

Cervista™ HPV HR

REF 92-011, PRD-01560

**NUR FÜR DEN EXPORT.
NICHT ZUM VERKAUF IN DEN USA ODER KANADA.****BESTIMMUNGSGEMÄßER GEBRAUCH**

Für den Cervista HPV HR-Test sind zwei Verwendungszwecke vorgesehen:

1. Gemeinsam mit zytologischem Gebärmutterhalsscreening bei Frauen ab dem 30. Lebensjahr zur Lenkung der Patientenversorgung.
2. Zur Triagierung von Patientinnen mit atypischen Plattenepithelzellen ungeklärter Signifikanz (ASC-US) im Krebsabstrich, um die Notwendigkeit einer Kolposkopie zu bestimmen.

92-011-  96PRD-01560-  384 -15 °C
-30 °C

Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft:
Hologic Ltd.
Heron House Oaks Business Park
Crewe Road
Wythenshawe, Manchester
M23 9HZ, UK
Tel: +44 (0)161 946 2206
Fax: +44 (0)161 602 0995
Email: AuthorisedRepresentativeEurope@hologic.com

**Nicht in einem Kühlschrank/Kühlfach mit Abtauautomatik aufbewahren.
Vor Lichteinfall schützen.**

INHALTSVERZEICHNIS

BESTIMMUNGSGEMÄßER GEBRAUCH	1
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	3
ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS.....	4
TESTPRINZIP	4
IM LIEFERUNGSFANG ENTHALTENE REAGENZIEN	6
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	7
LAGERUNG UND HANDHABUNG	7
ZUSÄTZLICHE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	7
NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE, ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN	7
Verbrauchsmaterialien.....	7
Geräte.....	8
PROBENAHMEN, DNA-EXTRAKTION UND LAGERUNG ZUR UNTERSUCHUNG	8
TESTVERFAHREN FÜR DAS CERVISTA MTA-SYSTEM.....	8
MANUELLES CERVISTA HPV HR TESTVERFAHREN	9
Reaktionsverfahren.....	9
Datenerfassung	9
HINWEISE ZUM VERFAHREN UND VORSICHTSMASSNAHMEN ...	10
INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	10
TERMINOLOGIE.....	11
QUALITÄTSKONTROLLE.....	12
Negativkontrolle	12
HPV-Kontrollen.....	12
Testverifizierung	12
EINSCHRÄNKUNGEN.....	13
LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN	13
Leistung in der klinischen Prüfung	13
PRÄZISION	19
Leistung des Cervista HPV HR-Tests	21
FEHLERBEHEBUNG BEI MANUELLEM CERVISTA HPV HR TESTVERFAHREN	22
LEITFADEN ZUR FEHLERBEHEBUNG FÜR DAS CERVISTA MTA-SYSTEM.....	26
BIBLIOGRAPHIE	27

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ASC-US:	atypische Plattenepithelzellen ungeklärter Signifikanz
CIN:	zervikale intraepitheliale Neoplasie
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
FAM:	Carboxyfluorescein-Fluorophor
FRET:	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FOZ:	Fold over zero (Signal von Probe oder Kontrolle geteilt durch „No Target Control“-Signal)
gDNA:	genomische DNA
HIST2H2BE:	menschliches Histon-2-Gen, H2be-Gen
HPV:	humanes Papillomavirus
HR:	High-risk (Hohes Risiko)
Max:	Maximalwert
Min:	Minimalwert
MTA:	Medium Throughput Automation (Mittlere Durchsatzautomatisierung)
NTC:	No Target Control (Kontrolle ohne Zielsequenzen)
Oligo:	Oligonukleotid
Pap:	zytologischer Zervixabstrich nach Papanicolaou
Red:	Fluorophor Redmond Red
RFU:	Relative Fluorescence Unit (relative Fluoreszenzeinheit)

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

Hochgerechnet kommen jedes Jahr in den USA ca. 11.000 neue Fälle von invasivem Gebärmutterhalskrebs hinzu, über 3.500 Patientinnen versterben daran.¹ Im Frühstadium des Gebärmutterhalskrebses beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate 92 %, für alle anderen Stadien beträgt sie ca. 72 %.¹ Der Gebärmutterhalskrebs wird durch persistierende Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) verursacht.² Es gibt Hinweise darauf, dass der Gebärmutterhalskrebs, wenn für Nachweis und Behandlung von Präkanzerosen zytologische und HPV-Screeninguntersuchungen eingesetzt werden, in hohem Maße vermeidbar ist.

Von den mehr als 100 in der Literatur dokumentierten HPV-Typen infizieren ca. 40 den anogenitalen Bereich und werden sexuell übertragen. Von den sexuell übertragbaren HPV-Typen gelten inzwischen 14 onkogene Genotypen (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68) als High-Risk-Typen (HR), die Auslöser fast aller Gebärmutterhalskarzinome.^{1,2} Der Nachweis von High-Risk-HPV DNA in Verbindung mit einem unsicheren oder nicht eindeutigen Zytologieresultat (ASC-US) bedeutet für eine Frau ein erhöhtes Risiko auf eine zugrunde liegende zervikale intraepitheliale Neoplasie 2 oder 3 (CIN 2 oder CIN 3).^{4,6,7} Auch wenn CIN 3 bei nur 5 % der ASC-US-Fälle auftritt,⁵ stellt sie doch eine unmittelbare Vorstufe für einen Gebärmutterhalskrebs dar. Folglich ist dieser Nachweis für die Patientenversorgung extrem wichtig.² Daher ist es für den Arzt bei der Entscheidung, wer verstärkt überwacht bzw. behandelt werden sollte, ein wichtiges Hilfsmittel zur Erkennung der Frauen mit ASC-US-Zytologie, die eine High-Risk-HPV-Infektion haben.^{2,4,8,9}

Anfang 2002 wurden von verschiedenen medizinischen Fachgruppen in den USA Leitlinien zur Patientenversorgung veröffentlicht, die Empfehlungen aussprechen, wie Frauen nach Alter, dem Vorliegen zytologischer Abnormalitäten im Krebsabstrich sowie weiteren Faktoren auf Gebärmutterhalskrebs gescreent werden sollten.^{6,10,11} Diese Leitlinien empfehlen ein regelmäßiges Screening auf das Vorhandensein von High-Risk-HPV-Typen, in bestimmten Fällen in Verbindung mit einer Zytologie. Hauptsächliche Empfehlungen der jüngsten Fachleitlinien, der *2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests*, sind u. a.: 1) Screening von Frauen über 30 Jahren in Verbindung mit Zytologie oder anderen Screeningmethoden und 2) Betreuung von Patientinnen über 20 Jahren mit ASC-US-Befund.^{3,11} Zusätzlich zum Vorliegen bzw. Fehlen von High-Risk-HPV-Typen sollten in allen Fällen Entscheidungen für die Patientenversorgung die gesamte zytologische Anamnese und andere Risikofaktoren mit einbeziehen.^{6,8,11}

TESTPRINZIP

Der Cervista HPV HR ist ein qualitatives *In-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis der DNA von 14 High-Risk-HPV-Typen und zwar den Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68.

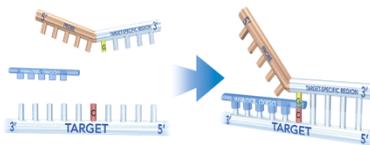
Der Cervista HPV HR-Test verwendet die Invader™-Technologie, eine Signalamplifikationsmethode zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen. Diese Methode verwendet zwei Arten isothermer Reaktionen: eine Primärreaktion an der Ziel-DNA-Sequenz und eine Sekundärreaktion, die ein fluoreszierendes Signal erzeugt (siehe Abbildung 1). In der Primärreaktion binden zwei Arten sequenzspezifischer Oligonukleotide (d. h. ein Sondenoligonukleotid und ein Invader-Oligonukleotid) an die Ziel-DNA-Sequenz. Wenn diese Oligonukleotide um mindestens ein Basenpaar an der Zielsequenz überlappen, bildet sich eine invasive Struktur, die als Substrat für das Enzym Cleavase™ dient. Das Enzym spaltet den 5'-Teil (Arm) der Sonde an der Überlappungsstelle.

Die Sonden liegen in großem molaren Überschuss vor und binden in schneller Folge an die Zielsequenz und lösen sich wieder von ihr, sodass pro Zielsequenz viele abgespaltene 5'-Arme erzeugt werden. Die abgespaltenen Arme binden dann an ein Universal-Haarnadel-Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Oligonukleotid, wodurch eine weitere invasive Struktur entsteht, die das Enzym Cleavase als Substrat erkennt. Das Enzym spaltet die FRET-Oligonukleotide zwischen dem Fluorophor- und dem Quencher-Molekül und erzeugt beim An- und Abkoppeln der abgespaltenen Arme ein Fluoreszenzsignal. Für jede vorliegende Kopie der Zielsequenz erzeugen die kombinierten Primär- und Sekundärreaktionen eine 10⁶–10⁷-fache Signalamplifikation pro Stunde.¹² Die Armsequenzen und die FRET-Oligonukleotide sind universell, da sie nicht zur Zielsequenz komplementär sind.

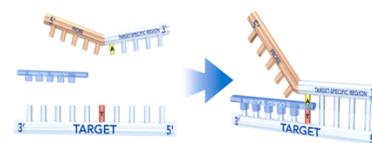
Die Reagenzien für diesen Test werden in drei Oligonukleotidgemischen geliefert, die die 14, nach phylogenetischem Verwandtschaftsgrad (d. h. Virustypen mit ähnlichen DNA-Sequenzen) gruppierten HPV-Typen nachweisen. In den drei Oligonukleotidgemischen befinden sich auch Oligonukleotide, die an das menschliche Histon-2-Gen (H2be, HIST2H2BE) binden. HIST2H2BE dient als interne Kontrolle und erzeugt ein semiquantitatives Signal anhand der in der Probe vorliegenden genomischen DNA. Der Cervista HPV HR-Test ist so aufgebaut, dass die HPV-DNA-Sequenzen und HIST2H2BE gleichzeitig in einem Well nachgewiesen werden können. Dazu werden sowohl zwei unterschiedliche 5'-Arm-Sequenzen der Sonden und zwei verschiedene FRET-Oligonukleotide verwendet, die jeweils spektral unterscheidbare Fluorophore (FAM und Red) tragen. Die freigesetzten 5'-Arme sind so konfiguriert, dass sie nur an das jeweils zugehörige FRET-Oligonukleotid binden und so ein zielspezifisches Signal erzeugen (siehe Abbildung 1).

Ein positives Ergebnis bedeutet, dass in der DNA-Probe mindestens einer der 14 High-Risk-Typen vorhanden ist. Das Ergebnis wird durch ein FAM-Fluoreszenzsignal wiedergegeben, das über einem empirisch bestimmten Cut-off-Wert liegt. Ein negatives Ergebnis der einzelnen Reaktionen liegt vor, wenn das FAM-Fluoreszenzsignal unterhalb eines empirisch bestimmten Cut-off-Wertes liegt. Zur Bestimmung der relativen Menge der Proben-DNA in einer Reaktion wird das menschliche HIST2H2BE anhand eines Red-Fluoreszenzsignals bestimmt, das in jeder Reaktion oberhalb eines empirisch bestimmten Cut-off-Wertes liegt. Die Bestimmung dieses Ziels dient als Qualitätskontrolle, die ausschließt, dass ein negatives Ergebnis auf eine ungenügende DNA-Menge in der Probe zurückzuführen ist.

