28)	0	5 (3)	7 (10)	315 (317)	81,58 (73,68)	98,44 (99,06)	97,83 (96,94)	86,11 (90,32)	-
								65,67-92,26	96,39-99,49	95,57-99,12	70,50-95,33	
95 % KI	2	94	10	1	3 (1)	1	79 (81)	91,67	96,34 (98,78)	98,75 (98,78)	78,57 (91,67)	2/3 (1/1)
								61,5-99,8	89,6-100	93,2-100	49,2-100	
95 % KI	3	5	1	0	0	0	4	100,00	100,00	100,00	100,00	-
								0,84-90,6	47,8-100	29,0-96,3	2,5-100	
95 % KI	5	152	7	0	2 (1)	0	143 (144)	100,00	98,62 (99,31)	100,00	77,78 (87,50)	0/0 ⁴ (0/0 ³)
								59,0-100	95,1-100	97,5-100	40,0-99,7	
95 % KI	Alle	609	49 (46)	1	10 (5)	8 (11)	541 (546)	86,21 (81,03)	98,19 (99,09)	98,54 (98,03)	83,33 (90,38)	2/3⁴ (1/1³)
								74.62-93.85	96.69-99.13	97.15-99.37	71.48-91.71	
95 % KI Symptomfrei												
95 % KI	1	61	4 (3)	0	2 (1)	0 (1)	55 (56)	100 (75,00)	96,49 (98,25)	100 (98,25)	66,67 (75,00)	-
								39,76-100	87,89-99,57	93,51-100	22,28-95,67	
95 % KI	2	10	0	0	0	0	10	-	100,00	100,00	-	-
									69,2-100	69,2-100		
95 % KI	3	2	0	0	1	0	1	-	50,00	100,00	0,00	- ³
									1,3-98,7	2,5-100	0-97,5	
95 % KI	4	1	0	0	0	0	1	-	100,00	100,00	-	-
									2,5-100	2,5-100		
95 % KI	5	176	2	0	0	0	174	100,00	100,00	100,00	100,00	-
								15,8-100	97,9-100	97,9-100	15,8-100	
95 % KI	Alle	250	6 (5)	0	3(2)	0 (1)	241 (242)	100 (83,33)	98,77 (99,18)	100 (99,59)	66,67 (71,43)	-³
								54,07-100	96,45-99,75	98,48-100	29,93-92,51	
95 % KI Patienten insgesamt												
95 % KI	1	419	35 (31)	0	7 (4)	7 (11)	370 (373)	83,33 (73,81)	98,14 (98,94)	98,14 (97,14)	83,33 (88,57)	-
								68,64-93,03	96,21-99,25	96,21-99,25	68,64-93,03	
95 % KI	2	104	10	1	3 (1)	1	89 (91)	91,67	96,74 (98,78)	98,89 (91,67)	78,57 (98,78)	2/3 (1/1)
								61,5-99,8	90,8-100	94,0-100	49,2-99,8	
95 % KI	3	7	1	0	1	0	5	100,00	83,33	100,00	50,00	- ³
								2,5-100	35,9-99,6	47,8-100	1,3-98,7	
95 % KI	4	1	0	0	0	0	1	-	100,00	100,00	-	-
									2,5-100	2,5-100		
95 % KI	5	328	9	0	2 (1)	0	317 (318)	100,00	99,37 (99,69)	100,00	81,82 (90,00)	- ⁴
								66,4-100	97,8-100	98,8-100	48,2-99,8	
95 % KI	Alle	859	55 (51)	1	13 (7)	8 (12)	782 (788)	87,50 (81,25)	98,36 (99,12)	98,99 (98,50)	81,16 (88,14)	2/3⁵ (1/1⁴)
								76,85-94,45	97,22-99,13	98,01-99,56	69,94-89,57	

1 Dieser Kategorie wurden alle Proben zugeordnet, bei denen ein DFA-Test erforderlich war. Dieser wurde jedoch nicht durchgeführt.

2 Nur zu Ihrer Information; Probenergebnisse wurden nicht mit PCR festgestellt.

3 An einer Probe wurde keine PCR durchgeführt.

4 An zwei Proben wurde keine PCR durchgeführt.

5 An drei Proben wurde keine PCR durchgeführt.

- = Nicht zutreffend.

Die Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurden mit einem Cutoff-Wert von 1,0 und 2,5 berechnet. Dabei wurden voraussichtlich positive Proben innerhalb des Ambivalenzbereichs nicht berücksichtigt (siehe Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ dieser Gebrauchsanweisung). Die Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID kann in Ihrem Labor unterschiedlich ausfallen, je nach der Verteilung der Werte, die innerhalb des Ambivalenzbereichs liegen. Mit Vorbehalt als positiv gewertete Proben (Ambivalenzbereich) können erneut getestet werden (siehe Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“, Punkt 3, dieser Gebrauchsanweisung). Als Orientierungswert: weniger als 0,8 % der im Rahmen der klinischen Multicenterstudie zur Feststellung der Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID getesteten Proben (14/1818) fielen in diesen Bereich. Weitere Informationen hierzu vermittelt die Häufigkeitsverteilung der RLU/CO-Ergebnisse im Abschnitt „Erwartete Ergebnisse“ dieser Gebrauchsanweisung.

Zur Schätzung der äquivalenten Empfindlichkeit und des positiven prädiktiven Wertes des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurde bei Proben, die mit dem *digene* Female Swab Specimen Collection Kit entnommen wurden, keine ausreichende Datenmenge generiert (verglichen mit dem *digene* HC2 DNA Collection Device). Da die Verwendung des *digene* HC2 DNA Collection Device zur Entnahme von Zervixproben bei Schwangeren kontraindiziert ist, kann die Leistungsfähigkeit des Tests zum Nachweis von CT-DNA in dieser Patientenpopulation bzw. immer dann, wenn ein *digene* Female Swab Specimen Collection Kit verwendet wird, vermindert sein.

