

Návod k použití testu *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA

IVD



Stanovení nukleové kyseliny in vitro hybridizačním testem se zesíleným signálem na mikrodestičce s použitím chemiluminiscence pro kvalitativní detekci 18 nízko rizikových a vysoce rizikových typů DNA lidského papillomaviru (HPV) s vysokým rizikem v cervikálních vzorcích.

Pro použití s:

S odběrovým zařízením *digene* HC2 HPV DNA

digene Specimen Transport Medium

Roztok Hologic PreservCyt[®]

Konzervační kapalina BD SurePath[®] Preservative Fluid



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
NĚMECKO

L2126cs Rev. 4



OBSAH

NÁZEV A ÚČEL POUŽITÍ	1
SOUHRN A VYSVĚTLENÍ.....	2
PRINCIP METODY	3
ČINIDLA A POSKYTNUTÉ MATERIÁLY	4
MATERIÁLY, KTERÉ JSOU VYŽADOVÁNY, ALE NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY	5
VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ	7
BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ	7
PROHLÁŠENÍ OHLEDNĚ BEZPEČNOSTI A RIZIK KOMPONENT	7
OPATŘENÍ PRO ZACHÁZENÍ S TESTEM	9
PŘÍPRAVA ČINIDEL A JEJICH USKLADNĚNÍ.....	10
ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY	14
CERVIKÁLNÍ VZORKY V STM	14
CERVIKÁLNÍ BIOPSIE	14
CERVIKÁLNÍ VZORKY V ROZTOKU PRESERVCYT	14
CERVIKÁLNÍ VZORKY V KONZERVAČNÍ KAPALINĚ SUREPATH PRESERVATIVE FLUID	15
POSTUP TESTU.....	16
TESTOVÁNÍ VYSOKOOBJEMOVÉ PROPUSTNOSTI VZORKŮ POMOCÍ SYSTÉMU RAPID CAPTURE SYSTEM	16
MANUÁLNÍ POSTUP	16
DENATURACE	17
VORTEXOVÁNÍ A DENATURACE	20
HYBRIDIZACE: METODY KOMBINOVANÉ SMĚSNÉ SONDY (CPC) A DVOU SOND	23
IMOBILIZACE HYBRIDU	25
DETEKCE HYBRIDU	26
PROMÝVÁNÍ	26
AMPLIFIKACE SIGNÁLU.....	28
OVĚŘOVACÍ KRITÉRIA PRO KALIBRACI STANOVENÍ	29
VÝPOČET HRANIČNÍ HODNOTY.....	31
KONTROLA KVALITY	32
INTERPRETACE VÝSLEDKŮ PRO VZORKY	33
CHARAKTERISTIKY CHOVÁNÍ	34
ÚDAJE NA PODPORU INDIKACE HPV S NÍZKÝM A S VYSOKÝM RIZIKEM	34
ÚDAJE PODPORUJÍCÍ INDIKACI HPV S VYSOKÝM RIZIKEM Z PRIMÁRNÍHO SCREENINGU.....	38
ANALYTICKÁ CITLIVOST	40
ÚČINNOST KOMBINOVANÉ SMĚSNÉ SONDY (CPC).....	41
EKVIVALENCE MEZI VZORKY STM A ROZTOKU PRESERVCYT	41
KORELACE VÝSLEDKU VZORKŮ SUREPATH SE VZORKY STM V KLINICKÉ POPULACI	41
REPRODUKOVATELNOST.....	42
SONDA PRO VYSOCE RIZIKOVÝ HPV.....	43
ZKŘÍŽENÁ REAKTIVITA	44
PANEL ZKŘÍŽENÉ REAKTIVITY	44
ZKŘÍŽENÁ HYBRIDIZACE	45
VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY STM.....	45
VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY ROZTOKU PRESERVCYT	45
REPRODUKOVATELNOST TESTU <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA S KLINICKÝMI VZORKY ODEBRANÝMI V STM	45
RLU/CO	46
REPRODUKOVATELNOST TESTU <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA S KLINICKÝMI VZORKY ODEBRANÝMI V ROZTOKU PRESERVCYT	46
RLU/CO	47
REPRODUKOVATELNOST TESTU <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA S KLINICKÝMI VZORKY ODEBRANÝMI V KONZERVAČNÍ KAPALINĚ SUREPATH	47
REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKU SUREPATH PŘI POUŽITÍ SYSTÉMU RAPID CAPTURE PRO ZPRACOVÁNÍ ANALÝZY	48

OMEZENÍ POSTUPU	49
LITERATURA	50
ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	53
TESTOVÁNÍ NA KONTAMINACI.....	57
KONTAKTNÍ INFORMACE QIAGEN	59

NÁZEV A ÚČEL POUŽITÍ

Pro diagnostické použití in vitro.

Test *digene* HC2 HPV DNA využívající technologii Hybrid Capture[®] 2 (HC2) je hybridizační analýza nukleové kyseliny s amplifikací signálu používající chemiluminiscence mikrodestičky ke kvalitativní detekci 18 nízko rizikových a vysoce rizikových typů DNA lidského papillomaviru HPV v cervikálních vzorcích.

Cervikální vzorky, které lze zkusit testem *digene* HC2 HPV DNA, obsahují následující:

- Vzory odebrané odběrovým zařízením *digene* HC2 DNA
- Vzorky odebrané odběrovým zařízením kartáčkového typu nebo kombinací kartáčku/špachtle a vložené do roztoku PreservCyt (viz návod k použití sady pro konverzi vzorku *digene* HC2, kde jsou všechny podrobnosti)
- Vzorky odebrané v konzervační tekutině SurePath (POUZE pro testování vysoce rizikových typů HPV)
- Bioptické vzorky uložené v transportním médiu *digene* Specimen Transport Medium (STM) (Médium pro přepravu vzorků)

Při používání nízko rizikových a vysoce rizikových sond HPV je použití tohoto testu indikováno:

- jako pomůcka při diagnóze sexuálně přenosných infekcí HPV u typů HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.
- Pro rozlišení mezi dvěma skupinami DNA HPV: nízko rizikové typy HPV 6, 11, 42, 43 a 44 a vysoce rizikové typy HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68 s tím, že přítomný specifický typ HPV není možné určit.

V případě použití sondy HPV s vysokým rizikem, je použití tohoto testu určeno pro:

- K detekci vysoce rizikových HPV typů 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, a 68, u nichž se prokázalo, že jsou primárním kauzálním faktorem při vzniku nádorového onemocnění cervixu.
- Jako výchozí všeobecný screeningový test populace pro použití se stěrem z děložního čípku nebo bez něj s cílem identifikovat ženy se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění děložního čípku nebo přítomností vysoce rizikového onemocnění děložního čípku. Diagnóza HPV má rostoucí indikativní schopnost ohledně onemocnění děložního čípku s rostoucím věkem.
- Jako kontrolní test u pacientek po abnormálních výsledcích stěru z děložního čípku nebo po onemocnění děložního čípku pro rozhodnutí o nutnosti doporučit pacientku ke kolposkopii nebo na jiné kontrolní výkony.
- Jako kontrolní test u pacientek s výsledky stěru z děložního čípku ukazujícími na skvamózní intraepitelovou lézi nízkého stupně (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion - LSIL) nebo skvamózní intraepitelovou lézi vysokého stupně (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion - HSIL) před kolposkopií. U těchto pacientek výsledek testu *digene* HC2 HPV DNA pomůže lékařům s léčbou pacientky tím, že usnadní hodnocení rizika u žen, při rozhodování o absenci onemocnění vysokého stupně.