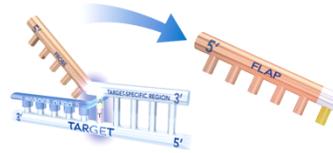
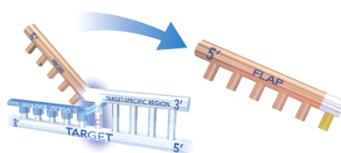
1a. HPV-Oligos bilden invasive Struktur auf HPV-DNA



1b. HIST2H2BE Oligos bilden invasive Struktur auf genomischer DNA



2. Cleavase -Enzym erkennt Struktur und spaltet Sonden-Oligos



3a. Arme von HPV-Sonde Oligos bilden invasive Struktur auf FAM FRET Oligos



3b. Arme von HIST2H2BE-Sonde Oligos bilden invasive Struktur auf Red FRET Oligos



4. Cleavase Enzym erkennt Struktur und setzt Fluorophore aus FRET Oligos frei, was ein Fluoreszenzsignal erzeugt

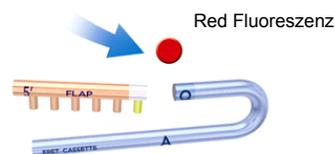
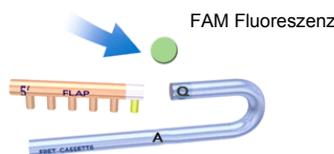


Abbildung 1: Eine grafische Darstellung der Invader -Technologie im Cervista HPV HR

IM LIEFERUNGSFANG ENTHALTENE REAGENZIEN

Hinweis: Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.

Tabelle 1: Cervista HPV HR Inhalt

Reagenz	Abkürzung auf Fläschchenetikett	Anzahl Fläschchen u. Reagenzienmenge (REF 92-011)	Anzahl Fläschchen u. Reagenzienmenge (REF PRD-01560)	Beschreibung der Bestandteile
HPV Oligo Mix 1	O1 (Blauer Deckel und blauer Streifen)	1 x 1400 µl	8 x 1400 µl	Oligonukleotide mit Affinität zu HPV-Typen 51, 56 und 66 in Wasser und MOPS-Puffer suspendiert (pH 7,5).
HPV Oligo Mix 2	O2 (Gelber Deckel und gelber Streifen)	1 x 1400 µl	8 x 1400 µl	Oligonukleotide mit Affinität zu HPV-Typen 18, 39, 45, 59 und 68 in Wasser und MOPS-Puffer suspendiert (pH 7,5).
HPV Oligo Mix 3	O3 (Orangefarbener Deckel und orangefarbener Streifen)	1 x 1400 µl	8 x 1400 µl	Oligonukleotide mit Affinität zu HPV-Typen 16, 31, 33, 35, 52 und 58 in Wasser und MOPS-Puffer suspendiert (pH 7,5).
Cleavase Enzyme Solution	E (Violetter Deckel und violetter Streifen)	1 x 1100 µl	8 x 970 µl	Cleavase Enzym suspendiert in 140 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris (pH 8,0), 25 mM KCl, 0,25 % Tween 20, 0,25 % Nonidet P40, 25 % Glycerol und 0,05 mg/ml BSA
HPV Control 1	C1 (Durchsichtiger Deckel und schwarzer Streifen)	1 x 350 µl	8 x 350 µl	1000 Kopien/µl geklonte DNA vom HPV-Typ 51 und 3000 Kopien/µl geklonte HIST2H2BE-DNA in Hefe-tRNA und 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA-Puffer
HPV Control 2	C2 (Durchsichtiger Deckel und schwarzer Streifen)	1 x 350 µl	8 x 350 µl	1000 Kopien/µl geklonte DNA vom HPV-Typ 18 und 3000 Kopien/µl geklonte HIST2H2BE-DNA in Hefe-tRNA und 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA-Puffer
HPV Control 3	C3 (Durchsichtiger Deckel und schwarzer Streifen)	1 x 350 µl	8 x 350 µl	1000 Kopien/µl geklonte DNA vom HPV-Typ 16 und 3000 Kopien/µl geklonte HIST2H2BE-DNA in Hefe-tRNA und 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA-Puffer
No Target Control (Kontrolle ohne Zielsequenzen)	NTC (Durchsichtiger Deckel und schwarzer Streifen)	1 x 350 µl	8 x 350 µl	Hefe-tRNA und 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA-Puffer

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zur *In-vitro*-Diagnostik.
2. Beim Umgang mit menschlichem Gewebe oder Flüssigkeiten grundsätzlich die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen einhalten. Proben sind gemäß den örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.
3. Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen oder aus unterschiedlichen Fläschchen derselben Charge nicht mischen.
4. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden.
5. Die Produktkomponenten (Produktreste, Verpackung) können als Laborabfall angesehen werden. Nicht benötigte Reagenzien und Abfälle in Übereinstimmung mit allen geltenden Bestimmungen entsorgen.

LAGERUNG UND HANDHABUNG

- Sämtliche Reagenzien zwischen –30 °C und –15 °C lagern.
- Reagenzien nicht nach dem auf der Packungsaußenseite angegebenen Verfalldatum verwenden.
- Nicht in einem Kühlschrank/Kühlfach mit Abtauautomatik aufbewahren.
- Vor Lichteinfall schützen.
- Vor Gebrauch die Reagenzien aus dem Tiefkühler nehmen und mindestens 30 Minuten oder so lange bei Raumtemperatur auftauen lassen, bis kein gefrorenes Material mehr sichtbar ist.
- Jedes Reagenz vor dem Gebrauch mit dem Vortexer mischen.
- Hologic empfiehlt für alle Cervista HPV HR-Testreagenzien nicht mehr als 6 Einfrier-/Auftauzyklen.
- Vor Testdurchführung Reaktionsgemische herstellen. Reaktionsgemische innerhalb von 30 Minuten aufbrauchen.

ZUSÄTZLICHE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Für diesen IVD-Test wird die Software Invader Call Reporter™ benötigt. Die Software wird bei der Erstbestellung des Cervista HPV HR-Tests einmalig geliefert und später nach Bedarf aktualisiert. Zusätzliche Kopien sind bei Bedarf über Ihren Außendienstmitarbeiter erhältlich.

Das Genfind® DNA-Extraktionskit ist Zubehör des Cervista HPV HR-Tests. Wenden Sie sich an Ihren Außendienstmitarbeiter, um das Genfind DNA-Extraktionskit ([REF](#) 95-449) zu bestellen.

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE, ABER ERFORDERLICHE MATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien

- Nukleasefreie Pipettenspitzen mit Barrierefilter
- 96-Well-Polypropylenplatten
- Durchsichtige Abdeckfolie für Mikrotiterplatten
- Mineralöl für die Molekularbiologie
- 2,0 ml sterile Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluss

Geräte

- Cervista MTA-System für Benutzer der Automatisierung
- Pipetten
- Vortexer
- Lesegerät für Fluoreszenzplatten Tecan® Infinite™ F200, Tecan GENios™ oder BioTek® FLx800™
- PC mit Betriebssystem Microsoft® Windows® XP oder Windows 7, Microsoft Excel und Adobe® Reader®-Software.
- Thermocycler oder Trockenschrank mit entsprechenden Reaktionstemperaturen.

PROBENAHE, DNA-EXTRAKTION UND LAGERUNG ZUR UNTERSUCHUNG

Folgende Gebärmutterhalsproben können mit dem Cervista HPV HR-Test getestet werden:

- Proben in PreservCyt™ Lösung, dem Konservierungssystem für den ThinPrep™ Krebsabstrich, die mit einem genehmigten Entnahmeinstrument entnommen wurden.
- Proben in SurePath™ Konservierungslösung, die mit einem genehmigten Entnahmeinstrument entnommen wurden.

Gebärmutterhalsproben in PreservCyt Lösung können bis zur Testdurchführung bei Raumtemperatur (20–30 °C) bis zu 24 Wochen gelagert werden.

Gebärmutterhalsproben in SurePath Konservierungslösung können bis zur Testdurchführung bei Raumtemperatur (20–30 °C) bis zu 6 Wochen gelagert werden.

Das Genfind DNA-Extraktionskit ([REF](#) 95-449) wurde zur Verwendung mit dem Cervista HPV HR-Test validiert. Das empfohlene Verfahren für die DNA-Extraktion aus Gebärmutterhalsproben in PreservCyt Lösung oder SurePath Konservierungslösung finden Sie in der Gebrauchsanweisung des Genfind-DNA-Extraktionskit.

Labors, die den Cervista HPV HR-Test mit einer anderen Methode als der des validierten Genfind-DNA-Extraktionskit durchführen möchten, tun dies auf eigene Gefahr.

DNA-Proben können bei 2–8 °C bis zu 4 Wochen gelagert werden. Für Aufbewahrungszeiträume über vier Wochen die Proben tiefgekühlt bei –30 °C bis –15 °C lagern.

TESTVERFAHREN FÜR DAS CERVISTA MTA-SYSTEM

Siehe Cervista MTA-Bedienerhandbuch (Bestellnummer MAN-02378-002) für die Anwendung des automatisierten Systems zur Durchführung des Cervista HPV HR-Tests.

MANUELLES CERVISTA HPV HR TESTVERFAHREN

Reaktionsverfahren

1. Je 10 μl der Kontrollen und Proben-DNA wie im Testplattenlayout angegeben (siehe Abbildung 2) in drei Wells einer 96-Well-Platte pipettieren.

	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 1	Mix 2	Mix 3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	S5	S5	S5	S13	S13	S13	S21	S21	S21
B	C2	C2	C2	S6	S6	S6	S14	S14	S14	S22	S22	S22
C	C3	C3	C3	S7	S7	S7	S15	S15	S15	S23	S23	S23
D	NTC	NTC	NTC	S8	S8	S8	S16	S16	S16	S24	S24	S24
E	S1	S1	S1	S9	S9	S9	S17	S17	S17	S25	S25	S25
F	S2	S2	S2	S10	S10	S10	S18	S18	S18	S26	S26	S26
G	S3	S3	S3	S11	S11	S11	S19	S19	S19	S27	S27	S27
H	S4	S4	S4	S12	S12	S12	S20	S20	S20	S28	S28	S28

Abbildung 2: Cervista HPV HR-Testplattenlayout

2. Jedes Well mit 20 μl Mineralöl überschichten und mit Abdeckfolie abdecken, um eine Verdampfung so gering wie möglich zu halten.
3. Die Proben bei 95 °C für 5 Minuten in einem Thermocycler inkubieren.
4. Vor Gebrauch die Reagenzien und Reaktionsgemische gründlich und einheitlich mischen.
5. Die Reaktionsgemische wie im Blatt „Herstellung der Reaktionsgemische“ (Ausdruck aus der Software Invader Call Reporter) angegeben oder anhand der Berechnungen in Tabelle 2 ansetzen. Für jedes der drei HPV Oligo-Mischungen ein Reaktionsgemisch ansetzen.