Die klinische Empfindlichkeit und Spezifität des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID zur Identifikation von Patienten mit klinisch akuter Infektion, die auf Geschlechtspartner übertragen werden oder chlamydienbezogene Folgeerscheinungen hervorrufen kann, wurde nicht mit im Handel erhältlichen Nukleinsäureamplifikationsverfahren (Nucleic Acid Amplification, NAA) zum Nachweis von CT-DNA verglichen. In klinischen Studien wurden 24 Patienten Proben entnommen, die in CT-Kultur und im DFA-Test negativ reagierten. 12 Proben, die im DNA-Test *digene* HC2-CT-ID positiv ausfielen und 6 vorbehaltlich positive Proben reagierten mit einem modifizierten handelsüblichen NAA-Assay wiederum positiv. 1637 Proben, die in dieser Studie im DNA-Test *digene* HC2-CT-ID negativ ausfielen und 5 der im DNA-Test *digene* HC2-CT-ID positiven, im CT-Kultur und im DFA-Test jedoch negativen Proben, wurden nicht mittels dieser modifizierten NAA getestet. Die geschätzte Sensitivität beruht bei Patienten, die in Kultur positiv auf *Chlamydia trachomatis* reagierten, auf der Anzahl der positiven Ergebnisse im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID. Die Empfindlichkeit des DNA-Tests *digene* HC2-CT-ID lässt sich daher nur relativ zur Positivität aus Kultur bzw. DFA ableiten. Diese kann eine Empfindlichkeit von 60 - 85 % aufweisen. Weiterhin wurden mehrere Studien von verschiedenen unabhängigen Forschungsgruppen durchgeführt, die die Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID im Vergleich zu handelsüblichen NAA- und Forschungs-NAA-Tests zum Gegenstand hatten.²²

REPRODUZIERBARKEIT

Als Teil der klinischen Multicenterstudie wurde eine Reproduzierbarkeitsstudie unter Verwendung eines Panels aus DNA-Targets von *Chlamydia-trachomatis* und klinischen Proben durchgeführt, die im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID positiv oder 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-ID.

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 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 99,9 %ige Übereinstimmung (1151/1152) erzielt. Bei den erwarteten negativen Ergebnissen wurde eine Übereinstimmung von 99,6% erzielt (287/288). Die Übereinstimmung insgesamt betrug demnach 99,9 % (1438/1440), bei einem 95 %igen Konfidenzintervall von 99,5 - 99,9 und Kappa = 0,996. 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 CT-ID in einer Multicenterstudie.

Target-Nr.	Ort 1		Ort 2		Ort 3		Ort 4		Insgesamt		
	\bar{X} RLU /CO	Übereinstimmung (%)	\bar{X} RLU /CO	Übereinstimmung (%)	\bar{X} RLU /CO	Übereinstimmung (%)	\bar{X} RLU /CO	Übereinstimmung (%)	\bar{X} RLU /CO	Ermittelt/erwartet	Übereinstimmung (%)
1	3,7	100	3,2	100	4,1	100	4,2	100	3,8	144/144	100
2	6,7	100	6,0	100	7,4	100	9,8	100	7,5	144/144	100
3	34,2	100	29,3	100	38,6	100	42,8	100	36,2	144/144	100
4	61,9	100	55,0	100	69,4	100	79,1	100	66,4	144/144	100
5	2,7	100	2,5	100	3,2	100	3,4	100	3,0	144/144	100
6	6,4	100	5,4	100	7,4	100	7,4	100	6,6	144/144	100
7	13,9	100	12,0	100	16,0	100	16,3	100	14,5	144/144	100
8	17,3	100	14,8	100	19,2	97,2	23,2	100	18,6	143/144	99,3
9	0,3	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,3	100	0,3	97,2	0,3	100	0,2	100	0,3	143/144	99,3
GESAMT										1438/1440	99,9

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

Tabelle 10. Studienergebnisse zur Reproduzierbarkeit des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID.

Testlabor	n	Ermittelt/erwartet			Übereinstimmung (%)		
		Positiv			Alle Proben		Außer vorbehaltliche Proben
		Negativ	Uneindeutig	Positiv ($\geq 2,5$)	@1,0 Grenzwert*	@2,5 Grenzwert	@2,5 Grenzwert
1	25	13	7	5	25/25 (100%)	18/25 (72%)	18/18 (100%)
2	25	13	3	9	25/25 (100%)	22/25 (88%)	22/22 (100%)
3	25	13	2	10	25/25 (100%)	23/25 (92%)	23/23 (100%)
Alle Testlabors kombiniert	75	39	12	24	75/75 (100%)	63/75 (84%)	63/63 (100%)

*Dieselben Werte wurden bei der Interpretation der Ergebnisse bei einem Grenzwert von 2,5 als "vorbehaltlich positiv" festgestellt.

Tabelle 11. Ergebnisse des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID, statistischer Überblick (Grenzwert von 1,0).

Statistischer Wert	Testlabor 1	Testlabor 2	Testlabor 3	Testlabor 4
Empfindlichkeit	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

*Die Zahlenangaben in Klammern zeigen die 95 %-Konfidenzintervalle an.

Beim Routine-Labortest würden die in Tabelle 11 genannten vorbehaltlichen Proben, von denen alle niederkonzentrierte CT-Organismen ($\sim 5 \times 10^4$ Organismen/ml) enthielten, gemäß Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ dieser Gebrauchsanweisung als vorbehaltlich positiv interpretiert werden. Der Assay demonstriert somit seine Fähigkeit zum Nachweis von CT-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 CT-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.

Testlabor	ID der Reihe	Ergebnis im DNA-Test <i>digene</i> HC2		
		CT/GC		Erwartetes Ergebnis
		RLU/CO	Interpretation	
1	1	3,63	POS.	POS.
	2	0,14	NEG.	NEG.
	3	0,17	NEG.	NEG.
	4	0,14	NEG.	NEG.
	5	0,21	NEG.	NEG.
2	1	1,79	ÄQUIV.*	POS.
	2	0,11	NEG.	NEG.
	3	0,10	NEG.	NEG.
	4	0,09	NEG.	NEG.
	5	0,14	NEG.	NEG.
3	1	3,24	POS.	POS.
	2	0,15	NEG.	NEG.
	3	0,14	NEG.	NEG.
	4	0,14	NEG.	NEG.
	5	0,13	NEG.	NEG.
4	1	1,87	ÄQUIV.*	POS.
	2	0,15	NEG.	NEG.
	3	0,53	NEG.	NEG.
	4	0,14	NEG.	NEG.
	5	0,15	NEG.	NEG.

*Als vorbehaltlich positiv interpretiert.

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-ID 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 CT-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. Zwei dieser Labors lieferten beim Initialtest brauchbare Ergebnisse. In einem Labor traten hingegen Schwierigkeiten auf, die aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Assay-Technik zurückzuführen ist. Hervorgerufen wurden diese durch einen technischen Fehler aufgrund falscher oder unzureichender Schulung. Das Laborpersonal, das die Untersuchung in diesem Labor durchführte, war in der sachgemäßen Anwendung der Assay-Technik geschult worden, hatte jedoch seit über 6 Monaten keinen DNA-Test *digene* HC2 CT-ID durchgeführt.

Tabelle 13 zeigt die Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID einschließlich des Labors, bei dem es technische Probleme gab. Das Laborpersonal wurde einer weiteren Schulung zur sachgemäßen Anwendung der Assay-Technik unterzogen, und der Test wurde wiederholt. Tabelle 14 enthält Genauigkeitsdaten, die eine deutliche Verbesserung in der Assay-Leistung aufweisen.

Tabelle 13. Geräteinterne und geräteübergreifende Genauigkeitsschätzungen sowie Genauigkeitsschätzungen innerhalb eines Assays und auf den Gesamtversuch bezogen für RLU/CO je nach Test und Target vor Wiederholung der Schulung des Laborpersonals.