Test *digene* HC2 HPV DNA by se měl používat ve spojení s klinickými informacemi odvozenými od jiných diagnostických a screeningových testů, fyzikálních vyšetření a úplné anamnézy v souladu s příslušnými postupy pro léčení pacientů. Výsledky testu *digene* HC2 HPV DNA by se neměly používat jako výhradní základna pro klinické vyšetření a léčbu pacientek.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Přítomnost určitých typů HPV v ženských pohlavních orgánech je spojena s řadou onemocnění, například kondylom, Bowenoidní papulóza, cervikální, vaginální a vulvární intraepiteliální neoplazie a karcinom¹⁻³. Všeobecně se má za to, že tyto viry se přenáší převážně pohlavní cestou a že vysoce rizikové HPV typy jsou hlavním uznávaným rizikovým faktorem pro vznik nádorového onemocnění děložního čípku⁴⁻⁸.

Lidské papillomaviry se skládají z ikosahedrální virové částice (virionu), jež obsahuje dvouvláknovou kruhovou molekulu DNA s 8 000 páry bází a která je obklopena proteinovým kapsidem. Po infekci epiteliálních buněk se virová DNA vytvoří v celé tloušťce epitelu, ale intaktní viriony se nachází pouze v horních vrstvách tkáně. Proto lze virovou DNA nalézt buď ve virionech nebo jako epizomální či integrované HPV sekvence v závislosti na typu a stupni léze.

V současnosti nelze HPV kultivovat in vitro a ke stanovení cervikální infekce HPV jsou imunologické testy inadequate. Nepřímý důkaz o anogenitální HPV infekci lze získat fyzikálním vyšetřením a přítomností charakteristických buněčných změn spojených s virovou replikací ve vzorcích stěru z děložního čípku nebo biopsie. Alternativně lze biopsie analyzovat hybridizací nukleové kyseliny pro přímou detekci přítomnosti DNA HPV.

Historicky se typy HPV 16 a 18 považují za vysoce rizikové typy spojené s karcinomem (8–10). U typů HPV 31, 33 a 35 byla prokázána bezprostřední spojitost s nádorovým onemocněním^(2, 11–14). Navzdory tomuto užitečnému konceptuálnímu rámci těchto 7 typů HPV společně představuje přibližně 70 % cervikálních neoplazmat (9–11). Další typy HPV, včetně 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68, byly identifikovány jako hlavní typy HPV, jež bylo možné detekovat ve zbývajících lézích^(15–20, 32–26). Tyto typy HPV lze rovněž na základě jejich relativní distribuce v různých histopatologických diagnostických kategoriích charakterizovat jako nízko, středně až vysoce rizikové skupiny^(21, 32–37).

Bylo prokázáno, že DNA HPV je přítomna u přibližně 10 % žen s normálním cervikálním epitelem, ale skutečná prevalence ve specifických skupinách žen je silně ovlivněna věkem a jinými demografickými proměnnými^(2, 10, 21, 31). Prospektivní studie prokázaly, že u 15–28 % žen, které byly pozitivně testovány na DNA HPV, se rozvinuly skvamózní intraepiteliální léze (SIL) do 2 let v porovnání s pouze 1–3 % žen, u nichž byly testy na DNA HPV negativní^(22, 23). Zvláště bylo větší riziko progresu u typů HPV 16 a 18 (přibližně 40 %) než u jiných typů HPV⁽²²⁾.

PRINCIP METODY

Test *digene* HC2 HPV DNA, využívající technologii HC2, je analýza imobilizace protilátek pomocí hybridizace se zesíleným signálem, která využívá detekci chemiluminiscence mikrodestičky. Vzorky, obsahující cílovou DNA, hybridizují se směsí HPV specifické RNA sondy. Výsledné hybridy RNA:DNA jsou zachyceny protilátkami, specifickými pro hybridy RNA:DNA, kterými je potažen povrch jamek mikrodestičky. Zachycené hybridy potom reagují s protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou, specifickými pro hybridy RNA:DNA, a jsou detekovány chemiluminiscenčním substrátem. Na každou protilátku se konjugují některé molekuly alkalické fosfatázy. Více konjugovaných protilátek navázaných na každý zachycený hybrid způsobuje značnou amplifikaci signálu. Substrát je štěpen konjugovanou alkalickou fosfatázou a dojde k vyzáření světla. Světelné kvantum je měřeno luminometrem a vyjádřeno v relativních světelných jednotkách (RLU). Intenzita vyzářeného světla indikuje přítomnost či nepřítomnost cílové DNA ve vzorku.

Výsledek měření RLU, shodné či větší než hodnota hranice positivity, znamená přítomnost sekvencí DNA HPV ve vzorku. Je-li hodnota RLU nižší než hodnota hranice positivity, znamená to, že specifická testovaná sekvence DNA HPV není přítomna, nebo že testované úrovně DNA HPV jsou pod detekčním limitem stanovení.

Testování s vysokoobjemovou propustností vzorků testem *digene* HC2 HPV DNA lze provádět pomocí systému Rapid Capture[®] RCS. Daný přístroj dokáže zpracovat až 352 vzorků za osm hodin. Aby bylo možné velké množství testů zvládnout, všechny kroky zkoušky provádí RCS, kromě denaturace vzorku, chemiluminiscenční detekce signálu a vyhodnocení výsledků.

ČINIDLA A POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Je tu 96 testů v 1 sadě testu digene HC2 HPV DNA (katalogové číslo 5196-1330). Počet výsledků, získaných od pacientek, se bude lišit v závislosti na tom, kolikrát se každá souprava použije:

1 použití = 40 výsledků pacientů (nízko rizikových a vysoce rizikových)

2 použití = 32 výsledků pacientů (nízko rizikových a vysoce rizikových)

- 1 x 0,35 ml **Barva indikátoru**
obsahuje 0,05 % azidu sodného.
- 1 x 50 ml **Denaturační činidlo**
zředěný roztok hydroxidu sodného (NaOH).
- 1 x 5 ml **Rozpouštědlo sondy**
pufrovací roztok s 0,05 % azidu sodného.
- 1 x 150 µl **Sonda nízko rizikového HPV**
HPV 6/11/42/43/44 RNA směsná sonda v pufrovacím roztoku (zelené víčko).
- 1 x 100 µl **Sonda vysoce rizikového HPV**
HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 RNA směsná sonda v pufrovacím roztoku (červené víčko).
- 1 x 1 ml **Kontrola kvality nízko rizikového HPV**
5 pg/ml (500 000 kopií/ml) klonované DNA HPV 6 a nosič DNA v STM s 0,05 % azidu sodného.
- 1 x 1 ml **Kontrola kvality vysoce rizikového HPV**
5 pg/ml (500 000 kopií/ml) klonované HPV 16 DNA a nosičové DNA v STM s 0,05 % (objemových) azidu sodného.
- 1 x 2,0 ml **Negativní kalibrátor**
Nosičová DNA v médiu pro transport vzorků s 0,05 % objemových azidu sodného
- 1 x 1,0 ml **Kalibrátor nízko rizikového HPV**
1 pg/ml klonované HPV 11 DNA a nosičové DNA v STM s 0,05 % objemových azidu sodného
- 1 x 1,0 ml **Kalibrátor vysoce rizikového HPV**
1 pg/ml klonované HPV 16 DNA a nosičové DNA v STM s 0,05 % objemových azidu sodného
- 1 x 1 **Imobilizační mikrodestička**
potažená protilátkami hybridu anti-RNA:DNA.
- 1 x 12 ml **Detekční reagensie 1**
protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou na hybridy RNA:DNA v pufrovacím roztoku s 0,05 % azidu sodného.
- 1 x 12 ml **Detekční reagensie 2**
CDP-Star® s Emerald II (chemiluminiscenční substrát).
- 1 x 100 ml **Koncentrát promývacího pufru**
obsahuje 1,5 % azidu sodného.