Tabelle 2: Anleitung „Herstellung der Reaktionsgemische“

Bestandteil	$\mu\text{l}/\text{Well}$	Anzahl der Reaktionen Proben u. Kontrollen [k]	25 % Überschuss	Gesamtvolumen
HPV Oligo Mix 1, 2 oder 3	8 μl	k	1,25	= 8 k (1,25)
Cleavase Enzyme Solution	2 μl	k	1,25	= 2 k (1,25)
Gesamtvolumen des Gemischs	10 μl	k	1,25	= 10 k (1,25) μl

6. Temperatureinstellung des Thermocyclers auf 63 °C absenken.
7. Je 10 μl des entsprechenden Reaktionsgemisches in jedes Well mit Kontrolle oder Probe geben (siehe Abbildung 2), dabei darauf achten, unter das Mineralöl zu pipettieren.
8. Die Platte 4 Stunden lang bei 63 °C inkubieren.

Datenerfassung

1. Vor dem Ablesen Platte immer auf Raumtemperatur bringen. Die Platte, falls sie nicht sofort abgelesen werden kann, bei 2–8 °C aufbewahren (empfehlenswert ist, die Platte innerhalb von 24 Stunden nach Beenden des Tests abzulesen).
2. Die 96-Well-Platte (Well A1 muss oben links sein) in die Plattenhalterung des Fluoreszenzplattenlesegeräts einsetzen. Die Abdeckfolie entfernen.
3. Den Plattentyp definieren, um die Koordinaten und Sondenhöhe für diesen bestimmten Plattentyp einzurichten. Einstellungen speichern.

4. Die gesamte Platte ablesen. Es sind zwei gesonderte Scans erforderlich: FAM (Anregung = 485 nm, Emission = 530 nm) und Red (Anregung = 560 nm, Emission = 612 nm). Zum Nachweis des HPV-Signals muss das Gerät so eingestellt sein, dass es den FAM-Fluorophor zuerst abliest. Zum Nachweis der genomischen DNA in der Probe muss das Gerät auf den Nachweis des Red-Fluorophors eingestellt sein.
5. Die Verstärkung gemäß Herstelleranweisung des Fluoreszenzplattenlesegeräts so einstellen, dass sie sich im linear-dynamischen Bereich des Geräts befindet. Die Verstärkung muss so eingestellt werden, dass die „No Target Control (NTC)“ Werte ergibt, die in den Hintergrundbereich des Lesegeräts fallen und mindestens 600 RFU betragen. Die NTC-Werte brauchen für die FAM- und Red-Ablesung nicht identisch zu sein.

HINWEISE ZUM VERFAHREN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Labors müssen gemäß Guter Laborpraxis arbeiten und alle geltenden gesetzlichen Bestimmungen des Bundes, des Landes und der Gemeinden einhalten.
2. Die Proben, Reagenzien und Reaktionen stets gründlich und einheitlich mischen.
3. Zur Vermeidung von Kreuzkontamination während der Zugabe- und Übertragungsschritte nukleasefreie, sterile Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere verwenden.
4. Zur Vorbereitung der Reaktionsgemische nukleasefreie Einwegröhrchen aus Polypropylen verwenden.
5. Vor Testbeginn nachprüfen, ob der 96-Well-Plattentyp mit diesem bestimmten Thermocycler und Fluoreszenzplattenlesegerät kompatibel ist.*
6. Nur kalibrierte Geräte einsetzen.
7. Die Kontrollen müssen in den in Abbildung 2 gezeigten Positionen im Testplattenlayout eingesetzt werden, damit die Software Invader Call Reporter ordnungsgemäß funktioniert.
8. Für jedes Reaktions-Setup frisches Mineralöl verwenden (diese Reagenzien nach der Entnahme nicht mehr in den Originalbehälter zurückfüllen).
9. Anhand des Testplattenlayouts überprüfen, ob jeder Spalte das richtige Gemisch zugesetzt wird.*
10. Die Pipettenspitze immer bis fast an den Grund des Wells führen, damit das Reaktionsgemisch unterhalb des Mineralöls zugefügt wird. Durch vorsichtiges 3–5-maliges Aufziehen und Entleeren der Pipette mischen.*

*Hinweise Nr. 5, 9 und 10 gelten nicht für das Cervista MTA-System.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Für jede der drei Reaktionen wird ein Signal-Rausch-Wert (Probensignal gemessen gegen Signal einer „No Target Control“-Reaktion) erzeugt. Dieser Signal-Rausch-Wert wird als FOZ (Fold-Over-Zero) bezeichnet. Abhängig von der Auswertung der drei gesonderten Reaktionswells wird schließlich ein positives, negatives oder nicht ermittelbares Ergebnis der einzelnen Proben erstellt.

Ob eine Probe positiv ist, bestimmt das Verhältnis zwischen den HPV FOZ-Werten, die von den drei Reaktionsgemischen erzeugt werden. Das HPV FOZ-Verhältnis wird durch Dividieren des höchsten HPV FOZ-Werts einer der drei Reaktionsgemische durch den niedrigsten HPV FOZ-Wert dieser drei errechnet. Sollte ein FOZ-Wert unter 1 sein, wird er für diese Berechnung auf 1 aufgerundet. Wenn das HPV FOZ-Verhältnis 1,525 oder mehr beträgt, ist die Probe HPV-positiv. Allerdings können bei einer Mischinfektion alle drei Reaktionswells ein Signal erzeugen, das viel höher als der Hintergrund ist. In einigen Fällen können diese Mischinfektionen in allen drei Wells positive Signale ähnlicher Intensität erzeugen und somit ein HPV FOZ-Verhältnis von $< 1,525$. Um aufgrund des oben beschriebenen Dreifach-positiv-Szenarios ein falsch-negatives Ergebnis zu vermeiden, wird wie folgt eine zweite Berechnung durchgeführt: Wenn das FOZ-Verhältnis unter 1,525 liegt, doch die FOZ-Werte der drei Einzelreaktionen gleich dem Cut-off-Wert von 1,93 oder größer sind, ist die Probe positiv auf HPV.

In drei verschiedenen Fällen wird ein nicht ermittelbares Ergebnis erzeugt: 1) Wenn der % VK zwischen den gDNA FOZ-Werten $\geq 25,0$ % (hoher % VK), 2) wenn alle drei HPV FOZ-Werte $< 0,7$ (niedriger HPV FOZ) und 3) wenn der durchschnittliche gDNA FOZ einer negativen Probe $< 1,5$ (niedriger gDNA) beträgt.

Eine Zusammenfassung der Probensignalkriterien zeigt Abbildung 3 oben.

TERMINOLOGIE

HPV FOZ: Für jeden HPV Oligo-Mix das FAM-Signal der Probe geteilt durch das FAM-Signal der „No Target Control“.

Verhältnis HPV FOZ: Der höchste HPV FOZ der drei HPV-Oligogemische geteilt durch den niedrigsten HPV FOZ der drei HPV-Oligogemische (auf 1,0 aufgerundet, wenn FOZ $< 1,0$ beträgt).

Mittlerer gDNA-FOZ: Es wird der aus den drei genomischen DNA FOZ-Werten der drei Reaktionsgemische bestimmte Mittelwert berechnet, indem das Red-Signal der Probe durch das Red-Signal der „No Target Control“ dividiert wird.

%VK gDNA-FOZ: % Variationskoeffizient der von den drei HPV-Oligogemischen erzeugten gDNA FOZ-Werte.

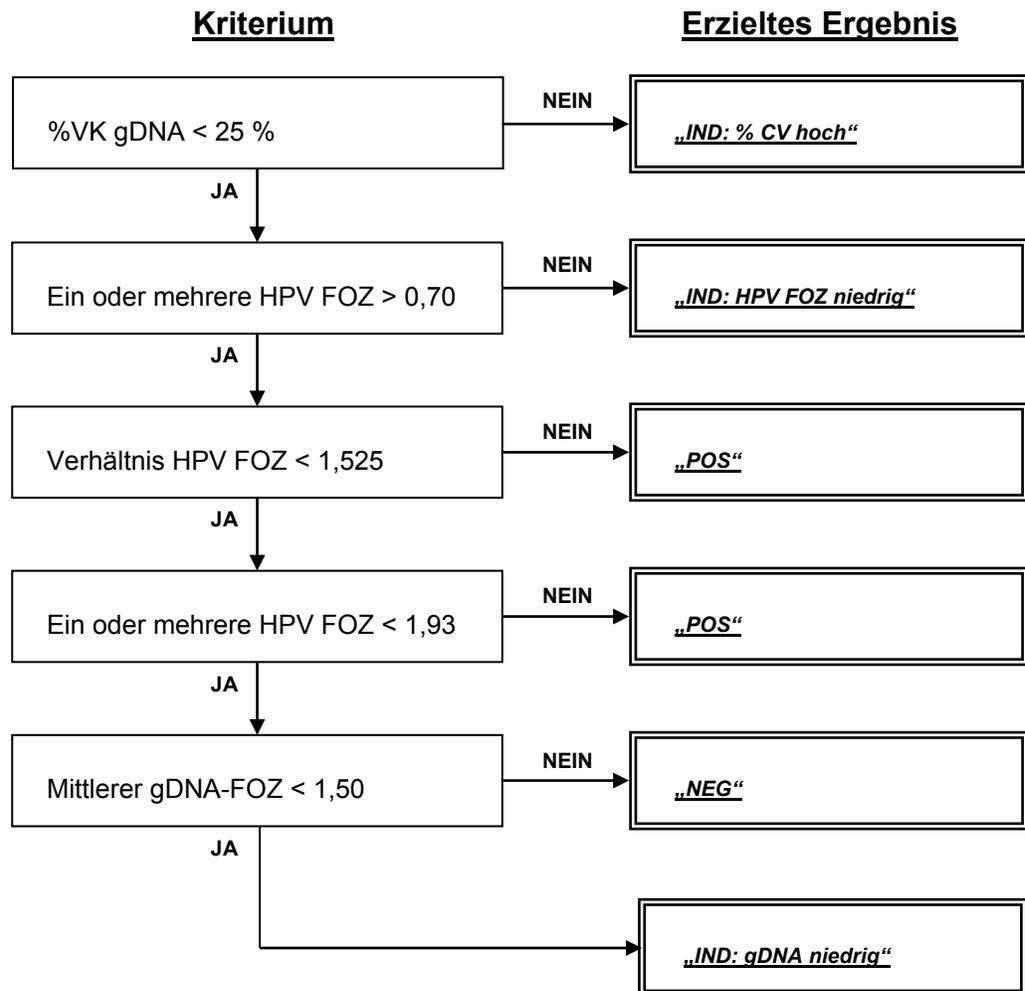


Abbildung 3: Entscheidungskriterien für Proben, von oben nach unten

QUALITÄTSKONTROLLE

Negativkontrolle

1. Die „No Target Control“ muss die passenden Ergebnisse liefern, damit die Proben dieser Platte gültig sind. Wenn sie diesen Kriterien nicht entspricht, sind auch die Ergebnisse der Proben und Kontrollen dieser Platte ungültig und müssen wiederholt werden (siehe Tabelle 3).
2. Das Mindestsignal für alle drei Gemische muss gleich 600 RFU oder größer sein (≥ 600).
3. Der % VK des mittleren HPV-Signals aller drei Gemische muss unter 25,0 % ($< 25,0 \%$) betragen. Andernfalls sind die Ergebnisse der Proben und Kontrollen dieser Platte ungültig und müssen wiederholt werden (siehe Tabelle 3).
4. Der % VK des mittleren gDNA-Signals aller drei Gemische muss unter 25,0 % ($< 25,0 \%$) liegen.