Panelteil	n	Mittelwert	Geräteintern		Geräteübergreifend		Assay-intern		Gesamt	
			(SD*)	VK (%)	(SD)	VK (%)	(SD)	VK (%)	(SD)	VK (%)
1	54	17,6152	2,7418	15,5647	0,6011	3,4123	45,8628	260,3593	53,8172	305,5160
2	54	6,9076	0,8102	11,7297	0,2198	3,1819	17,9588	259,9861	20,9987	303,9941
3	54	3,0293	0,0969	3,1981	0,0930	3,0685	0,6870	22,6801	0,6739	22,2459
4	54	5,4674	0,3348	6,1231	0,1485	2,7156	10,0455	183,7341	11,4415	209,2673
5	54	13,6956	0,4045	2,9536	0,5280	3,8555	1,7475	12,7599	1,8065	13,1904
6	54	16,9526	0,7011	4,1359	0,6187	3,6497	22,1095	130,4199	25,9379	153,0027

* SD = Standardabweichung

Die Genauigkeitsergebnisse für alle Labore zusammen sind Tabelle 14 zu entnehmen. Was aus der Tabelle nicht hervorgeht, ist, dass die qualitativen Ergebnisse nach Schulung aller technischen Assistent(inn)en in der sachgemäßen Durchführung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID zu 100 % (54/54) (93,4%-100% 95% KI) mit den erwarteten Ergebnissen in allen drei Laboren übereinstimmten.

Tabelle 14. Geräteinterne und geräteübergreifende Genauigkeitsschätzungen sowie Genauigkeitsschätzungen innerhalb eines Assays und auf den Gesamtversuch bezogen für RLU/CO je nach Test und Target nach Wiederholung der Schulung des Technikers.

Panelteil	n	Mittelwert	Geräteintern		Geräteübergreifend		Assay-intern		Insgesamt	
			(SD*)	VK (%)	(SD)	VK (%)	(SD)	VK (%)	(SD)	VK (%)
1	54	0,1441	0,0224	15,5507	0,0000	0,0000	0,0603	41,8765	0,0629	43,6874
2	54	0,1256	0,0212	16,8771	0,0000	0,0000	0,0210	16,7125	0,0234	18,6069
3	54	2,7720	0,0996	3,5933	0,0888	3,2046	0,4732	17,0719	0,4749	17,1332
4	54	1,8643	0,0647	3,4683	0,0635	3,4051	0,4015	21,5358	0,3956	21,2227
5	54	13,2050	0,4129	3,1266	0,5281	3,9989	1,7018	12,8873	1,6604	12,5743
6	54	7,8674	0,2725	3,4633	0,3946	5,0157	1,5361	19,5250	1,5118	19,2160

* SD = Standardabweichung

Die für die niedrigkonzentrierte CT-Organismen enthaltenden Panelproben 3 und 4 festgestellten RLU/CO-Werte lagen innerhalb oder nahe des uneindeutigen Bereichs des Assays von 1,0-2,5.

In diesen Datenanalysen wurden alle dieser RLU/CO-Werte, die im uneindeutigen Bereich lagen oder den Wert 2,5 überschritten, positiv interpretiert.

Mit dem DML 2000 wurde bei QIAGEN zur Bestimmung der Gesamtgenauigkeit des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID eine weitere Genauigkeitsstudie durchgeführt. 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 CT-ID für alle 5 Untersuchungstage sind in Tabelle 15 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; 97,0 - 100 %, 95%-KI).

Tabelle 15. Gesamtgenauigkeit für DNA-Test *digene* HC2 CT-ID.

Panelteil	n	(Mittelwert rt			Mittelwert rt - 2 x		Mittelwert + 2 x SD
		RLU/CO)	SD	VK (%)	SD		
1	120	0,15	0,0326	21,24	0,09	0,22	
2	120	0,16	0,0479	29,25	0,07	0,26	
3	120	3,07	0,7078	23,05	1,66	4,49	
4	120	4,00	0,5585	13,97	2,88	5,12	
5	120	11,61	1,6955	14,60	8,22	15,00	
6	120	12,01	1,9818	16,50	8,05	15,98	

GENAUIGKEIT MIT PRESERVCYT-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 CT (Serovar D, ATCC VR885) präpariert, um das in Tabelle 16 dargestellte Panel zu schaffen:

Tabelle 16. Zusammensetzung des Genauigkeitspanels.

Bulkproben-	Panelteile*	Erwartetes Ergebnis des DNA-Tests <i>digene</i> HC2 CT/GC	Ungefährer RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Schwach CT-positiv	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Mäßig CT-positiv	~10
C	5N, 11N	Negativ	~0,20
D	6N, 12N	Stark negativ	~0,70

*Die Proben-ID gibt den bekannten Status von *C. trachomatis* an [positiv (P) oder negativ (N)]

Gemäß der NCCLS-Richtlinie EP-12A für die Bewertung qualitativer *In-Vitro*-Diagnostiktests wurden die Panelteile 6N und 12N, die beide aus der Bulkprobe „D“ stammten, eingeschlossen, um die Genauigkeit unmittelbar unter dem Grenzwert von 1,0 RLU/CO für einen negativen Assay zu bestimmen.

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

Tabelle 17. Qualitative Ergebnisse pro Bulkprobe – DNA-Test *digene* HC2 CT-ID

Bulkproben-Pool	CT-positiv n (%)	Uneindeutig n (%)	Negativ n (%)	Insgesamt
Negativ (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Stark negativ (6N, 12N)	0 (0,0)	12 (11,2)	90 (88,8)	108
Negativ insgesamt	0 (0,0)	12 (5,6)	204 (94,4)	216
Schwach CT-positiv (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Mäßig CT-positiv (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Positiv insgesamt	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

Tabelle 18. Standardabweichungen (SD) und Variationskoeffizienten (VK) für die Genauigkeit in verschiedenen Labors bzw. an verschiedenen Tagen: DNA-Test *digene* HC2 CT-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	0,215	0,038	0,020	0,010	0,037	0,058	27,0
Stark negativ (6N, 12N)	108	0,648	0,304	0,210	0*	0	0,370	57,1
Mäßig CT-positiv (2P,3P,8P,9P)	216	12,64	1,444	0,733	1,013	1,070	2,189	17,3
Schwach CT-positiv (1P, 2P, 7P, 8P)	216	4,637	0,490	0,485	0,285	0,288	0,800	17,3

* Negative Abweichungen wurden auf Null gesetzt

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze) des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID wurde durch direkte Untersuchung von Lösungen eines nichtklinischen Panels aus 15 Serotypen von *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae* bestimmt. Für jeden Serotyp wurde eine Vierpunkt-Verdünnungsreihe mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID getestet, um die geschätzte Organismenbelastung der Lösung mit der höchsten Konzentration festzustellen, die im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID positiv war. Die Konzentration jedes Targettyps wurde gemäß der Gebrauchsanweisung zum DNA-Test *digene* HC2 CT-ID dreifach getestet.