MATERIALY, KTERÉ JSOU VYŽADOVÁNY, ALE NEJSOU SOUČÁSTÍ SOUPRAVY

Diagnostické zařízení Hybrid Capture System *In Vitro* a příslušenství^A

Systém *digene* Hybrid Capture 2 („systém *digene* HC2“), se skládá z luminometru schváleného QIAGEN („přístroj DML“), osobního počítače schváleného QIAGEN a počítačových periferních zařízení (monitor, klávesnice, myš, tiskárna a kabel k tiskárně), softwaru systému *digene* HC2 System Software („software *digene* pro kvalitativní analýzu“), protokolů analýzy systému *digene* HC2 System Assay Protocols for HPV, softwaru LumiCheck Plate a příručky uživatele pro software systému *digene* HC2 System Software User Manual

Hybrid Capture System Rotary Shaker I

Hybrid Capture System Microplate Heater I

Hybrid Capture System Automated Plate Washer

Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (volitelné)^B

Konverzní stojan a víko na stojan (volitelně)

Stojan na vzorky a víko *stojanu digene* (volitelné)

Pipetovač a stojan EXPAND-4 (volitelné)^C

Odběrové zařízení *digene* HC2 DNA^D

Dávkovač zařízení pro utěsnění zkumavek a řezací zařízení (volitelné, používá se s třepačkou MST Vortexer 2)

Zařízení a příslušenství běžně používaná v laboratoři

Vodní lázeň (65±2 °C) dostatečně velká, aby mohla pojmut buď jeden konverzní stojan (36 x 21 x 9 cm) nebo stojany pro odběrové zkumavky

Mikrocentrifuga (volitelná položka pro centrifugaci mikrozkušavek se sondami, aby se získal maximální objem sondy)

Vortexová míchačka s kalíškovým nástavcem

Jednokanálová pipeta; měnitelné nastavení pro objemy 20-200 µl a objemy 200-1000 µl

Opakovací pipetovač s pozitivním výtlačkem, například Eppendorf® Repeater® Pipette nebo ekvivalentní

8kanálový pipetovač: nastavení pro objemy 25-200 µl

Časový spínač

Roztok chlomanu sodného, 5 % v/v (či domácí bělicí prostředek)

Parafilm® nebo ekvivalent

Pipetovací špičky (na jedno použití) s aerosolovým filtrem pro jednokanálový pipetovač (20 do 200 µl a 200-1000 µl)

Jednorázové špičky pro pipetu Eppendorf Repeater Pipette (25 a 500 µl)

Špičky (na jedno použití) pro 8kanálový pipetovač (25 až 200 µl)

Tampóny Kimtowels® nebo odpovídající papírové ručníky, které neuvolňují vlákno

Kryt laboratorního stolu k jednorázovému použití

Rukavice bez mastku

Polypropylenové zkumavky s obsahem 5 ml nebo 15 ml, s kulatým dnem a snímatelným víčkem (pro ředění sondy)

2 ml polypropylenové centrifugační kónické zkumavky s víčky

Další zařízení a příslušenství pro zpracování vzorků v konzervační tekutině Surepath Preservative Fluid

Výkynná korečková odstředivka, která může dosáhnout 800 ± 15 x g a pojme 15 ml kónické polypropylenové odstředivací zkumavky

Zkumavky *digene* HC2 pro konverzi vzorků (15 ml kónické zkumavky)^F

7ml přenosné pipety se standardní špičkou nebo ekvivalentní

Transportní médium pro vzorky QIAGEN

Jednorázové špičky pro pipetu Eppendorf Repeater Pipette (100 µl)

Systém Rapid Capture (volitelný pro testování vysokoobjemové propustnosti vzorků)^E

Mycí přístroj

Hybridizační mikrodestičky

Víčka na mikrodestičky

Prázdné pruhy mikrodestičky (k dispozici od Costar, model číslo 2581); volitelné pro použití s automatickou promývačkou desky

Speciální dlouhé pipetové špičky pro pipetování vzorků

Zkumavky pro odběr vzorků

Stojánek na zkumavky pro odběr vzorků

Šroubovací uzávěry zkumavek pro odběr vzorků

Zásobní láhve na jedno použití s činidly

Těsnicí fólie zkumavek DuraSeal™

Hybridizační mikrozkušavky

Stojánek na mikrozkušavky

Krycí fólie na destičku

Další zařízení a příslušenství nutné pro zpracování vzorků pomocí PreservCyt Solution

Výkynná korečková odstředivka, která může dosáhnout 2900 ± 150 x g a pojme 10ml nebo 15ml kónické polypropylenové odstředivací zkumavky

5ml sérologické pipety nebo přenosné pipety na odebrání vzorků

Sada *digene* HC2 Sample Conversion^A.

Jednorázové špičky pro pipetu Eppendorf Repeater Pipette (50 a 100 µl)

Pro manuální vortexovací postup:

Zkumavky *digene* HC2 pro konverzi vzorků (15 ml kónické)^F, 10 ml kónické zkumavky Sarstedt s uzávěry nebo 15ml polypropylenové centrifugační zkumavky s kónickým dnem s uzávěry značky VWR® nebo Corning®
Stojan na 10 ml nebo 15 ml kónické zkumavky

Pro postup pro vortexování pomocí třepačky Vortexer 2 pro více vzorků

Zkumavky *digene* HC2 pro konverzi vzorků (15 ml kónické)^F
MST Vortexer 2 pro více vzorků
Konverzní stojan a víko na stojan (určený pro 15 ml kónické zkumavky)
Zásobník těsnicí fólie pro zkumavky a řezačka
Těsnicí fólie pro zkumavky DuraSeal (použitá s třepačkou MST Vortexer 2)

^A QIAGEN dodává pouze zařízení a příslušenství validované testy *digene* HC2 HPV DNA.

^B Rovněž požadované pro použití při provádění poloautomatické aplikace RCS.

- ^C Zákaznická položka. Jiné multikanálové pipetovací zařízení s nastavitelnou vzdáleností mezi špičkami může být použito podle potřeby. Předpoklad je, že může být dosaženo vzdálenosti špiček 3,2 cm v rozloženém stavu. Jako alternativa může být použita jednokanálová pipeta, kterou lze pipetovat 75 µl.
- ^D Charakteristiky chování testu *digene* HC2 HPV DNA byly určeny pouze pro vyznačené odběrové sady.
- ^E Pokyny konkrétně se týkající používání tohoto systému pro testování vysokokoobjemové propustnosti vzorků s touto analýzou viz Příručka uživatele Rapid Capture System.
- ^F Zkumavky pro konverzi vzorků *digene* HC2 (značka VWR nebo Corning[®]) dodávané QIAGEN se musí používat pro zajištění správného provedení analýzy při použití postupu s třepačkou Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

PŘEČTĚTE SI POZORNĚ VŠECHNY INSTRUKCE PŘEDTÍM, NEŽ POUŽIJETE TEST.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

VŠECHNY VZORKY by měly být považovány za potenciálně infekční. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplnou jistotu, že vzorky nebudou přenášet infekci. Doporučujeme, aby se s lidskými vzorky zacházelo v souladu s patřičnou praxí platnou pro biologickou bezpečnost v daném státě či místě. Tyto postupy pro biologickou bezpečnost používejte s materiály, které obsahují infekční látky nebo u nichž je na to podezření. Tato bezpečnostní opatření zahrnují zejména následující:

1. Nepipetujte ústy.
2. V místech, kde se pracuje s reagensy nebo vzorky nekuřte, nejezte ani nepijte.
3. Při nakládání s reagensy nebo vzorky používejte jednorázové rukavice neobsahující prášek-. Po provedení testu si důkladně omyjte ruce.
4. Vyčistěte a dezinfikujte veškeré úniky vzorků pomocí tuberkulocidního dezinfekčního činidla, jako je na příklad 0,5 % (objemových) chlornan sodný nebo jiné vhodné dezinfekční činidlo.^{42,43}
5. Asanujte a zlikvidujte všechny vzorky, činidla a jiné potenciálně kontaminované materiály podle národních a místních předpisů.