Tabelle 3: No Target Control (Kontrolle ohne Zielsequenzen)

Ergebnis	Minimalwert HPV Signal	Min. gDNA Signal	Max. % VK (HPV und gDNA)
Gültig	600	600	24,9 %

HPV-Kontrollen

1. Der Test ist nur gültig, wenn die HPV-Kontrollen (HPV Controls 1–3) die erwarteten Ergebnisse liefern. Wenn die Kontrollen diesen Kriterien nicht genügen, sind auch die Ergebnisse der Proben der betroffenen Platte ungültig und müssen wiederholt werden (siehe Tabelle 4).
2. Durch Dividieren des höchsten HPV FOZ der drei Gemische durch den niedrigsten HPV FOZ der drei Gemische wird das HPV FOZ-Verhältnis bestimmt (auf 1,0 aufrunden, wenn es unter 1,0 liegt). Die HPV Control 1 sollte nur für HPV Oligo Mix 1 einen positiven HPV FOZ-Wert ($\geq 1,525$) ergeben, die HPV Control 2 sollte nur für HPV Oligo Mix 2 einen positiven HPV FOZ-Wert ($\geq 1,525$) ergeben und die HPV Control 3 sollte nur für HPV Oligo Mix 3 einen positiven HPV FOZ-Wert ($\geq 1,525$) ergeben.
3. Der mittlere gDNA-FOZ aller drei Gemische muss größer oder gleich 1,50 sein ($\geq 1,50$). Andernfalls ist die Kontrolle aufgrund eines zu geringen Gehalts genomischer DNA ungültig.
4. Der % VK des gDNA FOZ-Mittelwerts der drei Gemische muss unter 25,0 % ($< 25,0 \%$) liegen.

Tabelle 4: Kriterien für HPV-Kontrolle und Probe

Kontrolle	Ergebnis	HPV FOZ Verhältnis	Positiv FOZ Mix	Durchschnittl. gDNA FOZ	% VK gDNA FOZ
HPV Control 1	Kontrolle gültig	$\geq 1,525$	Nur Mix 1	$\geq 1,50$	$< 25,0 \%$
HPV Control 2	Kontrolle gültig	$\geq 1,525$	Nur Mix 2	$\geq 1,50$	$< 25,0 \%$
HPV Control 3	Kontrolle gültig	$\geq 1,525$	Nur Mix 3	$\geq 1,50$	$< 25,0 \%$

Testverifizierung

1. Die Probenergebnisse sind gültig, wenn die Negativ- und Positivkontrollen die richtigen Ergebnisse ergeben. Wenn die „No Target Control“ (Negativkontrolle) ungültig ist und/oder ein Ergebnis einer bzw. mehrerer Positivkontrollen ungültig ist, sind alle Probenergebnisse der betroffenen Platte ungültig und müssen wiederholt werden. Siehe die Abschnitte zur Fehlerbehebung in der Gebrauchsanweisung und im Software User Manual For Invader Call Reporter. Siehe Abschnitt zur Fehlerbehebung im Cervista MTA-Bedienerhandbuch (Bestellnummer MAN-02378-002) für das Cervista MTA-System.
2. Sämtliche Qualitätskontrollvorgaben sind entsprechend den geltenden nationalen, internationalen und regionalen Bestimmungen durchzuführen.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der Cervista HPV HR-Test weist die DNA der High-Risk-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 nach. Der Test weist keine DNA von HPV-Typen mit geringem Risiko nach (z. B. 6, 11, 42, 43, 44).
2. Der Cervista HPV HR-Test zeigt eine Kreuzreaktivität mit zwei HPV-Typen mit nicht bekanntem Risiko. Bei 5000 Kopien/Reaktion wurde ein HPV-positives Ergebnis für HPV-Typ 67 und bei 50.000 Kopien/Reaktion für HPV-Typ 70 erhalten.
3. Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche HPV-Infektion nicht aus, da auch sehr geringfügige Infektionen oder ein Probenahmefehler falsch-negative Ergebnisse bewirken können.
4. Der Test wurde nur für die Verwendung mit zytologischen Gebärmutterhalsproben validiert, die in PreservCyt Lösung oder SurePath Konservierungslösung entnommen wurden.
5. Die Leistung des Cervista HPV HR-Tests wurde mit DNA ermittelt, die mit dem Genfind-DNA-Extraktionskit extrahiert wurde.
6. Störungen wurden bei Gebärmutterhalsproben in PreservCyt Lösung beobachtet, die bei Isolierung der DNA mit dem Genfind-Extraktionskit mit hohen Konzentrationen (2 %) von Verhütungsgel und/oder fungizider Creme kontaminiert waren. Unter diesen Bedingungen kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen.
7. Störungen wurden bei Gebärmutterhalsproben in SurePath Konservierungslösung beobachtet, die bei der Isolierung der DNA mit dem Genfind DNA-Extraktionskit mit Verhütungsgel und/oder fungizider Creme in der Größenordnung von 0,5 % und des Gleitmittels ASTROGLIDE® in der Größenordnung von 0,5 % kontaminiert waren. Unter diesen Bedingungen kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Potentielle Störungen durch das Gleitmittel ASTROGLIDE in Gebärmutterhalsproben in PreservCyt Lösung wurden nicht getestet.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Leistung in der klinischen Prüfung

Es wurde eine multizentrische, prospektive Querschnittsstudie durchgeführt, um die Leistung des Cervista HPV HR-Tests zum Nachweis des humanen Papillomavirus und zervikaler intraepithelialer Neoplasie Grad 2 oder höher (CIN2+) in flüssigen Zytologieproben zu evaluieren. Von 3540 Frauen, die sich eines routinemäßigen Screenings auf Gebärmutterhalskrebs unterzogen, wurden verbleibende ThinPrep Zytologieproben gesammelt. Diese Studie umfasst 2026 Frauen ab dem 30. Lebensjahr mit normalen Zytologieergebnissen (WNL) und 1514 Frauen ab dem 18. Lebensjahr mit ASC-US-Ergebnissen. Die Zytologieproben stammten aus 89 Prüfzentren in den USA. Die DNA wurde aus den verbleibenden ThinPrep Gebärmutterhalsproben extrahiert, die nach Abschluss der routinemäßigen Screeningverfahren auf Gebärmutterhalskrebs übrig blieben. Die DNA wurde daraufhin mit dem Cervista HPV HR-Test untersucht.

Die analytische Leistung des Tests wurde mit PCR-/Sequenzierungsergebnissen verglichen. Für die PCR-Amplifikation und Sequenzierung wurden verbleibende DNA-Proben von Studienteilnehmern mit ASC-US sowie WNL verwendet. DNA-Proben wurden mit Consensus-Primer für das HPV L1-Gen amplifiziert. Als interne Kontrolle wurde ebenfalls ein Teil des humanen Beta-globins amplifiziert. Gereinigte Amplicons wurden in mehreren Sequenzierungsreaktionen auf die 14 High-Risk HPV-Typen als Matrizes eingesetzt: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68. Die Sequenzierungsdaten wurden mit verschiedener Sequenzalignment-Software ausgewertet.

Ein Vergleich des Cervista HPV HR-Tests mit der PCR/Sequenzierungsmethode zwischen den Studienteilnehmern mit ASC-US und WNL ergab insgesamt eine 86,1 % Übereinstimmung der beiden Methoden (95 % KI = 84,9–87,3 %). Die prozentuale Übereinstimmung der positiven Ergebnisse der beiden Methoden betrug 91,8 (89,7–93,6 %), die der negativen Ergebnisse 84,2 % (95 % KI = 82,7–85,7 %).

Die klinische Leistung des Cervista HPV HR-Tests wurde mit den Ergebnissen der Kolposkopie und Histologie verglichen. Wie an jedem der teilnehmenden Prüfzentren von den Pflegestandardsleitlinien gefordert, wurden von den Frauen mit ASC-US-Zytologie Biopsieproben entnommen. Dabei diente als „Goldstandard“ für Nachweis bzw. Fehlen einer Erkrankung die Consensus-Histologieergebnisse eines zentralen Prüfungsgremiums. Beim Fehlen von Histologiedaten galt als Fehlen der Erkrankung der Nichtnachweis kolposkopisch sichtbarer Gebärmutterhalsläsionen und keine Biopsie.

Es gab 1347 ASC-US-Studienteilnehmer mit bekanntem Krankheitsstatus (zentrale Histologie oder negative Kolposkopie) und Cervista HPV HR-Ergebnissen. Ein Vergleich der Cervista HPV HR-Ergebnisse mit Kolposkopie/zentraler Histologie zeigen die Tabellen 5 und 6.

Tabelle 5: Cervista HPV HR und Kolposkopie/Konsens-Histologieergebnisse (CIN2+) bei Frauen mit ASC-US-Zytologie

Cervista HPV HR	Kolposkopie/Histologie		Gesamt
	Positiv ^b	Negativ ^c	
Positiv	64	705	769
Negativ^a	5	573	578
Gesamt	69	1278	1347

^a Beinhaltet nicht ermittelbare Ergebnisse

^b CIN2+ Histologie

^c Kein CIN oder CIN1 durch zentrale Histologie oder Kolposkopie ohne zentrale Histologie

Tabelle 6: Cervista HPV HR und Kolposkopie/Konsens-Histologieergebnisse (CIN3+) bei Frauen mit ASC-US-Zytologie

Cervista HPV HR	Kolposkopie/Histologie		Gesamt
	Positiv ^b	Negativ ^c	
Positiv	22	705	727
Negativ ^a	0	573	573
Gesamt	22	1278	1300

^a Beinhaltet nicht ermittelbare Ergebnisse

^b CIN3+ einschließlich einem Adenokarzinom in situ

^c Kein CIN, CIN1 oder CIN2 durch zentrale Histologie oder Kolposkopie ohne zentrale Histologie

Bei den Frauen mit ASC-US-Zytologie betrug die klinische Empfindlichkeit des Tests auf CIN2+ 92,8 % (95 % KI = 83,9–97,6 %), der negative Prognosewert betrug 99,1 % (95 % KI = 98,0–99,7 %). Die klinische Empfindlichkeit und negativen Prognosewerte des Tests auf CIN 3 betragen jeweils 100 % (95 % KI = 84,6–100 % und 99,4–100 %).