Die Nachweisgrenze für jeden Chlamydien-Serotyp ist in Tabelle 19 zusammengefasst. Die angegebene Nachweisgrenze war die Lösung jedes Serotyps, der innerhalb des Ambivalenzbereichs oder über dem Ambivalenzbereichs des Assays von 1,0-2,5 RLU/CO festgestellt wurde. Die Nachweisgrenze lag in Abhängigkeit vom getesteten Serotyp zwischen 1.000 und 500.000 EKs/ml. Der Nachweis von 50 bis 25.000 EKs in jedem Test entspricht 1.000 bis 500.000 EKs in der Originalprobe (pro ml STM).

Die verbreitetsten CT-Serotypen in den Vereinigten Staaten bei symptomfreien Patientinnen unter 30 Jahren sind E, I und D (geordnet nach Häufigkeit).²³ Bei Patientinnen zwischen 17 und 68, die eine städtische gynäkologische Station aufsuchten, herrschten die CT-Serotypen F, E und G vor (geordnet nach Häufigkeit). Wichtig ist hier, dass die untere Nachweisgrenze des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID für alle der verbreitetsten CT-Serotypen, außer Serotyp E, 50 EKs/Assay betrug. Serotyp E hat wie oben beschrieben eine höhere Nachweisgrenze (2500 EKs/Assay). Die Autoren der vorliegenden Arbeit gehen davon aus, dass bestimmte Serotypen mit symptomatischen (Serotyp G) und bestimmte Serotypen mit asymptomatischen (Serotypen D und I) Infektionen in Verbindung zu bringen sind. Auch für diese Serotypen ergab der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID eine niedrigere Nachweisgrenze von 50 EKs/Assay.

Tabelle 19. Überblick über die Nachweisgrenzen für die Empfindlichkeit von CT-Serotypen.

Serotyp	Nachweisbare Konzentration	
	EKs/ml	EKs/Test
A	1000 - >10.000	50 - >500
B	10.000 – 100.000	500 - 5000
Ba	5000 – 50.000	250 - 2500
C	10.000	500
D	1000 – 10.000	50 - 500
E	50.000	2500
F	1000	50
G	1000 - 10.000	50 - 500
H	10.000 – 100.000	500 - 5000
I	1000 – 10.000	50 - 500
J	5000 – 500.000	2500 – 25.000
K	20.000	1000
L1	2000	100
L2	2000 – 20.000	100 - 1000
L3	10.000	500

ZUSÄTZLICHE ÜBERLEGUNGEN ZU PRESERVCYT-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 ihrer Verwendung im DNA-Test *digene* HC2 CT-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 CT-ID abzuschätzen. Um den potenziellen Einfluss der Zentrifugation auf die analytische Empfindlichkeit abzuschätzen, wurden achtundachtzig (88) Paare DNA-negativer *C. trachomatis*-Proben in STM und PreservCyt-Lösung mit gleichen Mengen an CT-Organismen (Serotyp G) präpariert. Die gepaarten Proben wurden getestet und die analytische Empfindlichkeit wurde durch Vergleich der gemessenen mittleren RLU/CO-Werte abgeschätzt [(PreservCyt:STM) x 100].

Ein gepaarter T-Test der Daten in Tabelle 20 zeigt, dass die analytische Empfindlichkeit des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweist ($p = 0,33$), wenn Zervixproben in PreservCyt-Lösung oder STM getestet werden.

Tabelle 20. Vergleich der analytischen Empfindlichkeit – DNA-Test *digene* HC2 CT-D – Gepaarte Proben in PreservCyt-Lösung und STM.

	DNA-Test <i>digene</i> HC2 CT-ID RLU/CO	
	STM	PreservCyt
Probenanzahl	88	88
Mittelwert RLU/CO	3,38	3,48
Median RLU/CO	3,41	3,44
Standardabweichung	0,41	0,54
Max. RLU/CO	4,42	5,01
Min. RLU/CO	2,44	2,27

Eine zusätzliche Studie mit gepaarten, simulierten Proben lieferte einen ähnlichen Vergleich. Patientenproben in PC-Lösung von einem nicht zu QIAGEN gehörenden Testlabor wurden mithilfe des DNA-Tests *digene* HC2 CTID gescreent, um positive Proben zu identifizieren. Diese positiven Patientenproben wurden kombiniert, so dass 10 konzentrierte PC-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 Lösung. Beide Aliquots wurden mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID mit folgenden Ergebnissen getestet:

Ein gepaarter T-Test der Daten in Tabelle 21 zeigt, dass die analytische Empfindlichkeit des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweist ($p = 0,98$), wenn Zervixproben in PreservCyt Lösung oder STM getestet werden.

Table 21. Vergleich der analytischen Empfindlichkeit – DNA-Test *digene* HC2 CT-ID - Simulierte (gepoolte) Patientenproben in PreservCyt-Lösung gepaart mit Proben in STM.

	DNA-Test <i>digene</i> HC2 CT-ID	
	STM (Aliquot A)	PreservCyt (Aliquot B)
Probenanzahl	10	10
Mittelwert RLU/CO	30,92	24,90
Median RLU/CO	3,56	3,00
Standardabweichung	47,27	38,91
Max. RLU/CO	125,62	115,08
Min. RLU/CO	1,15	1,26

ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurde eine Reihe im weiblichen Anogenitaltrakt potenziell auffindbarer Bakterien, Viren, Plasmide sowie humanes Zellmaterial und Blutprodukte untersucht, um festzustellen, ob es mit den für den DNA-Test *digene* HC2 CT-ID verwendeten Sonden zu Kreuzreaktivität kommen würde. Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Mikroorganismen bei Konzentrationen von 10^5 und 10^7 Organismen pro ml und, soweit möglich, mit 10^9 Organismen pro ml untersucht. Gereinigte DNAs von Viren und Plasmiden wurden bei einer Konzentration von 4 ng/ml bestimmt.

Die mit DNA-Test *digene* HC2 CT-ID getesteten Bakterien sind in Tabelle 22 dargestellt. Alle Bakterien, außer *Chlamydia psittaci*, wurden mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID negativ getestet. *Chlamydia psittaci* kann auf der Haut einiger Personen nachgewiesen werden, die Umgang mit Vögeln haben, wurden jedoch nicht im Anogenitaltrakt nachgewiesen werden.²⁴ Folglich ist nicht zu erwarten, dass die zwischen *Chlamydia psittaci* und der CT-Sonde beobachtete Kreuzreaktivität für anogenitale Proben zu einem widersprüchlichen klinischen Ergebnis führen würde.