Některé reagensy obsahují azid sodný. Uvádí se, že azid sodný reaguje v laboratorních odpadních rozvodech za vzniku azidu olova či mědi. Tyto azidy mohou při úderu, např. kladivem, explodovat. Aby se zabránilo vzniku azidu olova či mědi, po likvidaci roztoků obsahujících azid sodný důkladně odpadní potrubí propláchněte vodou. Podle US Úřadu pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci, jsou doporučena následující opatření k odstranění kontaminace ze starých výlevků, kde je podezření, že se akumulovaly azidy: (1) odsajte kapalinu ze sifonu výlevky za použití gumové nebo plastické hadice, (2) naplňte sifon roztokem 10 % hydroxidu sodného, (3) ponechte po dobu 16 hodin a (4) dobře propláchněte vodou.

Automatické testování RCS

Další varování a bezpečnostní opatření konkrétně se týkající používání tohoto systému pro testování vysokokoobjemové propustnosti vzorků viz *Příručka uživatele Rapid Capture System*.

PROHLÁŠENÍ OHLEDNĚ BEZPEČNOSTI A RIZIK KOMPONENT

Pro komponenty sady *digene* HC2 HPV DNA Test platí následující R-věty a S-věty:

Koncentrát promývacího pufu



Obsahuje: azid sodný: Varování! Zdraví škodlivý při požití. Škodlivý pro vodní organismy s dlouhotrvajícími účinky. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Zneškodněte obsah/obal ve schváleném zařízení ke zneškodňování odpadu.

Denaturační reagensie



Obsahuje: hydroxid sodný. Pozor! Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může být korozivní pro kovy. Zneškodněte obsah/obal ve schváleném zařízení ke zneškodňování odpadu. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po několik minut. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

Skladujte uzamčené. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Rozpouštědlo sondy



Obsahuje: kyselinu octovou, kyselinu polyakrylátovou. Pozor! Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Zneškodněte obsah/obal ve schváleném zařízení ke zneškodňování odpadu. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po několik minut. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. Skladujte uzamčené. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Kalibrátor pro vysoce rizikový HPV

Varování! Slabě dráždí kůži. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Kalibrátor nízko rizikového HPV

Varování! Slabě dráždí kůži. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Kontrola kvality pro vysoce rizikový HPV

Varování! Slabě dráždí kůži. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Kontrola kvality pro nízko rizikový HPV

Varování! Slabě dráždí kůži. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.


Negativní kalibrátor

Varování! Slabě dráždí kůži. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.


Další informace

Bezpečnostní datové listy: www.qiagen.com/safety

OPATŘENÍ PRO ZACHÁZENÍ S TESTEM

1. Pro diagnostické použití in vitro.
2. Cervikální kartáček se používá pouze u žen, které nejsou těhotné.
3. Nepoužívejte reagentie po době použitelnosti vyznačené u symbolu  na štítku.
4. Provedení testu mimo uvedená časová a teplotní rozmezí a limity může poskytnout neplatné výsledky. Stanovení, která nespádají do určených rozsahů času a teploty, musí být opakována.
5. Pro zajištění spolehlivých výsledků testu se musí přísně dodržovat postup testu *digene* HC2 HPV DNA, ověřovací kritéria kalibrace analýzy, kontrola kvality a interpretace výsledků vzorků.
6. Je důležité odpipetovat přesný objem požadovaného činidla a vše dobře promísit po každém přidavku činidla. Nesplnění tohoto požadavku by mohlo vést chybným výsledkům testu. Zjištění, že došlo k popsáním barevným změnám, potvrzuje, že tyto podmínky byly splněny.
7. Součásti soupravy byly přezkoušeny jako ucelená jednotka. **Nezaměňujte** jednotlivé součásti za součásti z jiných zdrojů nebo z jiných šarží.
8. Nukleové kyseliny jsou velmi citlivé na degradaci nukleázy v prostředí. Nukleázy jsou přítomny na lidské kůži a na površích či materiálech, a nimiž lidé manipulovali. Vyčistěte a zakryjte pracovní povrchy jednorázovým krytem laboratorního stolu a **při provádění všech úkonů analýzy noste rukavice neobsahující prášek.**
9. Chraňte během provádění analýzy před kontaminací exogenní alkalickou fosfatázou imobilizační mikrodestičku a detekční reagentii 2. Látky, které mohou obsahovat alkalickou fosfatázu zahrnují detekční činidlo 1, bakterie, sliny, vlasy a oleje kožního původu. **Zakrytí imobilizační mikrodestičky po promývacím stupni a během inkubace s detekční reagentií 2 je zvláště důležité, protože exogenní alkalická fosfatáza může reagovat s detekční reagentií 2 a může vést k falešně pozitivním výsledkům.**
10. Chraňte detekční reagentii 2 před vystavením přímému světlu po delší dobu. Použijte detekční reagentii 2 bezprostředně po odebrání alikvotního podílu a zabraňte vystavení přímému slunečnímu světlu.
11. Opakovací pipeta by měla být předem několikrát naplněna činidlem, než se začne s dávkováním. Pozornost musí být periodicky věnována větším vzduchovým bublinám. Nadměrný počet velkých vzduchových bublin v dávkovací pipetě může způsobit nepřesné dávkování. Předějit tomu lze tak, že se pipeta zcela naplní, pak se úplně vypustí a znovu se naplní. Konkrétní pokyny pro použití najdete v instrukční příručce, poskytnuté prodejcem pipetovacího zařízení.
12. Pipetování multikanálovou pipetou při dávkování detekčních reagentií 1 a 2 by mělo být provedeno pomocí reverzní pipetovací techniky (viz *Detekce hybridu*). Zkontrolujte špičku každé pipety na multikanálové pipetě, zda je dobře nasazena a zda je v pořádku plnění.
13. Zajistěte, aby každá jamka mikrodestičky byla důkladně propláchnutá, jak je uvedeno v pokynech pro ruční promývání. Nedostatečné promytí bude mít za následek zvýšenou hodnotu pozadí a může způsobit falešně pozitivní výsledky. Zbytky promývacího pufu v jamkách mohou mít za následek redukcí signálu a špatnou reprodukovatelnost.
14. Nechte ohřívač Microplate Heater I systému hybridní imobilizace zapnutý nejméně 60 minut, aby dosáhl rovnováhu při $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ze studeného startu. Nedostatečný čas určený pro toto zahřívací období by mohl vést k roztavení hybridizační mikrodestičky. Viz *Uživatelská příručka Microplate Heater I*, kde jsou podrobnosti.

PŘÍPRAVA ČINIDEL A JEJICH USKLADNĚNÍ

- Po doručení sadu uchovávejte při 2–8°C. Wash Buffer Concentrate (koncentrát promývacího pufru), Denaturation Reagent (denaturační reagencie) a Indicator Dye (barva indikátoru) lze uchovávat při 2–30°C podle požadavků.
- Nepoužívejte po uplynutí záruční doby vyznačené vedle symbolu  na štítku krabice, nebo připravená činidla po záruční lhůtě (viz níže).
- Všechna činidla jsou připravena pro okamžité použití, s výjimkou denaturačního činidla, HPV sond pro nízké a vysoké riziko a koncentrovaný promývací pufr.

Pro testování vzorků na přítomnost jakéhokoliv z 18 typů HPV je k dispozici metoda kombinované směsné sondy (CPC). Pro testování této možnosti se musí připravit směs kombinovaných sond smícháním naředěné směsi Low-Risk HPV Probe a naředěné High-Risk HPV Probe před vlastním provedením testu *digene* HC2 HPV DNA. Metoda dvou sond používá odděleně směsné sondy pro nízké a pro vysoké riziko. Nahlédněte do pracovního postupu níže.

Pro účely testování vysokoobjemové propustnosti vzorků viz Příručka uživatele systému Rapid Capture, kde jsou informace o přípravě směsi(i) HPV Probe, promývacího pufru, detekční reagencie 1 a detekční reagencii 2, protože tyto pokyny jsou specifické pro použití tohoto systému k testování vysokoobjemové propustnosti vzorků.