Es sind eine Reihe von Schlüsselfaktoren bekannt, welche die Leistungseigenschaften jeden HPV-Tests in einer klinischen Studie beeinflussen. Das sind insbesondere Entnahmetechniken für Gebärmutterhalsproben, die Qualität der Zytologieergebnisse, Alter der getesteten Population, Prävalenz der Krankheit, Krankheitserhebungsmethoden und Methoden der histologischen Auswertung. Angesichts der Anzahl vorhandener Faktoren bei einem Routine-HPV-Test an den verschiedenen Prüfzentren ist es beachtenswert, dass viele aus der Hologic-Studie erzielten Ergebnisse denen ähnlich sind, die unter kontrollierten Prüfungsbedingungen in der ASC-US/LSIL Triage Study (ALTS) beschrieben wurden.^{7,4} Ein Vergleich des Studiendesigns, Prävalenz der Krankheit und klinische Leistungseigenschaften für die Hologic-Studie sowie der ALTS zeigt Tabelle 7. Der Unterschied der in den beiden Studien beobachteten CIN2+-Raten kann Unterschiede in der Population sowie Unterschiede in der Krankheitserhebung wiedergeben.

Tabelle 7: Vergleich der klinischen Prüfung Hologic und ALTS^{7,4}

Kriterium	ALTS	Hologic
Anzahl der Prüfzentren / Bundesstaaten	4 / 4	89 / 22
Durchschnittsalter der Studienteilnehmer	29	33
Studienteilnehmer mit Kolposkopie	1149 ^a	1347 ^b
Studienteilnehmer ohne Läsionen, keine Biopsie (%)	25 %	28 %
Studienteilnehmer ohne pathologische Läsionen bei Biopsie (%)	49 %	53 %
Studienteilnehmer mit CIN1 (%)	15 %	14 %
Studienteilnehmer mit CIN2+ (%)	11 %	5 %
Nachweisrate für CIN2+	96 %	93 %
Nachweisrate für CIN3+	96 %	100 %
Negativer Prognosewert für CIN2+	98,9 %	99,1 %
Negativer Prognosewert für CIN3+	99,5 %	100,0 %
Überweisungen an Kolposkopie	57 %	57 % ^c
PCR-Übereinstimmung	82,7 %	86,1 %

^a Sofortiger Kolposkopie-Arm von ALTS

^b Anzahl Studienteilnehmer mit bekanntem Krankheitsstatus und Cervista HPV HR-Ergebnissen

^c Die Rate an Überweisungen bei Frauen ab 30 Jahre betrug 43 %

Analytische Empfindlichkeit

Um die jeweilige analytische Empfindlichkeit für die einzelnen HPV-Typen zu bestimmen, wurde geklonte HPV-Plasmid-DNA der 14 HPV-Typen, die mit dem Cervista HPV HR-Test nachgewiesen werden können, untersucht. Die Werte für die einzelnen Nachweisgrenzen (Limit of Detection, LoD) wurden für die 14 HPV-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) als Funktion einer Bestimmung des „Limit of Blank“ (LoB) und „einer Populationsvarianzmessung“ (SD) aus mehreren Konzentrationen des spezifischen HPV-Ziels bestimmt (CLSI/NCCLS-Richtlinie EP17-A Bd. 24 Nr. 34). Zur Bestimmung des LoB-Werts wurden neun als HPV-negativ gekennzeichnete, aus Gebärmutterhalsproben isolierte DNA-Proben verwendet (FAM-FOZ-Verhältnis = 1,20). Jede HPV-Plasmid-DNA wurde in Konzentrationen von 7500, 5000, 2500 und 1250 Kopien pro Reaktion getestet, und zwar jeweils vor einem Hintergrund von drei Konzentrationen genomischer DNA, die aus einer HPV-negativen Zelllinie isoliert wurde (10 ng, 100 ng und 1 µg pro Reaktion). Alle positiven und negativen Proben wurden in achtfachen Ansätzen getestet.

Die Nachweisgrenze der einzelnen HPV-Typen ist in Tabelle 8 angegeben. Die Grenzwerte sind als FAM-FOZ-Verhältnis und als Spannbreite der Kopienanzahl angegeben.

Tabelle 8: Cervista HPV HR-Test Zusammenfassung der analytischen Empfindlichkeit

HPV-DNA-Typ	LoD (Zahl der Kopien/Reaktion)	LoD (FAM-FOZ-Verhältnis)	SD
16	1250–2500	1,34	0,08
18	1250–2500	1,34	0,08
31	1250–2500	1,30	0,06
33	2500–5000	1,31	0,07
35	5000–7500	1,34	0,09
39	2500–5000	1,30	0,06
45	1250–2500	1,31	0,06
51	2500–5000	1,35	0,09
52	1250–2500	1,28	0,04
56	1250–2500	1,37	0,10
58	2500–5000	1,35	0,09
59	2500–5000	1,35	0,09
66	2500–5000	1,30	0,06
68	2500–5000	1,30	0,06
Mittelwert		1,324	0,074

Genauigkeit und Spezifität im Vergleich zu einer PCR/DNA-Sequenzierungsmethode

Es wurde eine Studie zum Nachweis von Hochrisiko-HPV-DNA aus klinischen Proben mit dem Cervista HPV HR-Test durchgeführt. Die Proben wurden mit einer in der Forschung eingesetzten Methode zur HPV-Genotypbestimmung bestimmt, die eine degenerierte PCR-Amplifikation mit anschließender HPV-typenspezifischer Sequenzierung nutzt. Die PCR/Sequenzierungsmethode wurde als einziges Bestimmungsverfahren für das Vorliegen von HPV-DNA verwendet.

In der Studie wurden 192 in PreservCyt Lösung aufbewahrte Proben untersucht, von denen 189 ein eindeutiges Sequenzierungsergebnis aufwiesen. Von diesen 189 Proben waren zwei mit dem Cervista HPV HR-Test nicht ermittelbar. Unbestimmte Ergebnisse wurden in die Vergleichsanalyse des Cervista HPV HR-Tests mit der PCR-/Sequenzierungsmethode nicht einbezogen.

Der Anteil negativer PCR/Sequenzierungsergebnisse, die mit dem Cervista HPV HR-Test positiv waren, betrug 5/187. Umgekehrt betrug der Anteil positiver PCR/Sequenzierungsergebnisse, die mit dem Cervista HPV HR-Test negativ waren, 11/187 (siehe Tabelle 9).

Bei dieser Analyse ergab sich insgesamt eine Übereinstimmung zwischen den Methoden von 91,4 % (171/187; 95 % KI = 86,5–95,0 %) und einer positiven bzw. negativen Übereinstimmung von 89,8 % bzw. 93,7 % (95 % KI = 82,5–94,8 % bzw. 85,8–97,9 %).

Tabelle 9: Nachweis von HPV DNA mit Cervista HPV HR-Test im Vergleich zu PCR mit typenspezifischer Sequenzierung

		PCR/Sequenzierung		
		Negativ	Positiv	Gesamt
Cervista HPV HR	Negativ	74	11	85
	Positiv	5	97	102
	Gesamt	79	108	187

Reproduzierbarkeit

In dieser Forschungsstudie wurde die Gesamtreproduzierbarkeit des Cervista HPV HR-Tests an drei Standorten mit einer Reihe HPV-positiver und HPV-negativer Zellkulturen und HPV-positiver und HPV-negativer Gebärmutterhalsproben untersucht. Aus je 2 ml in PreservCyt Lösung suspendierter Gebärmutterhalsprobe oder Zellkultur wurde DNA extrahiert. Die DNA wurde mit dem Genfind DNA-Extraktionskit extrahiert. Sechzehn Proben wurden an drei Orten, an fünf nicht aufeinander folgenden Tagen, innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen untersucht. Für diese Studie wurden zwei Chargen des Cervista HPV HR-Kits sowie drei Chargen des Genfind DNA-Extraktionskit verwendet.

Die Übereinstimmung innerhalb eines Tages/Zentrums wurde bestimmt, in dem die prozentuale Übereinstimmung zwischen den Messungen der drei möglichen Paare innerhalb des Tages/des Orts berechnet wurde. Die mittlere prozentuale Übereinstimmung und das einseitige exakte 95%-Konfidenzintervall ist zuerst für jeden Ort (Intra-Ort-Reproduzierbarkeit) und dann für alle drei Standorte (Inter-Ort-Reproduzierbarkeit) angegeben.

Die Übereinstimmung zwischen den Tagen/innerhalb eines Orts wurde bestimmt, indem die prozentuale Übereinstimmung für zwei beliebige Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen innerhalb eines Orts für alle möglichen Paarkombinationen berechnet wurde. Die mittlere prozentuale Übereinstimmung und das einseitige exakte 95%-Konfidenzintervall ist zuerst für jeden Ort (Intra-Ort-, Inter-Messungs-Reproduzierbarkeit) und dann für alle drei Orte (Inter-Ort-, Inter-Messungs-Reproduzierbarkeit) angegeben.

Die Übereinstimmung zwischen den Zentren wurde bestimmt, indem die prozentuale Übereinstimmung zwischen den Messungen für zwei beliebige Messungen, die an zwei unterschiedlichen Zentren durchgeführt wurden, für alle möglichen Paarbildungen berechnet wurden [n = 3 (Zentrum 1 und 2, Zentrum 1 und 3, Zentrum 2 und 3)]. Die mittlere prozentuale Übereinstimmung und das einseitige 95%-Konfidenzintervall sind in Tabellen 10 und 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Prozentuale Übereinstimmung der HPV HR Molecular Assay Ergebnisse zwischen den Tagen (innerhalb eines Orts)

Prüfzentrum	Anzahl Vergleiche	Anzahl Übereinstimmungen	Prozentuale Übereinstimmung	1-seitige 95%-Konfidenzuntergrenze
Prüfzentrum 1	200	200	100,0 %	96,3 %
Prüfzentrum 2	200	193	96,5 %	90,8 %
Prüfzentrum 3	200	200	100,0 %	96,3 %
Alle 3 Prüfzentren	600	593	98,8 %	96,9 %

Tabelle 11: Prozentuale Übereinstimmung der HPV HR Molecular Assay Ergebnisse zwischen den Tagen (innerhalb eines Orts)

Prüfzentren	Anzahl Vergleiche	Anzahl Übereinstimmungen	Prozentuale Übereinstimmung	1-seitige 95%-Konfidenzuntergrenze
Prüfzentrum 1 und Prüfzentrum 2	500	490	98,0 %	96,6 %
Prüfzentrum 1 und Prüfzentrum 3	500	500	100,0 %	99,4 %
Prüfzentrum 2 und Prüfzentrum 3	500	490	98,0 %	96,6 %
Alle Zentrumpaare	1500	1480	98,7 %	97,9 %

Störsubstanzen

Vier Gebärmutterhalsproben, (eine davon HPV-negativ und drei HPV-positiv) und drei Zelllinienproben (eine HPV-negativ, zwei HPV-positiv) wurden nach Zugabe von Substanzen, mit denen in Zervixproben zu rechnen ist, untersucht. Zu diesen Substanzen zählten PreservCyt Lösung, zwei Sorten Scheidenspüllösung, Verhütungsgel, zwei Sorten fungizider Cremes und negative klinische Proben, die sichtbare Anteile von Blut und Schleim enthielten. Die PreservCyt Lösung, Spüllösungen, das Verhütungsgel und die fungiziden Cremes wurden in zwei Konzentrationen, 0,5 % und 2 %, zugesetzt. Diese Konzentrationen wurden als repräsentativ für Extremsituationen gewählt, die auftreten könnten, wenn der Gebärmutterhals vor der Probenahme nicht gesäubert werden kann. Die DNA wurde mit dem Genfind DNA-Extraktionskit aus reinen und unreinen Proben isoliert und mit dem Cervista HPV HR-Test untersucht, um durch die zugesetzten Substanzen verursachte Störungen zu testen.