Die CT-Sonde hat nicht mit *Neisseria gonorrhoeae* kreuzreagiert und somit gezeigt, dass die Sonde im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID nicht mit Targets der GC-ID-Sonde im DNA-Test *digene* HC2 GC-ID kreuzreagiert.

Tabelle 22. Auf Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen:

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

^a Die getesteten Konzentrationen betragen 1x10⁵, 1x10⁷ und 1x10⁸ Organismen/ml.

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

^c Die getesteten Konzentrationen betragen 2x10⁵, 2x10⁷ und 2x10⁸ Organismen/ml.

^d Die getesteten Konzentrationen betragen 2x10⁷, 2x10⁸ und 2x10⁹ Organismen/ml.

^e Die getesteten Konzentrationen betragen 1x10⁵ und 1x10⁶ Organismen/ml.

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

Die mit dem *digene* HC2 CT-ID DNA-Test getestete virale DNA bzw. Plasmid-DNA bzw. das Humanserum sind in Tabelle 23 vorgestellt. Es wurde bei den Plasmidvektoren pBR322, pGEM[®] 3Zf und pGEM[®] 3Zf(-) eine wahrscheinliche Kreuzreaktivität beobachtet. Über das Vorhandensein homologer Sequenzen in humanen Genitalproben wurde berichtet; bei Vorliegen hoher bakterieller Plasmid-Konzentrationen sind falsch-positive Ergebnisse möglich. Von 106 mittels des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID positiv bewerteten klinischen Proben unter einer Patientenpopulation von 1818 Patienten waren zwei pBR322-positiv identifiziert; eine Probe war allerdings laut CT-Kultur und DFA positiv, eine weitere laut CT DNA PCR. So kam es in diesen 106 klinischen Proben aufgrund homologer Sequenzen von pBR322, pGEM3Z und pGEM3Z(-) zu keinen falsch-positiven Ergebnissen. Die Häufigkeit, mit der diese Plasmide in weiblichen Genitalproben gefunden wurden, wurde nicht vollständig bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine repräsentative Patientengruppe. Das bedeutet, dass diese Ergebnisse die Verbreitung von pBR322 nicht unbedingt für alle getesteten Patientengruppen wiedergeben.

Tabelle 23. Auf Kreuzreaktivität getestete virale oder Plasmid-DNA bzw. Humanserum.

Cytomegalovirus	Humanes Vollblut
Epstein-Barr Virus	Humanes Papillomavirus, Typ 6
Hepatitis-B-Surface-Antigen-positives Serum	Humanes Papillomavirus, Typ 11
Herpes simplex I	Humanes Papillomavirus, Typ 16
Herpes simplex II	Humanes Papillomavirus, Typ 18
Humane Epithelzellen	pGEM®3Z
Human Immunodeficiency Virus (HIV) ^a	pGEM®3Zf(-)
Genomische Human-DNA	pBR322
Humane Plazenta-DNA	SV40

^a Die getesteten Konzentrationen betragen 2×10^6 , 2×10^7 und 2×10^8 Organismen/ml.

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 CT-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 von 1 % und 5 % zu negativen und positiven Proben in STM (klinische Proben-Pools und nichtklinische Proben) hinzugefügt. Mit keiner der vier Substanzen und bei keiner der Konzentrationen wurden falsch positive Ergebnisse festgestellt. Eine Untersuchung nicht definierter Substanzen in einer Population von 117 negativer klinischer Proben hat gezeigt, dass nicht definierte Substanzen, das vom *digene* HC2 CT-ID DNA-Test nachgewiesene Signal der *Chlamydia-trachomatis*-DNA leicht, wenn auch nicht wesentlich erhöhen können. Diesem Effekt braucht nicht weiter nachgegangen zu werden, da er das Gegenteil einer Hemmwirkung darstellt.

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 das *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 Conversion Buffer (SCB)¹ enthalten sein. Daher wurde eine analytische Studie durchgeführt, um die analytische Leistung des DNA-Tests *digene* HC2 CT-ID bei verschiedenen SCB-Mengen zu überprüfen. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Plasmid-CT-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.

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

Die Reproduzierbarkeit des DNA-Tests *digene* HC2 Ct-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 in 4 Wiederholungsbestimmungen an jedem von 5 Tagen für insgesamt 20 Wiederholungsbestimmungen pro Probe getestet. Die Untersuchung wurde mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID durchgeführt. Der RLU/CO-Mittelwert, die 95%-Konfidenzintervalle über dem mittleren (KIs) und prozentuale Anteile positiver Proben wurden für jede Probe über fünf Tage berechnet und sind Tabelle 24 zu entnehmen.

¹ 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.

Tabelle 24. Mittlerer RLU/CO-Wert mit Konfidenzintervallen und prozentualer Anteil der positiven Ergebnisse im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID (in absteigender Reihenfolge nach mittlerem RLU/CO-Wert)

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

Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr über dem Cutoff waren zu 98 % der Zeit positiv, während Proben mit einem mittleren RLU/CO von 20 % oder mehr unter dem Cutoff in 100 % der Zeit negativ waren. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass Proben mit 20% oder mehr über oder unter dem Grenzwert mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID i. d. R. konsistente Ergebnisse liefern.

Proben mit Werten nahe den Grenzwerten des Assays blieben vorwiegend positiv oder negativ; solche, die über dem Grenzwert des Assays (jedoch innerhalb der 20 %) lagen, blieben zu 70 % der Zeit positiv. Proben unter dem Grenzwert (jedoch innerhalb der 20 %) blieben zu 79 % der Zeit negativ.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der DNA-Test *digene* HC2 CT-ID bei mit STM entnommenen klinischen Proben, deren RLU/CO-Werte innerhalb von 20 % des Grenzwertes liegen, reproduzierbare Ergebnisse liefert.

BISHERIGE VERFAHRENSWEISE

Früher wurde zur Gewinnung von Daten und zur Bestimmung der Leistungsmerkmale des DNA-Tests *digene* HC2 CT-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 wurden die Ergebnisse klinischer Evaluierungen in insgesamt 81 mit dem DNA-Test *digene* HC2 CT-ID durchgeführten Assays zusammengestellt (vgl. Tabelle 25). Die Ergebnisse zeigten, dass der mittlere prozentuale VK für diese 81 Assays bei 6,4 % lag und kein Mittelwert eines Negativkalibrators den Wert von 150 RLU überschritt. Eine Reproduzierbarkeit des Positivkalibrators über 25 % VK wurde nur für 2 der insgesamt 81 Assays beobachtet (2,5 %). Kein VK (%) des Assays blieb über 25 %, womit gezeigt wurde, dass die Assays gültig waren.