ČINIDLO	METODA PŘÍPRAVY
Denaturační reagencie	<p>Nejdříve připravte:</p> <ul style="list-style-type: none"> Přidejte 5 kapek Indicator Dye (barva indikátoru) do lahve Denaturation Reagent (denaturační reagencie) a důkladně promíchejte. Denaturační reagencie má mít homogenní tmavě fialovou barvu. Po přípravě je denaturační reagencie stabilní tři měsíce, když se uchovává při 2-8°C. Označte ji štítkem s novou dobou použitelnosti. Jestliže činidlo ztrácí barvu, přidejte tři kapky indikátorového barviva a před použitím důkladně promíchejte. <p>Varování: Denaturační činidlo je korozivní. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní prostředky pro oči a obličej. Při manipulaci postupujte opatrně.</p>
Směsná sonda HPV pro nízké riziko (připravená ze sondy HPV pro nízké riziko a činidel k naředění sondy)	<p>Připravte během denaturační inkubace vzorku:</p> <p>Důležité upozornění: Někdy dojde k zachycení sondy ve víčku zkumavky.</p> <p>Poznámka: Dbejte na to, aby nedošlo ke kontaminaci sondy a směsi sond Rnázou. Použijte pipetové špičky s aerosolovým filtrem pro pipetování sondy. Probe Diluent (rozpuštědlo sondy) je viskózní.</p> <p>Při přípravě sond HPV dbejte na důkladné promíchání. Během mísení musí být na kapalině vidět vznik víru (vortexu). Nedostatečné třepání může mít za výsledek redukci signálu.</p> <ul style="list-style-type: none"> Odstředujte krátce injekční lahvičku sondy Low-Risk HPV Probe Aby se na dno injekční lahvičky dostala kapalina. Jemným poklepem promíchejte. Určete požadované množství směsi Probe Mix (25 µl/test). Doporučuje se připravit více směsi sondy, aby se vykompenzoval objem ztrát ve špičkách nebo na stěnách zkumavky. Konzultujte navržené objemy v níže uvedeném seznamu. Doporučený nejnižší počet jamek pro každé použití 24. Je-li vyžadováno použití menšího počtu jamek než 24 v jednom provedení, celkový počet testů na jednu soupravu by se pak měl zredukovat s ohledem k omezenému objemu sondy a roztoku k naředění sondy. Převedte požadovaný objem Probe Diluent (rozpuštědlo sondy) do nové nádoby k jednorázovému použití. V závislosti na počtu testů se doporučuje použít buď 5 ml nebo 15 ml polypropylenové zkumavky s kulatým dnem s víčkem. K přípravě směsi sondy zředte HPV sondu pro nízké riziko v poměru 1:25 roztokem ke zředění sondy.

	<table border="1" data-bbox="534 205 1338 367"> <thead> <tr> <th data-bbox="540 205 805 264">počet testů/stripů</th> <th data-bbox="805 205 1083 264">objem roztoku ke zředění sondy*</th> <th data-bbox="1083 205 1331 264">objem sondy*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="540 264 805 296">48/6</td> <td data-bbox="805 264 1083 296">2,0 ml</td> <td data-bbox="1083 264 1331 296">80,0 µl</td> </tr> <tr> <td data-bbox="540 296 805 327">24/3</td> <td data-bbox="805 296 1083 327">1,0 ml</td> <td data-bbox="1083 296 1331 327">40,0 µl</td> </tr> <tr> <td data-bbox="540 327 805 367">na jamku</td> <td data-bbox="805 327 1083 367">0,045 ml</td> <td data-bbox="1083 327 1331 367">1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="597 378 1252 405">*Tyto hodnoty již v sobě zahrnují doporučený přídavný objem.</p> <p data-bbox="472 411 1398 520">Napipetujte Low-Risk HPV Probe (sonda nízké rizikového HPV) do Probe Diluent (rozpuštědlo sondy), kdy přiložíte špičku pipety k vnitřní stěně zkumavky těsně nad meniskus a vypudíte obsah. Zabraňte ponoření špičky pipety do roztoku ke zředění sondy.</p> <ul data-bbox="440 527 1398 636" style="list-style-type: none"> • Protřepávejte nejméně 5 sekund při maximální rychlosti pro důkladné promíchání. Musí dojít k viditelnému protřepání. Označte jako "Směsná sonda HPV pro nízké riziko" a uchovávejte v čisté, uzavřené nádobě až do okamžiku použití. Nepoužitá směs sondy by měla být zlikvidována. 	počet testů/stripů	objem roztoku ke zředění sondy*	objem sondy*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	na jamku	0,045 ml	1,8 µl
počet testů/stripů	objem roztoku ke zředění sondy*	objem sondy*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
na jamku	0,045 ml	1,8 µl											
směsná sonda HPV pro vysoké riziko	Připravte jako směsnou sondu HPV pro nízké riziko (viz výše). Označte jako "směsná sonda HPV pro vysoké riziko". Nepoužitá směs sondy by měla být zlikvidována.												
kombinovaná směsná sonda	Připravte jako směsné sondy HPV pro nízké riziko a HPV pro vysoké riziko (jak popsáno výše). Přidejte celý obsah zředěné směsné sondy HPV pro nízké riziko do zkumavky se zředěnou směsnou sondou HPV pro vysoké riziko. Míchejte do víru nejméně 5 vteřin při maximální rychlosti, pro dokonalé promísení. Musí dojít k viditelnému protřepání. Označte jako "kombinovaná směsná sonda HPV". Nepoužitá směs sondy by měla být zlikvidována.												

<p>Promývací pufr</p>	<p>Připravte během imobilizačního kroku:</p> <p>Promývací pufr pro Hybrid Capture System Automated Plate Washer (automatická promývačka destiček systému hybridní imobilizace) lze připravit dále popsáním způsobem a lze jej uložit do zakryté nádoby, případně připravit 1 litr a umístíte jej do promývací nádržky automatické promývačky destiček. Míchání objemů viz následující tabulka:</p> <p>Viz Automated Plate Washer Uživatelská příručka, kde naleznete pokyny ohledně péče a údržby.</p> <p>Varování: Koncentrát promývacího pufru je po požití toxický. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné pracovní pomůcky pro oči a obličej. Vystavení se koncentrovanému promývacímu pufru minimalizujete přidáním vody při přípravě.</p> <table border="1" data-bbox="487 504 1299 672"> <thead> <tr> <th>Množství promývacího pufru koncentrátu</th> <th>Množství destilované nebo deionizované vody</th> <th>Konečný objem promývacího pufru</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 ml</td> <td>2 900 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>Poznámka: Je velmi důležité, aby po celou dobu zůstala automatická promývačka destiček zapnutá. Je tak zajištěno proplachování, které je provedeno každých 8 hodin, kdy není jednotka v provozu.</p> <p>Před každou analýzou se přesvědčte, zda je prázdná odpadní nádoba automatické promývačky desek a proplachovací nádoba je naplněná destilovanou nebo deionizovanou vodou.</p> <p>Určeno pro metodu manuálního promývání destiček:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dobře promíchejte koncentrát promývacího pufru. • Rozředte 100 ml koncentrátu promývacího pufru 2,9 l destilované nebo deionizované vody v promývacím přístroji a dobře promíchejte (konečný objem by měl být 3 l). • Utěsněte obal, aby nedošlo ke kontaminaci nebo odpařování. <p>Takto připravený promývací pufr je stabilní po dobu tří měsíců při 2-30 °C. Označte štítkem s novou expirační dobou. Jestliže byl promývací pufr v lednici, před použitím ponechte stát při 20-25 °C, aby bylo dosaženo vyrovnání teploty.</p> <p>Doporučuje se, aby promývací přístroj a hadice byly vymyty 0,5 % roztokem chlornanu sodného a důkladně vypláchnuty destilovanou nebo deionizovanou vodou jednou za tři měsíce, aby se zabránilo možné kontaminaci alkalickou fosfatázou, přítomnou v baktériích a plísních.</p>	Množství promývacího pufru koncentrátu	Množství destilované nebo deionizované vody	Konečný objem promývacího pufru	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1 933,4 ml	2 l	100 ml	2 900 ml	3 l
Množství promývacího pufru koncentrátu	Množství destilované nebo deionizované vody	Konečný objem promývacího pufru											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1 933,4 ml	2 l											
100 ml	2 900 ml	3 l											