Das Verhütungsgel und die fungiziden Cremes, die entweder Clotrimazol oder Miconazol in einer Konzentration von 2 % in der Probe enthielten, führten zu unbestimmten und falsch-negativen Ergebnissen. Während der DNA-Extraktion störte das Verhütungsgel die Magnetperlentrennung im 10 mM Tris-Puffer, was zu einer geringen DNA-Wiederfindung und einer unzureichenden DNA-Probe für den Test führte. Diese Störung war sichtbar.

Die genannten Substanzen führen nur in solchen Konzentrationen zu einem Testversagen, die ungewöhnlich hoch und in klinischen Proben nicht zu erwarten sind, sofern die Probenahme für den Krebsabstrich ordnungsgemäß erfolgt und der Gebärmutterhals vor Entnahme der Zellprobe für den Krebsabstrich gereinigt wird.

Der Cervista HPV HR-Test wurde ebenfalls mit Bestandteilen getestet, die möglicherweise unabsichtlich während der Probenextraktion mit dem Genfind DNA-Extraktionskit übertragen werden könnten. DNA, die jeweils mit drei Konzentrationen (0 %, 5 % und 10 %) von 70 %igem Ethanol oder Genfind Magnetperlen versetzt worden war, wurde auf mögliche Störungen durch diese Substanzen untersucht. Eine Störung konnte beobachtet werden, wenn 10 % des DNA-Probenvolumens entweder 70 %iges Ethanol oder Magnetperlen enthielten.

Kreuzreaktivität

Zur Bewertung einer möglichen Kreuzreaktivität wurden eine Reihe von Bakterien, Pilzen und Viren, die häufig im weiblichen Anogenitalbereich zu finden sind, sowie mehrere geklonte menschliche Papillomavirustypen geringen oder unbekanntem Risikos mit dem Cervista HPV HR-Test untersucht (siehe Tabellen 12–14).

Tabelle 12

Die unten aufgeführten Organismen wurden in Konzentrationen von etwa 1×10^5 cfu/ml und 1×10^7 cfu/ml zu PreservCyt Lösung gegeben. DNA dieser Organismen und eine negative Zelllinie (Jurkat, 1×10^5 Zellen/ml) wurde mit dem Genfind DNA-Extraktionskit extrahiert. Alle Proben ergaben im Cervista HPV HR-Test negative Ergebnisse.

<i>Candida albicans</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

Tabelle 13

Gereinigte DNA aus den unten aufgeführten Organismen wurde in Konzentrationen von 1×10^5 Kopien/Reaktion und 1×10^7 Kopien/Reaktion mit dem Cervista HPV HR-Test getestet. Alle Proben ergaben negative Ergebnisse.

Herpes-simplex-Virus, Typ 1 (HSV-1)	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Herpes-simplex-Virus, Typ 2 (HSV-2)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
HI-Virus Typ 1 (HIV-1, Pol- und Env-Bereiche)	<i>Neisseria meningitidis</i>
	<i>Mycoplasma hominis</i>

Tabelle 14

Gereinigte DNA oder PCR-Amplicon-Proben der folgenden HPV-Typen wurden in Konzentrationen von 1×10^5 Kopien/Reaktion und 1×10^7 Kopien/Reaktion (sofern nicht anders angegeben) mit dem Cervista HPV HR-Test getestet. Alle Proben ergaben negative Ergebnisse.

Humanes Papillomavirus Typ 1a	Humanes Papillomavirus Typ 44
Humanes Papillomavirus Typ 6	Humanes Papillomavirus Typ 53
Humanes Papillomavirus Typ 11	Humanes Papillomavirus Typ 67*
Humanes Papillomavirus Typ 42	Humanes Papillomavirus Typ 70*
Humanes Papillomavirus Typ 43	Menschliches internes Kontrollgen

* Die Typen 67 und 70 des menschlichen Papillomavirus ergaben mit dem Cervista HPV HR-Test in Konzentrationen von 1×10^5 und 1×10^7 Kopien/Reaktion positive Ergebnisse. Nach weiterer Titration dieser Proben wurden mit dem Cervista HPV HR-Test bei 1×10^3 bzw. 1×10^4 Kopien/Reaktion negative Ergebnisse erzielt.

Außerdem wurde DNA, die aus zwölf in PreservCyt Lösung aufbewahrten Gebärmutterhalsproben extrahiert worden war, in denen zuvor mittels PCR/Sequenzierung HPV-Typen mit niedrigem Risiko (nämlich 6, 42, 43, 44, 53 bzw. 70) nachgewiesen worden waren, mit dem Cervista HPV HR-Test untersucht und lieferte ebenfalls negative Ergebnisse.

PRÄZISION

Wiederholbarkeit und Präzision des Cervista HPV HR-Tests innerhalb eines Labors wurde in einer 21-Tage-Studie mit drei verschiedenen Untersuchern gezeigt, von denen jeder zwei Läufe pro Tag auf speziell dem einzelnen Untersucher zugewiesenen Gerätschaften durchgeführt. Jeder Lauf bestand aus 4 Platten. Für die Läufe wurden innerhalb eines Tages verschiedene Plattenlayouts verwendet.

Jeder Lauf bestand aus genomischen DNA-Proben, die aus zwei HPV-positiven Zelllinien (SiHa - Typ 16 und HeLa - Typ 18), einer HPV-negativen Zelllinie (Jurkat) sowie gestellten Proben, die HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 oder HPV68 Plasmid-DNA und Jurkat-DNA enthielten, isoliert wurden. Jede Probe wurde im Doppelansatz in drei Konzentrationen getestet.

Mit 2500 Kopien/Reaktion ergaben die Plasmid-DNA-Proben 57,4 % (675/1176) positive Ergebnisse. Mit 5000 Kopien/Reaktion ergaben die Plasmid-DNA-Proben 97,2 % (1143/1176) positive Ergebnisse. Mit 10.000 Kopien/Reaktion ergaben die Plasmid-DNA-Proben 100,0 % (1176/1176) positive Ergebnisse (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammenfassung positiver und negativer Werte für jede getestete Probenbedingung.

Ziel		N	HPV-positiv n (%)	Negativ n (%)
HPV16	2500	84	82 (98 %)	2 (2 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV18	2500	84	64 (76 %)	20 (24 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV31	2500	84	58 (69 %)	26 (31 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV33	2500	84	13 (15 %)	71 (84 %)
	5000	84	81 (96 %)	3 (4 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV35	2500	84	1 (1 %)	83 (99 %)
	5000	84	60 (71 %)	24 (29 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV39	2500	84	52 (62 %)	32 (38 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV45	2500	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV51	2500	84	77 (92 %)	7 (8 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV52	2500	84	21 (25 %)	63 (75 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV56	2500	84	64 (76 %)	20 (24 %)
	5000	84	83 (99 %)	1 (1 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV58	2500	84	60 (71 %)	24 (29 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV59	2500	84	16 (19 %)	68 (81 %)
	5000	84	79 (94 %)	5 (6 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV66	2500	84	40 (48 %)	44 (52 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
HPV68	2500	84	43 (51 %)	41 (49 %)
	5000	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000	84	84 (100 %)	0 (0 %)

	Ziel	N	HPV-positiv n (%)	Negativ n (%)
Zellen/ml extrahiert	2500 SiHa / 97.500 Jurkat	84	0 (0 %)	84 (100 %)
	SiHa/Jurkat 5000 SiHa / 95.000 Jurkat	84	15 (18 %)	69 (82 %)
	20.000 SiHa / 80.000 Jurkat	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	HeLa/Jurkat 1250 HeLa / 98.750 Jurkat	84	65 (77 %)	19 (23 %)
	2500 HeLa / 97.500 Jurkat	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	10.000 HeLa / 90.000 Jurkat	84	84 (100 %)	0 (0 %)
	Jurkat 10.000	84	2 (2 %)	82 (98 %)
	20.000	84	0 (0 %)	84 (100 %)
	100.000	84	0 (0 %)	84 (100 %)

Leistung des Cervista HPV HR-Tests

Leistungsvergleich des Cervista HPV HR-Tests mit Proben, die in SurePath-Konservierungslösung bzw. PreservCyt-Lösung entnommen wurden.

Insgesamt nahmen 418 Personen an einer Studie teil, in der wir von jedem Teilnehmer gepaarte Gebärmutterhalsproben in SurePath Konservierungslösung und PreservCyt Lösung gleichzeitig entnahmen. Alle Probenpaare wurden mit dem Cervista HPV HR-Test getestet. Die Gesamtübereinstimmung betrug 92 % für Proben in SurePath Konservierungslösung im Vergleich zu den Ergebnissen für Proben in PreservCyt Lösung.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse für Cervista HPV HR für gleichzeitig in SurePath Konservierungslösung und PreservCyt Lösung entnommenen Gebärmutterhalsproben

	SurePath Probeergebnisse	PreservCyt Probeergebnisse
Gesamt	418	418
% positiv	29,4 %	29,2 %
% negativ	69,9 %	70,6 %
% nicht ermittelbar	0,7 %	0,2 %

FEHLERBEHEBUNG BEI MANUELLEM CERVISTA HPV HR TESTVERFAHREN

Problem	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
Zu geringes Volumen der Reaktionsgemische angesetzt	Die im Register „Assay Selection“ der Software angegebene Probenzahl ist geringer als die Probenzahl auf der Platte.	Die benötigte Menge der Reaktionsgemische für die Vervollständigung der Platte manuell berechnen. Die Softwareangaben mit der korrigierten Probenanzahl erneut ausdrucken.
	Zu großes Volumen der Reaktionsgemische zu der 96-Well-Mikrotiterplatte zugesetzt.	Überprüfen, ob zu jedem Well das richtige Volumen an Reaktionsgemisch zugesetzt wurde. Überprüfen, ob die Kalibrierangaben der Geräte aktuell sind.
Die „No Target Control“ zeigt die folgenden Ergebnisse an: <ul style="list-style-type: none"> • Increase gain for scan 1 (Verstärkung für Scan 1 erhöhen) • Increase gain for scan 2 (Verstärkung für Scan 2 erhöhen) • Increase gain for both scans (Verstärkung für beide Scans erhöhen) 	Die Verstärkungseinstellung des Fluoreszenzplattenlesegeräts ist zu niedrig, so dass die Fluoreszenzsignalwerte unterhalb der Mindestwerte liegen.	Die Verstärkungseinstellung des Fluorometers für den angegebenen Scan so einstellen, dass für die „No Target Control“ ein Mindestsignal von 600 RFU erzielt wird. Die Platte erneut ablesen.
Während des Datenimports treten folgende Fehler auf: „Die FAM- und Red-Verstärkungseinstellungen überprüfen und gesamte Platte erneut lesen. (Teilweises Lesen von Platten ist unzulässig).“ „Die FAM-Verstärkungseinstellungen überprüfen und gesamte Platte erneut lesen. (Teilweises Lesen von Platten ist unzulässig).“ „Die Red-Verstärkungseinstellungen überprüfen und gesamte Platte erneut lesen. (Teilweises Lesen von Platten ist unzulässig).“	Fluorometerprobleme	Siehe den Leitfaden zur Fehlerbehebung im Invader Call Reporter Software User Manual für Fluorometerprobleme, die zu diesem Fehler beitragen können.
	Inkubationsdauer hat die angegebene empfohlene Zeit überschritten.	Überprüfen, ob die Inkubation für die angegebene Zeit und bei der angegebenen Temperatur durchgeführt wurde.