Tabelle 25. Leistung der Positiv- und Negativkalibratoren - Gesamtdaten aus der klinischen Multicenterstudie und der Genauigkeitsstudie (n = 81 Assays)

Gerät	Anzahl Assays	Mittelwert S/N-Quotient	Kontroll- oder Kalibratorotyp	Durchschnitt der errechneten Mittelwerte (RLU)		Mittelwert des errechneten VK (%) Um	
				Drei Replikate	Um Ausreißer bereinigt	Drei Replikate	Um Ausreißer bereinigt
DML2000	9	5,49	Negativ	44,89	39,15	26,10	13,75
			Positiv	231,41	231,41	7,35	7,35
MLX*	72	5,33	Negativ	0,075	0,074	16,59	12,90
			Positiv	0,265	0,263	6,34	4,86

*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 1231 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 CT-ID getestet. Die Ergebnisse dieser Bewertung sind in Tabelle 26 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 26. Zusammenfassung der statistischen Daten zur Übereinstimmung im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID von gepaarten Zervixproben in STM und PreservCyt-Lösung.

Patientengruppe zur Datenanalyse	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	0,92 (0,88; 0,96)	92,16 (94/102) 85,13; 96,55	99,36 (1092/1099) 98,69; 99,74	98,75 (1186/1201) 97,95; 99,30
Nachtest-Algorithmus für Daten aus Ambivalenzbereich*	0,90 (0,86; 0,94)	90,09 (100/111) 82,96; 94,95	99,20 (1111/1120) 98,48; 99,63	98,30 (1211/1231) 97,50; 99,00

*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 CT-ID wurde als Teil einer klinischen Studie abgeschätzt, um zu zeigen, dass übereinstimmende Ergebnisse im DNA-Test *digene* HC2 CT-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 27 dargestellt.

Tabelle 27. Prozentuale Übereinstimmung im DNA-Test *digene* HC2 CT-ID pro Labor.

Testlabor	Ermittelt/ Erwartet ^a	% Übereinstimmung (95%-KI)
1	60/60	100 (94,04-100)
2	60/60	100 (94,04-100)
3	60/60	100 (94,04-100)
Testlabors insgesamt	180/180	100 (97,97-100)

*20 Teile x 3 Tage x 3 Testlabors.

LITERATUR

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

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

LEITFADEN ZUR FEHLERSUCHE

DNA-TEST <i>digene</i> HC2 CT-ID		
FEHLER	MÖGLICHE URSACHEN	MASSNAHMEN
Falscher oder kein Farbumschlag während der Denaturierung.	Kein Denaturierungsreagenz hinzugefügt oder Denaturierungsreagenz nicht sachgemäß angesetzt.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verifizieren, dass das Denaturierungsreagenz den Indikator-Farbstoff enthält und eine dunkel purpurrote Farbe aufweist. 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.
	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 könnte ungewöhnlich sauer sein, wodurch der erwartete Farbumschlag verhindert wird. 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.
Qualitätskontrolle ergibt falsche Ergebnisse	Falsches Software-Protokoll für den Test gewählt	<ul style="list-style-type: none"> • 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.
	Platzierung von QC CT und QC GC vertauscht	Proben erneut testen.
Falschen Farbumschlag während der Hybridisierung beobachtet.	<ul style="list-style-type: none"> • Unzureichendes Mischen des Sondengemisches mit denaturiertem Kalibrator, Qualitätskontrollen und/oder Proben. • Kein Sondengemisch zugegeben • Falsches Reagenzvolumen zugegeben 	Schütteln Sie die Hybridisierungsmikrotiterplatte weitere 2 Minuten. Existieren Vertiefungen, die immer noch purpurrot oder grau sind, geben Sie weitere 25 µl des Sondengemischs zu und mischen Sie gut. Wenn nach der Sondenzugabe und erneutem Mischen die erwartete 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.
Assay erfüllt nicht die Verifizierungskriterien für die Assay-Kalibrierung. In Positivkalibrator, Qualitätskontrollen oder Proben kein Signal beobachtet.	Dem Sondenverdünnungsmittel wurde keine Sonde zugefügt.	Das CT-Sondengemisch wie in der 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 zur denaturierten Probe Hybridisierungsmikrotiterplatte abdecken, Rotationsschüttler I auf 1100 ± 100 xg und 3 ± 2 Minuten einstellen und wie unter Testverfahren, Abschnitt „Hybridisierung“, Schritt 6, in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben schütteln. Es muss in jeder Vertiefung ein Farbumschlag von purpurrot nach gelb auftreten.

DNA-TEST <i>digene</i> HC2 CT-ID		
FEHLER	MÖGLICHE URSACHEN	MASSNAHMEN
	Falsche Dauer oder Temperatur des Hybridisierungsschrittes	60 ± 5 Minuten bei 65 ± 2°C hybridisieren (siehe Gebrauchsanweisung unter Testverfahren, Abschnitt Hybridisierung, Schritt 7). Temperatur des Mikrotiterplatteninkubators I überprüfen. Sicherstellen, dass der Inkubator auf die korrekte Temperatur eingestellt ist und 1 Stunde vor Einsatz vorgeheizt wurde.
	Unzureichendes Mischen während des Capture-Schrittes	Mit Rotationsschüttler I bei 1100 ± 100 xg und 60 ± 5 Minuten bei 20-25 °C wie in Testverfahren, Abschnitt Hybrid Capture, Schritt 4 dieser Gebrauchsanweisung beschrieben, schütteln. 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"> • Es wurde die falsche Menge an Nachweisreagenz 1 zugegeben. • Es wurde nicht die vorgegebene Zeit inkubiert. 	<p>75 µl Nachweisreagenz 1 mit einem 8-Kanal-Dispenser in jede Vertiefung pipettieren.</p> <p>30 - 45 Minuten lang bei 20 – 25 °C inkubieren.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Es wurde die falsche Menge an Nachweisreagenz 2 zugegeben. • Es wurde nicht die vorgegebene Zeit inkubiert. 	<p>75 µl Nachweisreagenz 2 mit einem 8-Kanal-Dispenser in jede Vertiefung pipettieren.</p> <p>15 - 30 Minuten lang bei 20 – 25 °C inkubieren.</p>
	Störung im Luminometer oder falsche Programmierung.	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.
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	<ul style="list-style-type: none"> • Entweder wurde kein Denaturierungsreagenz oder das falsche Reagenzvolumen zugefügt oder das Denaturierungsreagenz wurde mit den Proben, Kalibratoren oder Qualitätskontrollen nur unzureichend gemischt. • Wasserbad hat falsche Temperatur und unzureichenden Füllstand. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vor Zufügen des Denaturierungsreagenzes verifizieren, dass die Multipette exakte 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. Geschwindigkeitskalibrierung des Multi-Specimen Tube Vortexers 2 überprüfen. • Füllstand und Temperatur des Wasserbads überprüfen.
	<ul style="list-style-type: none"> • Lichtleck im Luminometer. • Beschädigte Dichtung • Tür nicht richtig geschlossen. 	Hintergrundmesswerte des Luminometers überprüfen durch Messen einer leeren Mikrotiterplatte. Höhere Werte als 50 RLUs deuten darauf hin, dass eine undichte Stelle vorliegen könnte. Näheres hierzu 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.
	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