OBJEMY PŘEDEM PŘIPRAVENÝCH ČINIDEL**Detekční
reagencie 1 a
detekční
reagencie 2****Bezprostředně před použitím:**

Důkladně promíchejte reagenii, potom pečlivě odměřte příslušný objem detekční reagencie 1 nebo detekční reagencie 2 do čisté nádoby na reagencie podle dále uvedených pokynů. Tyto reagencie **SE NESMÍ** vrátit do původních lahví, aby nedošlo ke kontaminaci: **Po použití zlikvidujte nespotřebovaný materiál.** Jestliže není použita 8kanálová pipeta, je možné ji nahradit příslušným pipetovacím přístrojem s opakovanou akcí. V tomto případě by měly být alikvotní podíly činidla nadávkovány do polypropylénové zkumavky dostatečné velikosti, aby byl k dispozici požadovaný objem, jak je uvedeno níže.

Počet testů/ proužků	Objem detekční reagencie 1 nebo 2
96/12	obsah lahve
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 test	0,125 ml

ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE SE VZORKY

Cervikální vzorky odebrané a přepravované pomocí odběrového zařízení *digene* HC2 DNA (skládajícího se z cervikálního kartáčku a média pro transport vzorků *digene*) nebo vzorky odebrané odběrovým zařízením kartáčkového typu nebo kombinací kartáčku/špachtle a vložené do roztoku PreservCyt nebo cervikální vzorky odebrané v kapalině Sure Path Preservative Fluid jsou jedinými vzorky, které se doporučují pro použití s testem *digene* HC2 HPV DNA. Vzorky, které byly odebrány s použitím jiného systému pro odběr vzorků, nebo které byly přenášeny v jiných transportních médiích, nejsou způsobilé pro použití s tímto testem. Charakteristiky účinnosti této soupravy byly stanoveny pouze u těchto zmíněných odběrových souprav. V případě kolposkopického vyšetření je třeba cervikální vzorky odebrat před aplikací kyseliny octové nebo jódu. Viz návod k použití odběrového zařízení *digene* HC2 DNA Collection Device, kde naleznete další postupy pro odběr vzorků a nakládání s nimi.

CERVIKÁLNÍ VZORKY V STM

Vzorky STM mohou být skladovány do dvou týdnů při teplotě místnosti a odeslány bez zmrazení do testovací laboratoře. Vzorky by měly být odeslány v izolované nádobě, s použitím poštovní kurýrní služby pro zajištěnou dodávku do 2 dnů nebo přes noc. V testovací laboratoři by vzorky měly být uskladněny při 2-8 °C, jestliže se stanovení provede do jednoho týdne. Pokud se bude analýza provádět později než za jeden týden, uchovávejte vzorky při -20°C až 3 měsíce (před zmrazením viz *Poznámky v Cervikální biopsie*). Do STM bylo přidáno konzervační činidlo ke zpomalení bakteriálního růstu a k zachování neporušenosti DNA. **Není určeno** k zachování životaschopnosti organismů nebo buněk. Odběrové zařízení *digene* HC2 DNA Collection Device by se nemělo používat k odběru vzorků od těhotných žen.

CERVIKÁLNÍ BIOPSIE

Čerstvě odebrané cervikální biopsie o průměru 2-5 mm lze rovněž analyzovat testem *digene* HC2 HPV DNA. Biopsické vzorky se musí ihned uložit do 1,0 ml STM a uchovávat zmrazené při -20°C. Vzorky z biopsie lze přepravovat při teplotě od 2-30°C pro doručení přes noc do testovací laboratoře a uchovávat při -20°C až do zpracování. Vzorky biopsie o průměru menším než 2 mm nemohou být použity.

Poznámky: Aby se zabránilo uvolňování víček na zkumavkách se vzorky, které jsou posílány nebo uskladněny zmrazené:

- Krytky zakryjte fólií Parafilm před přepravou již dříve zmrazených zkumavek se vzorky. Vzorky lze přepravovat při teplotách 20-25°C.
- Při vyjímání vzorků z mrazničky pro testování neprodleně nahradte uzávěry šroubovacími krytkami zkumavek pro odběr vzorků.

CERVIKÁLNÍ VZORKY V ROZTOKU PRESERVCYT

Vzorky odebrané odběrovým zařízením kartáčkového typu nebo kombinací kartáčku/špachtle a vložené do roztoku PreservCyt pro použití při přípravě sklíček ThinPrep® Pap Test lze použít při testu *digene* HC2 HPV DNA. Vzorky je nutno odebrat rutinním způsobem a připravit sklíčka ThinPrep Pap Test podle pokynů z návodu k použití Hologic.

Poznámka: Pro test *digene* HC2 HPV DNA musí zůstat k dispozici nejméně 4 ml roztoku PreservCyt. Vzorky s méně než 4 ml po přípravě testu Pap Test nemusí obsahovat dostatečný materiál a mohly by vést k falešně negativnímu výsledku testu *digene* HC2 HPV DNA.

Po odběru a před zpracováním pro test *digene* HC2 HPV DNA uchovávejte vzorky roztoku PreservCyt až po dobu tří měsíců při teplotě 2 až 30°C. Vzorky roztoků PreservCyt nemohou být zmrazeny. Pokyny ke zpracování těchto vzorků viz *Postup přípravy vzorků PreservCyt*.

CERVIKÁLNÍ VZORKY V KONZERVAČNÍ KAPALINĚ SUREPATH PRESERVATIVE FLUID

(POUZE pro testování DNA vysoce rizikového HPV)

Ruční příprava vzorku u vzorků SurePath se provádí pomocí post-gradientních buněčných pelet, které vzniknou při přípravě sklíčka testu SurePath Pap Test. Připravte sklíčka SurePath Pap Test podle vhodných pokynů pro proces sklíčků BD PrepStain[®] Slide Processor.

Důležité upozornění: Bezprostředně po přípravě sklíčka SurePath Pap se musí do zkumavky v odstředivce obsahující zbytkové buněčné pelety pipetovat 2,0 ml kapaliny SurePath Preservative Fluid. Tím se zachová neporušenost post-gradientních buněčných pelet pro provedení testu *digene* HC2 HPV DNA.

Post-gradientní buněčná peleta s kapalinou SurePath Preservative Fluid může být uchovávána až po 4 týdny při 2–30 °C před přípravou vzorku pro test *digene* HC2 HPV DNA.

Vzorky post-gradientní buněčné pelety SurePath jsou připraveny způsobem stanoveným v tomto návodu k použití. Výsledkem ruční přípravy vzorku je denaturovaný vzorky připravený ke zpracování v rámci hybridizačního kroku testu.

POSTUP TESTU

Vzorky mohou obsahovat infekční látky a je zapotřebí s nimi podle toho nakládat. Test *digene* HC2 HPV DNA lze provádět ručně podle pokynů uvedených v tomto návodu k použití, nebo použít přístroj Rapid Capture System pro testování vysokoobjemové propustnosti vzorků.