Problem	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
<p>Die „No Target Control“ zeigt die folgenden Ergebnisse an: „% CV (HPV NTC) hoch“ „% CV (gDNA NTC) hoch“</p>	Reagenzien nicht ausreichend oder nicht gleichmäßig gemischt	<ul style="list-style-type: none"> • Überprüfen, ob alle Proben, Reagenzien und Reaktionsgemische gründlich gemischt sind. • Bei der Zugabe der Reaktionsgemische zu den einzelnen Wells die Pipettenspitze weit unten im Well (unterhalb des Mineralöls) positionieren und langsam 3 bis 4 Mal aufziehen und ablassen. • Überprüfen, ob bei der Zugabe die gesamte Flüssigkeit aus der Pipettenspitze verdrängt wird. • Überprüfen, ob zu jedem Well die richtigen Reagenzien zugesetzt wurden. • Überprüfen, ob zu jedem Well die richtigen Reagenzienvolumina zugesetzt wurden. • Überprüfen, ob die Kalibrierangaben der Geräte aktuell sind. • Nachsehen, ob die Volumina in den einzelnen Wells der Platte identisch sind.
	Reaktionsgemische falsch angesetzt	
	Ungleichmäßige Zugabe von „No Target Control“ oder Reaktionsgemisch zur Mikrotiterplatte	
	Vermutete Kontamination während der Probenzugabe oder des Ansetzens des Reaktionsgemischs	
	Verdampfung von Proben	Überprüfen, ob jedem Well Mineralöl zugesetzt wurde.
	Blasen in den Wells der Reaktionsplatten	Wenn möglich, Platten vor dem Fluoreszenzscan zentrifugieren.
	Die hergestellten Reaktionsgemische wurden nicht im empfohlenen Zeitraum verwendet.	Reaktionsgemische innerhalb von 30 Minuten nach Herstellung aufbrauchen.

Problem	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
Kontrolle(n) zeigt/zeigen als Ergebnis „Ungültige Kontrollprobe“ an.	Kontrollen nicht ausreichend oder nicht gleichmäßig gemischt	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen, ob alle Kontrollen und Reagenzien gründlich und gleichmäßig gemischt sind. Bei der Zugabe der Reaktionsgemische zu den einzelnen Wells die Pipettenspitze weit unten im Well (unterhalb des Mineralöls) positionieren und langsam 3 bis 4 Mal aufziehen und ablassen. Überprüfen, ob bei der Zugabe die gesamte Flüssigkeit aus der Pipettenspitze verdrängt wird. Überprüfen, ob zu jedem Well die richtige Kontrolle zugesetzt wurde. Überprüfen, ob zu jedem Well zu jeder Kavität das richtige Kontrollvolumen zugesetzt wurde. Die Kalibrierangaben der Geräte überprüfen. Nachsehen, ob die Volumina in den einzelnen Wells der Platte identisch sind.
	Ungleichmäßige Zugabe des Reaktionsgemischs	
	Kontrollen nicht ausreichend oder nicht gleichmäßig zugegeben	
	Die richtige(n) Kontrolle(n) wurden entweder gar nicht oder an der falschen Position auf die Platte gegeben.	Überprüfen, ob die richtigen Kontrollen an den richtigen Stellen zur Platte gegeben wurden.
	Inkubationsdauer hat die angegebene empfohlene Zeit unter- oder überschritten.	Überprüfen, ob die Inkubation für die angegebene Zeit und bei der angegebenen Temperatur durchgeführt wurde.
	Vermutete Kontamination bei der Probenzugabe	Bei der Vorbereitung nukleasefreie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere und sterile Gefäße verwenden.
		Bei der Testvorbereitung Handschuhe tragen.
		Darauf achten, dass die Pipettenspitzen nur mit der ausgegebenen Lösung in Berührung kommen.
		Pipettenspitzen nicht mit den Händen berühren.
	Oberflächen im Labor mit geeigneten Substanzen reinigen.	
	Verdampfung von Proben	Überprüfen, ob jedem Well Mineralöl zugesetzt wurde.
Falsche Plattenausrichtung	Beim Scannen der Platte muss sich das Well A-1 in der linken oberen Ecke befinden.	
Blasen in den Wells der Reaktionsplatten	Wenn möglich, Platten vor dem Fluoreszenzscan zentrifugieren.	
Die hergestellten Reaktionsgemische wurden nicht im empfohlenen Zeitraum verwendet.	Reaktionsgemische innerhalb von 30 Minuten nach Herstellung aufbrauchen.	

Problem	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung	
Probe zeigt als Ergebnis „IND: %CV hoch“ an.	Proben nicht ausreichend oder nicht gleichmäßig gemischt	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen, ob alle Proben und Reagenzien gründlich gemischt sind. Bei der Zugabe der Reaktionsgemische zu den einzelnen Wells die Pipettenspitze weit unten im Well (unterhalb des Mineralöls) positionieren und langsam 3 bis 4 Mal aufziehen und ablassen. 	
	Ungleichmäßige Zugabe des Reaktionsgemischs	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen, ob bei der Zugabe die gesamte Flüssigkeit aus der Pipettenspitze verdrängt wird. Überprüfen, ob zu jedem Well die richtigen Proben zugesetzt wurden. Überprüfen, ob zu jedem Well die richtigen Probenvolumina zugesetzt wurden. 	
	Ungleichmäßige Probenzugabe	<ul style="list-style-type: none"> Überprüfen, ob die Kalibrierangaben der Geräte aktuell sind. Nachsehen, ob die Volumina in den einzelnen Wells der Platte identisch sind. 	
	Vermutete Kontamination bei der Probenzugabe		Bei der Vorbereitung nukleasefreie Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere und sterile Gefäße verwenden.
			Bei der Testvorbereitung Handschuhe tragen.
			Darauf achten, dass die Pipettenspitzen nur mit der ausgegebenen Lösung in Berührung kommen.
			Pipettenspitzen nicht mit den Händen berühren.
			Oberflächen im Labor mit geeigneten Substanzen reinigen.
	Verdampfung von Proben		Überprüfen, ob jedem Well Mineralöl zugesetzt wurde.
	Blasen in den Reaktionswells		Wenn möglich, Platten vor dem Fluoreszenzscan zentrifugieren.
Die hergestellten Reaktionsgemische wurden nicht im empfohlenen Zeitraum verwendet.		Reaktionsgemische innerhalb von 30 Minuten nach Herstellung aufbrauchen.	

Problem	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
Probe zeigt als Ergebnis „IND: gDNA niedrig“ an.	Zu wenige Zellen in der Probe	<ul style="list-style-type: none"> • Probe mischen und DNA-Extraktion wiederholen. • Überprüfen, ob zu jedem Well die richtigen Probenvolumina zugesetzt wurden. • Prüfen, ob für die DNA-Extraktion das richtige Verfahren angewendet wurde.
	Vermuteter Fehler bei der DNA-Extraktion	
	Nicht genug DNA im Test eingesetzt	
	DNA-Probenhemmung	DNA-Extraktion aus der Probe wiederholen.
		Gebrauchsanweisung beachten, besonders der Abschnitt Leistungseigenschaften (Störsubstanzen).
DNA-Probe(n) möglicherweise nicht vollständig denaturiert	Überprüfen, ob die Probe bei der richtigen Temperatur und ausreichend lange denaturiert wurde.	
Probe zeigt als Ergebnis „IND: HPV FOZ niedrig“ an.	Vermuteter Fehler bei der DNA-Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> • DNA-Extraktion aus der Probe wiederholen. • Prüfen, ob für die DNA-Extraktion das richtige Verfahren angewendet wurde. • Gebrauchsanweisung beachten, besonders der Abschnitt Leistungseigenschaften (Störsubstanzen).
	DNA-Probenhemmung	
Zu kleines Proben-DNA-Volumen	Unzureichendes Elutionsvolumen bei der DNA-Extraktion	DNA-Extraktion aus der Probe wiederholen.
		Prüfen, ob für die DNA-Extraktion das richtige Verfahren angewendet wurde.
Hohe Zahl von DNA-Proben mit positiven FAM-FOZ-Werten für alle drei Reaktionsgemische	Vermuteter Fehler bei der DNA-Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> • DNA-Extraktion aus der Probe wiederholen. • Prüfen, ob für die DNA-Extraktion das richtige Verfahren angewendet wurde.
	Kontamination des DNA-Extraktionsreagenzes vermutet	

LEITFADEN ZUR FEHLERBEHEBUNG FÜR DAS CERVISTA MTA-SYSTEM

Siehe Abschnitt zur Fehlerbehebung im Cervista MTA-Bedienerhandbuch (Bestellnummer MAN-02378-002) für das Cervista MTA-System.

BIBLIOGRAPHIE

1. National Cancer Institute website: www.cancer.gov (2008).
2. Meijer CJ, Snijders PJ, and Castle PE. 2006. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 103: 12-17.
3. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, and Solomon D. 2007. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 197(4): 346-55.
4. Sherman ME, Schiffman M, and Cox TJ. 2002. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *Jour Nat Can Inst* 94(2): 102-107.
5. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, and Mody DR. 2004. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the college of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Path Lab Med* 128: 1224-1229.
6. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287: 2120-2129.
7. Solomon D, Schiffman M, and Tarone R. 2001. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *Jour Nat Can Inst*; 93(4): 293-299.
8. Mayrand MH, E Duarte-Franco, I Rodrigues, SD Walter, J Hanley. 2007. A Ferenczy, S Ratnam, F Coutlée, EL Franco. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. *N Engl J Med* 357(16): 1579-1588.
9. Wheeler CM, WC Hunt, M Schiffman, PE Castle. 2006. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-Year risk of cervical cancer. *J Infect Dis* 194: 1291-1299.
10. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki A-B, Smith RA, Eyre HJ, Cohen C. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Can Jour Clin* 2002; 53: 342-362.
11. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, Hatch K, Noller KL, Roach N, Runowicz C, Saslow D. 2004. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 103: 304-309.
12. Hall JG, Eis PS, Law SM, Reynaldo LP, Prudent JR, Marshall DJ, Allawi HT, Mast AL, Dahlberg JE, Kwiatkowski RW, de Arruda M, Neri BP, and Lyamichev VI. 2000. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *PNAS* 97(15): 8272-8277.