DNA-TEST <i>digene</i> HC2 CT-ID		
FEHLER	MÖGLICHE URSACHEN	MASSNAHMEN
	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 darf nach dem Spülen keine rosa Farbe mehr sichtbar sein. Anleitungen zum Testen auf Kontamination oder Funktionsstörungen bitte der Gebrauchsanweisung für den automatischen Plattenspüler 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.
	Abtropfen der Hybridisierungslösung auf der gleichen Stelle der Kimtowels-Wischtücher oder entsprechenden fusselfarmen Papiertüchern Verwendung falscher Saugtücher.	Nicht zwei Mal an derselben Stelle des Kimtowels-Wischtuches oder des entsprechenden fusselfarmen Papiertuches abtupfen. Kimtowels-Wischtücher oder gleichwertige fusselfarme Papiertücher zum Abtupfen verwenden.
	CT-Qualitätskontrollmaterial als Positivkalibrator benutzt. Assayvalidierung erfolglos	Auf richtige Platzierung von positivem Kalibrator und Kontrollen achten.
Niedrige PC/NC-Quotienten oder hohe Zahl schwach-positiver Proben (>20% der Gesamtproben) bei einem RLU/CO-Quotienten <2.0. Der Assay entspricht möglicherweise nicht den Validierungskriterien	Unzureichende Probenvorbereitung	Das entsprechende Volumen des Denaturierungsreagenzes zufügen und mittels Vortexen gründlich mischen. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse bei mindestens 5-sekündigen Vortexen (dies bei Verwendung des Multi-Specimen Tube-Vortexers 2; bei manuellem Vortexen mindestens 5 Sekunden und Röhrchen ein Mal umdrehen) sicherstellen, dass die gesamte Innenfläche des Röhrchens gespült wird. 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.
	Unzureichendes Mischen der Sonde, oder dem Assays wurde eine ungenügende Sondenmenge zugefügt	Die Sondengemische wie beschrieben vorbereiten. Durch Vortexen gründlich mischen und darauf achten, dass ein sichtbarer Wirbel produziert wird. Das Sondengemisch muss zum Erreichen der erforderlichen Genauigkeit mittels eines Mehrkanal- oder Repeating-Dispensers in die Vertiefungen zu geben.
	Den Vertiefungen der Hybridisierungsmikrotiterplatte wurde ein unzureichendes Volumen des Sondengemischs zugegeben.	Vor Zufügen des Sondengemischs 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 Sondengemisch geben. Vor Zufügen des Sondengemischs zu den Vertiefungen der Hybridisierungsmikrotiterplatte sicherstellen, dass der 8-Kanal-Dispenser die genaue Menge abgibt. Nach dem Zufügen und gründlichen Mischen des Sondengemischs 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.

DNA-TEST <i>digene</i> HC2 CT-ID		
FEHLER	MÖGLICHE URSACHEN	MASSNAHMEN
	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 Bedienungsanleitung 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
Reihe positiver Proben mit annähernd gleichen RLU-Werten	Kontamination von Capture-Mikrovertiefungen während der Assay-Durchführung.	Die Capture-Mikrotiterplatte während aller Inkubationen abdecken. Während der Durchführung des Assays dürfen die Mikrotiterplatten-Vertiefungen keine Spritzer abbekommen. 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 Laborstaub usw. vermeiden.
	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 <i>Bedienungsanleitung für den automatischen Plattenspüler</i> .
Großer Wertebereich für % VK zwischen den Wiederholungsbestimmungen	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 Denaturierungssinkubation 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.
	Unzureichende Spülbedingungen	Die Mikrovertiefungen mit Waschpuffer 6 mal gründlich spülen, indem die Mikrovertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder den automatische Plattenspüler verwenden und dabei die entsprechenden vorschriftsmäßigen Protokolle befolgen.
	Kontamination der Mikrovertiefungen mit Nachweisreagenz 1	Sicherstellen, dass alle Arbeitsflächen sauber und trocken sind. Bei der Verwendung des Nachweisreagenzes 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 CT-Sondenhybridisierung benutzt wird.	Der Denaturierungsschritt im Verfahren zur Probenbehandlung muss wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben durchgeführt werden. Unsachgemäßes Vortexen der Proben oder unsachgemäßes Umdrehen und Schütteln der Röhren 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-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren.
	Abtupfen auf derselben Stelle des Wischtuches über mehrere Reihen	Nicht erneut auf zuvor verwendeten Bereichen der Wischtücher abtupfen.
Falsch positive Ergebnisse aus bekannterweise negativen Proben.	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.