TESTOVÁNÍ VYSOKOOBJEMOVÉ PROPUSTNOSTI VZORKŮ POMOCÍ SYSTÉMU RAPID CAPTURE SYSTEM

Rapid Capture System je automatický systém pro pipetování a ředění k všeobecnému použití, který lze použít s testem *digene* HC2 HPV DNA pro testování s vysokoobjemovou propustností vzorků. Tento systém dokáže zpracovat 352 vzorků za osm hodin, kdy po 3,5 h není nutný zásah uživatele; až 704 výsledků může být vygenerováno za 13 hodin. Denaturace vzorků připravovaných k testování se provádí mimo RCS, ještě před jejich umístěním na plošinu RCS. Navíc se provádí detekce chemiluminiscenčního signálu a vykazování výsledků pomocí offline DML přístroje společného jako pro ruční, tak RCS metody. Jednotlivé procedurální kroky testu *digene* HC2 HPV DNA se provádí v přesné posloupnosti jako při ručním testování. Pomocí zařízení RCS je možné stupňovitě zpracovávat až 4 mikrodestičky, kde každá z těchto mikrodestiček obsahuje vzorky a kontroly kalibrace a kvality potřebné k dané analýze.

Při používání systému Rapid Capture System naleznete další pokyny v *Rapid Capture System User Manual* (Příručka uživatele systému Rapid Capture) dodávaná s tímto přístrojem navíc k těmto návodům k použití pro nezbytné procedurální a popisné informace.

MANUÁLNÍ POSTUP

Uspořádání pokusu

1. Pokud budete používat ohřívač Microplate Heater I, **nechte jej zapnutý nejméně 60 minut, aby dosáhl rovnováhu při 65 °C ± 2 °C ze studeného startu.** Viz *Uživatelská příručka Microplate Heater I*, kde jsou podrobnosti.
2. Ověřte si, že je teplota vodní lázně 65°C a že je v ní dostatek vody na zakrytí celého objemu ve zkumavkách se vzorky.
3. Vyjměte vzorky a **všechny** požadované reagentie z mrazničky **před zahájením analýzy.** Nechte je 15 až 30 minut vytažené, aby dosáhly teploty 20-25 °C.

Poznámka: Připravte vzorky PreservCyt a SurePath dříve, než všechny předtím denaturované vzorky a reagentie dosáhnou rovnováhu s pokojovou teplotou.

4. Použijte analytický software pro analýzu *digene* k vytvoření uspořádání desek pro analýzu. Pokyny jak vytvořit uspořádání desek viz příslušná příručka uživatele.
5. Umístěte kontroly kalibrátoru a kvality a vzorky, jež mají být testovány, do stojanu zkumavek v tomtéž pořadí, ve kterém budou testovány. NEJDŘÍVE musí být testovány negativní kalibrátory, kalibrátory HPV pro nízké riziko a kalibrátory HPV pro vysoké riziko. Negativní kalibrátor (NC), kalibrátor HPV pro nízké riziko (LRC), nebo kalibrátor HPV pro vysoké riziko (HRC), kontrola kvality pro nízké riziko (QC1-LR), kontrola kvality pro vysoké riziko (QC2-HR) a vzorky jsou testovány v konfiguraci 8-mi jamkového sloupce. Viz *Příklad uspořádání* uvedení níže.

Příklad uspořádání pro běh s 24 jamkami na mikrodestičce:			
Řada	Sloupec		
	1	2	3
A	NC	Vzorek 1	Vzorek 9
B	NC	Vzorek 2	Vzorek 10
C	NC	Vzorek 3	Vzorek 11
D	LRC či HRC	Vzorek 4	Vzorek 12
E	LRC či HRC	Vzorek 5	Vzorek 13
F	LRC či HRC	Vzorek 6	Vzorek 14
G	QC1-LR	Vzorek 7	Vzorek 15
H	QC2-HR	Vzorek 8	Vzorek 16

6. Jestliže je používána metoda kombinované směsné sondy (CPC), NC, LRC a HRC jsou testovány kombinovanou směsnou sondou třikrát na stejné mikrodestičce. Použijte jamky A1, B1 a C1 pro NC a jamky D1, E1, F1, G1, H1 a A2 pro LRC, respektive HRC. Použijte jamky B2 a C2 pro kontroly kvality QC1-LR, respektive QC2-HR a vzorky začínající v D2. **Postup CPC nebyl validován pro použití se systémem Rapid Capture.**
7. Při metodě dvou sond proveďte testy směsné sondy pro nízké riziko HPV na levé straně mikrodestičky a testy směsné sondy pro vysoké riziko HPV na pravé straně mikrodestičky.
 NEJDŘÍVE testujte třikrát negativní kalibrátor (NC) a třikrát kalibrátor pro nízké riziko (LRC) směsnou sondou pro nízké riziko HPV. Pak testujte kontroly kvality (QC1-LR a QC2-HR) a vzorky jednotlivě, také s použitím směsné sondy pro nízké riziko HPV. Umístěte NC replikáty v A1, B1, C1; LRC replikáty v D1, E1, F1; QC1-LR v G1; QC2-HR v H1; a pak vzorky, počínaje od A2.
 POTOM testujte třikrát NC a třikrát kalibrátor pro vysoké riziko (HRC) s použitím směsné sondy pro vysoké riziko HPV. Pak testujte QC1-LR a QC2-HR vzorky jednotlivě, také s použitím směsné sondy pro vysoké riziko HPV. Umístěte NC replikáty v A7, B7, C7; HRC replikáty v D7, E7, F7; QC1-LR v G7; QC2-HR v H7; a pak vzorky, počínaje od A8. Viz příklad uspořádání výše.
 Viz příslušná uživatelská příručka, kde je správné nastavení Kalibrátoru/kontroly kvality/Vzorku v softwaru.
8. Jinou možností představuje uspořádání dvou oddělených mikrodestiček: tyto mohou být použity pro kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky testované jednak sondou HPV pro nízké riziko a jednak sondou HPV pro vysoké riziko. NC a LRC jsou testovány trojnásobně a QC1-LR a QC2-HR jsou testovány jednotlivě směsnou sondou HPV pro nízké riziko na jedné mikrodestičce; NC a HRC jsou testovány trojnásobně a QC1-LR a QC2-HR jsou testovány jednotlivě směsnou sondou HPV pro vysoké riziko na druhé mikrodestičce. Použijte jamky A1, B1, a C1 pro NC a jamky D1, E1, a F1 pro LRC nebo, respektive, HRC. Použijte jamky G1 a H1 pro kontroly kvality QC1-LR, respektive QC2-HR.
9. Vzorky mohou být testovány jednotlivě kombinovanou směsnou sondou, je-li použita metoda CPC, nebo jednotlivě směsnou sondou HPV pro nízké riziko a jednotlivě směsnou sondou HPV pro vysoké riziko, je-li použita metoda dvou sond.

DENATURACE

Poznámky:

- **Varování:** Denaturační činidlo je korozivní. Při práci postupujte opatrně a noste rukavice neobsahující prášek.
- **Důležité upozornění:** Některé cervikální vzorky mohou obsahovat krev či jiný biologický materiál, který může překrývat barevné změny po přidavku denaturačního činidla. Vzorky, které vykazují tmavou barvu před přidáním denaturačního činidla, nemohou vykazat v tomto kroku správnou barevnou změnu. V těchto případech selhání patřičné barevné změny neovlivní výsledky stanovení. Ověření správného smísení může být provedeno sledováním barevné změny pro kontroly kalibrátoru a kvality.
- Během denaturačních a hybridizačních kroků se ujistěte, že úroveň vody ve vodní lázni je dostatečná pro ponoření celého objemu vzorku ve zkumavce.
- Kalibrátory, kontroly kvality a vzorky lze připravovat až do denaturačního kroku a uchovávat při 28 °C přes noc nebo při -20 °C až po 3 měsíce. Smí se provést maximálně 3 cykly zmrazení/roztátí maximálně 2 hodiny při pokojové teplotě během každého cyklu roztátí. Před použitím dobře promíchejte.
- Po denuraci a inkubaci se vzorky již dále za infekční nepovažují.²⁶ Nicméně laboratorní personál musí i nadále dodržovat národní/místní bezpečnostní opatření.
- Neodstraňujte kartáček pro odběr vzorků z transportní zkumavky před denurací.
- Abyste se vyhnuli falešně pozitivním výsledkům, je naprosto nezbytné, aby všechny materiály - kontrola kalibrátoru, kvality a vzorky – přišly do styku s denaturačním činidlem. Třepání po přidání denaturačního činidla je kritickým krokem: **Zajistěte aby byla třepačka Multi-Specimen Tube**

Vortexer 2 nastavena na 100 (maximální otáčky) a během míchání byl viditelný vír kapaliny v takovém rozsahu, že kapalina bude omývat celý vnitřní povrch zkumavky. Jestliže provádíte vírové třepání manuálně, ujistěte se, že každá kontrola kalibrátoru, kvality a vzorek je míchán individuálně do víru (vortex), každý nejméně po dobu 5 vteřin při nejvyšší rychlosti tak, že vír kapaliny smáčí celý vnitřní povrch zkumavky. Pak zkumavku jednou obraťte dnem vzhůru.