Kontaktinformationen:



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 USA.

Kundensupport: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)
customersupport@hologic.com

Technischer Kundendienst: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Weitere Kontaktinformationen finden Sie unter www.hologic.com.

**Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft:**

Hologic Ltd.
 Heron House Oaks Business Park
 Crewe Road
 Wythenshawe, Manchester
 M23 9HZ, UK
 Tel: +44 (0)161 946 2206
 Fax: +44 (0)161 602 0995
 Email: AuthorisedRepresentativeEurope@hologic.com

HINWEIS FÜR EMPFÄNGER ÜBER BESCHRÄNKTE LIZENZ

Der Erhalt des Produkts von Hologic oder einem seiner Vertragshändler schließt eine begrenzte, nicht exklusive, nicht übertragbare, bestimmten Rechten unterliegende Lizenz für geistiges Eigentum von Hologic ein. Diese Lizenz dient nur zum Gebrauch des Produkts entsprechend dem vorgesehenen Verwendungszweck. Die beschränkte Lizenz berechtigt nicht zur Verwendung des Produkts in der Erforschung oder Entwicklung neuer Produkte, zur Herstellung von Produkten, Nachahmung des Produkts, Verbesserungen an der Produkttechnologie oder für andere kommerzielle Zwecke. Dem Kunden ist es nicht gestattet, dieses Produkt ohne ausdrückliche schriftliche Zustimmung von Hologic einer dritten Person zu irgendeinem Zweck zu übertragen. Außer der in diesem Abschnitt ausdrücklich erteilten Lizenz werden unter keinen Umständen andere Lizenzen gewährt.

Weitere Informationen hinsichtlich der Verfügbarkeit weiterer Lizenzen zur Ausführung der patentierten Methoden erhalten Sie von:

Legal Department, Hologic, Inc., 250 Campus Drive, Marlborough, MA, 01752, (508) 263-2900.

Dieses Produkt ist ggf. von mindestens einem US-Patent geschützt (siehe www.hologic.com/patents).

INGESCHRÄNKTE PRODUKTGARANTIE

GARANTIE. Die Funktionstüchtigkeit gemäß publizierten technischen Spezifikationen der Bestandteile, des Materials und der Software wird für den ursprünglichen Käufer für ein (1) Jahr nach Installationsdatum bzw. Empfangsdatum (je nachdem, welches zuerst eintritt) garantiert. Die Garantiezeit für Erweiterungen und Zubehör beträgt sechs (6) Monate. Röntgenröhren unterliegen einer linearen Pro-Rata-Garantie gemäß der entsprechenden Produktspezifikation („Garantiezeitraum“). Die Garantiezeit für Ersatzteile beläuft sich auf die verbleibende Gesamtgarantiezeit des Produkts oder mindestens neunzig (90) Tage ab Lieferung. Die Garantiezeit für Verbrauchsmaterialien gemäß den veröffentlichten Spezifikationen endet am Ablaufdatum, das auf der jeweiligen Verpackung aufgedruckt ist. Die fachgerechte Durchführung von Dienstleistungen ist ebenfalls garantiert. Hologic gibt keine Garantie dafür, dass der Gebrauch der Produkte unterbrechungsfrei oder fehlerfrei ist, oder dass Produkte mit von Hologic zugelassenen Produkten von Drittanbietern funktionieren. DIE GESAMTE GARANTIEVERPFLICHTUNG VON HOLOGIC IST AUSDRÜCKLICH AUF DIE REPARATUR ODER DEN AUSTAUSCH DES PRODUKTS (IM ERMESSEN VON HOLOGIC UND IN DER URSPRÜNGLICHEN LIEFERFORM) BZW. AUF BERICHTIGUNG DER BEANSTANDETEN DIENSTLEISTUNG BESCHRÄNKT; ODER HOLOGIC KANN NACH EIGENEM ERMESSEN EINEN BETRAG GEMÄSS DEM VOM KUNDEN ENTRICHTETEN PREIS ZURÜCKZAHLEN ODER GUTSCHREIBEN. DIESE GARANTIEVERPFLICHTUNG ERSETZT ALLE ANDEREN, NICHT AUSDRÜCKLICH HIER GENANNTEN GARANTIELEISTUNGEN, OB AUSDRÜCKLICH ODER STILLSCHWEIGEND, GESETZLICH ODER ANDERWEITIG, EINSCHLIESSLICH, ABER NICHT BESCHRÄNKT AUF STILLSCHWEIGENDE ZUSICHERUNGEN DER GEBRAUCHSTAUGLICHKEIT UND EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK. DIESE BESCHRÄNKTE GARANTIE WIRD AUSSCHLIESSLICH DEM URSPRÜNGLICHEN KÄUFER GEWÄHRT UND IST NICHT AUF DRITTPARTEIEN, EINSCHLIESSLICH DIE KUNDSCHAFT DES KUNDEN, ÜBERTRAGBAR. DIE GARANTIE ERLISCHT, SOBALD DAS PRODUKT DURCH DEN KUNDEN AN EINE PERSON ODER EIN UNTERNEHMEN ÜBERTRAGEN WIRD, DAS WENIGER ALS FÜNFZIG (50) PROZENT DER BESITZRECHTE AM PRODUKT HÄLT. IN EINIGEN US-BUNDESSTAATEN IST DER AUSSCHLUSS STILLSCHWEIGENDER GEWÄHRLEISTUNGEN RECHTSWIDRIG UND KANN DAHER NICHT ANGEWENDET WERDEN. JE NACH US-BUNDESSTAAT KÖNNEN WEITERE RECHTE GELTEN. Diese Garantie gilt nicht für Bestandteile, die: (a) durch Personal, das nicht durch Hologic bevollmächtigt wurde, repariert, umpositioniert oder verändert wurden, (b) hohen physischen Belastungen (einschließlich thermisch oder elektrisch), Bedienungsfehlern oder hoher Materialbelastung ausgesetzt wurden, (c) nicht entsprechend den Spezifikationen oder Anweisungen von Hologic aufbewahrt, unterhalten oder betrieben wurden, (d) als nicht durch die Garantie von Hologic gedeckt gekennzeichnet sind bzw. als Vorveröffentlichung oder im Ist-Zustand ausgeliefert wurden.

GARANTIEANSPRÜCHE UND RECHTSMITTEL. Im Falle eines Garantieanspruchs ersetzt Hologic die betreffenden Bestandteile oder Verbrauchsmaterialien durch neue oder reparierte Bestandteile. Hologic unternimmt angemessene Anstrengungen zur raschen Reparatur bzw. schafft Abhilfe für Softwaredefekte oder -fehler, die eine Funktionstüchtigkeit gemäß Spezifikationen verhindern. Wahlweise kann Hologic dem Kunden den Kaufpreis des defekten Bestandteils, der Komponente, der Software, des Verbrauchsmaterials oder der Dienstleistung rückerstatten. Ersetzte Artikel gehen in das Eigentum von Hologic über. Garantieansprüche können durch eine Kontaktaufnahme mit Hologic innerhalb des entsprechenden Garantiezeitraums bis dreißig (30) Tage nach Erkennung der Garantieverletzung oder -nichterfüllung geltend gemacht werden. Hologic muss in angemessenem Rahmen Verfügbarkeit und Inspektion aller betroffenen Materialien gewährt werden. Sollten Hologic und der Kunde keine Einigung bezüglich eines Garantieanspruchs erzielen und informiert der Kunde Hologic nicht innerhalb eines (1) Jahres nach Anspruchserhebung, verfallen alle rechtlichen Ansprüche des Kunden. Diese Rechtsmittel erschöpfen die Haftung durch Hologic. Es stehen dem Kunden keine weiteren Rechtsmittel bezüglich Garantieansprüchen nach Recht und Billigkeit zur Verfügung.

HAFTUNGSBESCHRÄNKUNG. HOLOGIC IST NICHT HAFTBAR FÜR SPEZIFISCHE SCHÄDEN, FOLGESCHÄDEN, SCHADENERSATZ, ENTSCHÄDIGUNGEN MIT STRAFZWECK ODER MANGELFOLGESCHÄDEN, ODER UNKOSTEN (U.A. AUCH GEWINNAUSFÄLLE, DATENVERLUST, NUTZUNGSAusFALL), DIE MITTELBAR ODER UNMITTELBAR AUS VERKAUF, UMGANG, WARTUNG ODER VERWENDUNG DES BESTELLTEN BZW. GELIEFERTEN PRODUKTS ODER AUS ZUSAMMENHÄNGENDEN UMSTÄNDEN ENTSTEHEN, AUSSER ES WURDE DURCH DIE PARTEIEN AUSDRÜCKLICH UND SCHRIFTLICH VEREINBART. MIT AUSNAHME VON PERSONENSCHÄDEN ODER TODESFÄLLEN AUFGRUND FAHRLÄSSIGER HANDLUNGEN BZW. VORSÄTZLICHER WIDERRECHTLICHER HANDLUNGEN ODER UNTERLASSUNGEN SEITENS HOLOGIC KANN HOLOGIC UNTER KEINEN UMSTÄNDEN BASIEREND AUF DELIKTEN, GARANTIEN, VERTRÄGEN ODER ANDEREN RECHTSGRUNDLAGEN HAFTBAR GEMACHT WERDEN FÜR ENTSCHÄDIGUNGEN, DIE DEN AN HOLOGIC ENTRICHTETEN KAUFPREIS, GEBÜHREN ODER ABGABEN ÜBERSCHREITEN.

Hologic, Cervista, Cleavase, Invader, Invader Call Reporter, PreservCyt und ThinPrep sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

Manche Komponenten der Nukleinsäureanalyse, wie z.B. spezifische Methoden und Zusammensetzungen zur Handhabung oder Visualisierung von Nukleinsäuren zur Analyse, können Gegenstand eines oder mehrerer der Patente Dritter sein. In ähnlicher Weise können Nukleinsäuren, die bestimmte Nukleotidsequenzen enthalten, patentiert sein. Für die Herstellung, die Verwendung oder den Verkauf solcher Komponenten oder Nukleinsäuren wird/werden unter Umständen eine Lizenz oder mehrere Lizenzen benötigt. Nichts in diesem Dokument sollte als Genehmigung oder stillschweigende Lizenz für die Herstellung, Verwendung oder den Verkauf von derartigen Komponenten oder Nukleinsäuren, die unter solche Patente fallen, interpretiert werden.

©2011-2016 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.
Teilenummer 15-3053-801, Revision 106