DNA-TEST <i>digene</i> HC2 CT-ID		
FEHLER	MÖGLICHE URSACHEN	MASSNAHMEN
	Kontamination der Mikrovertiefungen mit 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 darf 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 CT-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-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren.
	Unzureichende Probenvorbereitung	Das entsprechende Volumen des Denaturierungsreagenzes zufügen und mittels Vortexen gründlich mischen. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse bei mindestens 5-sekündigen Vortexen (dies bei Verwendung des Multi-Specimen Tube-Vortexer 2; bei manuellem Vortexen mindestens 5 Sekunden und Röhrchen ein Mal umdrehen) sicherstellen, dass die gesamte Innenfläche des Röhrchens gespült wird. 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-Sondenhybridisierung die Wände nicht berühren. Die Einzelheiten des Verfahrens bitte der Gebrauchsanweisung des HC2 Sample Conversion Kit entnehmen.
	Unzureichende Spülbedingungen	Die Mikrovertiefungen mit Waschpuffer 6 mal gründlich spülen, indem die Mikrovertiefungen jedes Mal bis zum Überfließen gefüllt werden oder den automatische Plattenspüler verwenden und dabei die entsprechenden vorschriftsmäßigen Protokolle befolgen.
Erhöhte RLU-Werte des Negativkalibrators (> 150 RLU). Die Leistung des übrigen Assays ist wie erwartet.	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>Hinweis: Beim Pipettieren des Nachweisreagenz 2 vorsichtig vorgehen um Kontaminationen zu vermeiden. Es müssen Handschuhe getragen werden und die Pipettenspitzen dürfen nicht mit der Arbeitsoberfläche in Kontakt kommen.</p>		
<p>Nachweisreagenz 2</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 75 µl aus dem geteilten Rest- bzw. Originalröhrchen des Nachweisreagenz 2 in eine leere Vertiefung einer Capture-Mikrotiterplatte geben. 2. 15 Minuten bei 20-25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. 3. Die Mikrotiterplatte in das Luminometer einlesen. <p>Hinweis: Das Testen von Nachweisreagenz 2 in Replikaten von 3 erlaubt eine optimale Leistungsüberprüfung.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 4. Der Kontrollwert des Nachweisreagenz 2 muss unter 50 RLU liegen. 5. Wenn die Werte des Nachweisreagenz 2 unter 50 RLU liegen, kann das Nachweisreagenz zur Wiederholung des Tests verwendet werden. 6. Falls eine Kontamination vorliegt, (> 50 RLU), einen neuen Kit verwenden und den Test wiederholen.
<p>Waschsystem bzw. Wasseranschluss</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 75 µl des Nachweisreagenz 2 in 4 leere Vertiefungen einer Capture-Mikrotiterplatte geben. • Die Vertiefungen mit 1-4 bezeichnen. • Vertiefung 1 dient als Kontrolle für das Nachweisreagenz 2. • Aus dem Behälter für Waschflüssigkeit 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 2 pipettieren. • Waschpuffer durch die Waschschräume laufen lassen. • 10 µl des Waschpuffers aus den Schläuchen in Vertiefung 3 pipettieren. • Etwas von dem Wasser, das zur Herstellung des Waschpuffers benutzt wird, nehmen. Von dem Wasser 10 µl in Vertiefung 4 pipettieren. • 15 Minuten bei 20-25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. • Die Mikrotiterplatte in das Luminometer einlesen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Der Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) muss unter 50 RLU liegen. • 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 dürfen den RLU-Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) um nicht mehr als 50 RLU überschreiten. • 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“.
<p>Automatischer Plattenspüler</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 75 µl des Nachweisreagenz 2 in 5 leere Vertiefungen einer Capture-Mikrotiterplatte geben. • Die Vertiefungen mit 1-5 bezeichnen. • Vertiefung 1 dient als Kontrolle für das Nachweisreagenz 2. • Aus dem mit „Wash“ bezeichneten Behälter des Plattenspülers 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 2 geben. • Aus dem mit „Rinse“ bezeichneten Behälter des Plattenspülers 10 µl Spülflüssigkeit in Vertiefung 3 geben. • Den Schalter „Prime“ auf der Tastatur des Plattenspülers betätigen, damit Waschpuffer durch die Leitungen fließen kann. • Aus dem Behälter 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 4 pipettieren. • Den Schalter „Rinse“ auf der Tastatur des Plattenspülers betätigen, damit Spülflüssigkeit durch die Leitungen fließen kann. • Aus dem Behälter 10 µl des Waschpuffers in Vertiefung 5 pipettieren. • Abdecken und 15 Minuten bei 20-25 °C inkubieren. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. • Die Mikrotiterplatte in das Luminometer einlesen. 	<ul style="list-style-type: none"> • Der Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) muss unter 50 RLU liegen. • 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 dürfen den RLU-Wert der Kontrolle des Nachweisreagenz 2 (Vertiefung 1) um nicht mehr als 50 RLU überschreiten. • Werte, die mehr als 50 RLU über dem Wert der Kontrolle für das Nachweisreagenz 2 liegen sind ein Zeichen für eine Kontamination des Plattenspülers. • Siehe Gebrauchsanweisung des automatischen Plattenspülers, Kapitel Dekontamination.

QIAGEN-KONTAKTINFORMATIONEN

Verwenden Sie zur Kontaktaufnahme mit Ihrem örtlichen QIAGEN-Vertreter das in der Lieferung enthaltene Blatt „Kontaktinformationen“.

QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] und Rapid Capture[®] 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.

Anerkennung von Handelsmarken:

ThinPrep[®] und PreservCyt[®] : Hologic Corporation

Kimtowels[®]: Kimberly-Clark Corporation

Eppendorf[®] und Repeater[®]: Eppendorf-Netheler-Hinz

CDP-Star[®]: Tropix, Inc.

Parafilm[®]: American Can Co.

DuraSeal[®]: Diversified Biotech, Inc

Sarstedt[®]: SARSTEDT AG & Co.

pGEM[®]: Promega Corporation

VWR[®]: VWR International, Inc.

Corning[®]: Corning, Inc.

ZUSAMMENFASSUNG DNA-TEST *digene* HC2 CT-ID

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

(Die Behandlung von Proben in PreservCyt-Lösung wird im Abschnitt „Verfahren zur Vorbereitung von Proben in PreservCyt-Lösung“ beschrieben)	VERFAHREN	
	Manuelles Vortex-Verfahren	Verfahren mit Multi Specimen Tube Vortexer 2
	Platten-Anordnung erstellen Mikrotiterplatte zur Hybridisierung beschriften. Denaturierungsreagenz vorbereiten. ↓ Denaturierungsreagenz (Volumen entspricht der Hälfte des Probenvolumens) in die Qualitätskontrollen, Kalibratoren und Proben pipettieren. Jede Probe und Kontrolle 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 CT-Sondengemisch vorbereiten. ↓ ↓ ↓	Plattenlayout 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. ↓ Gestell mit Folie oder einem Verschlussdeckel abdecken. ↓ 10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit vortexen. ↓ 45 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Das CT-Sondengemisch vorbereiten. ↓ ↓
Hybridisierung	Verfahren mit dem Mikrotiterplatteninkubator I Denaturierte Proben gut mischen und dann 75 µl denaturierter Probe, Kontrolle oder denaturierten Kalibrators in die Mikrotiterplatten-Vertiefungen pipettieren. ↓ 10 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren. ↓ 25 µl CT-Sondengemisch in Mikrotiterplatten-Vertiefungen pipettieren. ↓ Die Hybridisierungsmikrotiterplatte auf einem bei 1100 ± 100 U/min eingestellten Rotationsschüttler 13 ± 2 Minuten schütteln. <i>Prüfen, dass alle Vertiefungen eine gelbe Farbe aufweisen (Proben in PreservCyt Lösung werden rosa).</i> ↓ 60 ± 5 Minuten bei 65 ± 2 °C inkubieren. ↓ Die Capture-Mikrotiterplatte vorbereiten. ↓	
Hybrid-Capture	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). ↓	
Hybridnachweis	75 µl Nachweisreagenz 25,40 mm 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 mittels des gewünschten Verfahrens spülen. ↓	
Spülen	Manuelles Spülverfahren Dekantieren und Capture-Mikrotiterplatte abtupfen (nähere Einzelheiten siehe Packungsbeilage). ↓ 6 mal spülen. ↓ Auf fusselfreien Papiertüchern abtupfen ↓	Verfahren mit dem automatischen Plattenspüler Die Platte auf den Spüler geben und zum Beginn „START/STOP“ drücken. Mit dem nächsten Schritt fortfahren. ↓ ↓ ↓
Signal-amplifikation	75 µl Nachweisreagenz 25,40 mm jede Vertiefung der Capture-Mikrotiterplatte pipettieren. Mit einem Plattendeckel abdecken. 15 - 30 Minuten bei 20 - 25 °C inkubieren. ↓	
Messung	Die Capture-Mikrotiterplatte im von QIAGEN zugelassenen Luminometer messen. ↓ Assay validieren und Probenergebnisse interpretieren.	