Postup přípravy kontrol kalibrátorů, kvality a vzorků STM

1. Odstraňte a zlikvidujte víčka zkumavek kontrol kalibrátorů, kvality a vzorků.

Poznámka: Víčka sejmутá ze zkumavek se vzorky jsou potenciálně infekční. Likvidaci proveďte v souladu s národními/místními směrnicemi.

2. Napipetujte denaturační činidlo s indikátorovým barvivem do každé kontroly kalibrátoru, kvality a vzorku pomocí opakovací pipety nebo jednonanálové pipety. Postupujte opatrně, abyste se nedotkli stěn zkumavky – mohlo by dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků. Objem potřebného denaturačního činidla se rovná polovině objemu vzorku. Přesný objem pro každý typ kontroly kalibrátoru, kvality a vzorku je uveden níže v tabulce.

Zbytek denaturačního činidla v lahvičce zřed'te předtím než jej zlikvidujete v souladu s platnými státními/místními laboratorními postupy.

Kontrola kalibrátoru, kvality nebo vzorek	Požadované objemy denaturačního činidla
Negativní kalibrátor	1000 µl
Kalibrátor pro nízké či vysoké riziko	500 µl
Kontroly kvality pro nízké či vysoké riziko	500 µl
Cervikální vzorky	500 µl

3. Promíchejte vzorky za použití jedné ze dvou metod popsaných níže.

Metoda s třepačkou Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Poznámka: Vzorky z odběrového zařízení digene HC2 DNA míchané pomocí třepačky MST Vortexer 2 musí být hybridizovány metodou využívající hybridizační mikrodestičku a ohříváč Microplate Heater I

- a) Zakryjte zkumavky kalibrátoru, kontrol kvality a vzorků STM těsnicí fólií zkumavek DuraSeal přetažením fólie přes zkumavky ve stojanu.
- b) Umístěte víko stojanu nad zkumavky zakryté fólií a zajistěte na místě dvěma bočními svorkami. Řezacím zařízením odřízněte fólii.
- c) Umístěte stojan na třepačku Multi-Specimen Tube Vortexer 2 a stojan zajistěte svorkou. Dbejte na nastavení rychlosti na 100 (maximální rychlost) a zapněte otočte vypínačem napájení třepačky do polohy ON (zapnuto). Zkumavky protřepávejte 10 sekund.

Metoda manuálního třepání do víru (vortexing) pro jednotlivé zkumavky

- a) Znovu zakryjte zkumavky kalibrátoru, kontrol kvality a vzorků STM čistými šroubovými uzávěry zkumavek na odběr vzorků.
- b) Každou zkumavku jednotlivě důkladně promíchejte v třepačce při vysoké rychlosti po 5 sekund.
- c) Jednou obraťte každou zkumavku vzorku dnem vzhůru, aby se omyl vnitřek zkumavky, krytka a okrajový lem.
- d) Vraťte zkumavku do stojanu.

Při použití metody protřepávání **musí být během míchání viditelný vír kapaliny v každé zkumavce v takovém rozsahu, že kapalina bude omývat celý vnitřní povrch zkumavky.** Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky by měly změnit barvu na tmavě fialovou.

- Inkubace obsahu zkumavek probíhá ve stojanu umístěném ve vodní lázni při 65 ± 2 °C po dobu 45 ± 5 minut (denaturované kontroly, kalibrátory a vzorky mohou být testovány okamžitě, nebo uskladněny jak je popsáno výše v Poznámkách). Během této inkubace připravte směs(i) pro HPV sondu. Viz odstavec *Příprava reagensů a uchovávání*

Postup přípravy vzorků pro PreservCyt Solution

Poznámky:

- Prostudujte návod k použití sady *digene* HC2 Sample Conversion, kde naleznete všechny podrobnosti.
- Při manuálním testování stačí zpracování 4 ml dávky PreservCyt Solution pro dva testy. Minimální zpracovatelný objem je 4 ml.
- Vzorky PreservCyt Solution si připravte v dávkách 36 nebo menších; v opačném případě se pelety mohou uvolnit při dekantaci supernatantu. Je to důležité kvůli zachování integrity buněčné pelety během dekantace. Připravujete-li další lahvičky s PreservCyt Solution, nezačínáte je připravovat dříve, než dokončíte přípravu první dávky.

Příprava činidla

Použijte buď denaturační reagensii (DNR) dodávanou s testem *digene* HC2 HPV DNA (viz *Příprava reagensů a uchovávání*), nebo DNR dodávanou se sadou *digene* HC2 Sample Conversion. Pro přípravu DNR dodávané se sadou *digene* HC2 Sample Conversion přidejte 3 kapky barvy indikátoru do lahve DNR a dobře promíchejte. Výsledkem by měl být stejnorodý, tmavě fialový roztok. Požadavky na objem určíte podle Tabulky 1.

Tabulka 1
Požadavky na objem: Příprava činidla

Počet testů	Objem PreservCyt Solution	Objem pufru ke konverzi
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

- Označte zkumavku *digene* HC2 pro konverzi vzorků 10 ml kónickou zkumavku Sarstedt nebo 15 ml kónickou zkumavku značky VWR nebo Corning vhodným identifikačním číslem vzorku.
- Manipulace s jednotlivými vzorky:
 - Ručně silně zatřepejte lahvičkou PreservCyt, až se buňky homogenně rozptýlí.
 - Okamžitě, protože se buňky velice rychle usazují, napipetujte příslušné množství vzorku PreservCyt do označené zkumavky. Snažte se dostat roztok PreservCyt na dno kónické zkumavky a minimalizovat tak přilnutí buněčného materiálu ke vnitřní stěně zkumavky.
- Přidejte vhodný objem pufru pro konverzi vzorku do každé zkumavky (viz tabulka 1).
- Všechny zkumavky uzavřete a pomocí vortexové míchačky s kalíškovým nástavcem dobře promíchejte.

Poznámka: Postup s třepačkou MST Vortexer 2 nebyl validován pro vzorky s PreservCyt Solution s pufrům před odstředováním a proto se v tomto kroku nesmí používat.
- Odstředujte zkumavky ve výkyvném korečkovém rotoru při $2\ 900 \pm 150$ x g po 15 ± 2 minut.

6. Během odstředování si připravte směs transportního média/denaturačního činidla (STM/DNR) v poměru 2:1 (podle Tabulky 2).

Poznámka: Směs STM/DNR musíte připravit vždy čerstvou v den testu.

- a. Celkové množství požadované směsi STM/DNR určíte tak, že vezmete počáteční množství vzorku pro PreservCyt Solution jako vodičko a poté vynásobíte objemy STM a DNR pro jednu zkumavku počtem zpracovávaných vzorků (viz Tabulka 2).

Tabulka 2
Požadavky na objem: STM/DNR

Počet testů	Objem PreservCyt Solution	Objem STM pro jednu zkumavku pro koncovou směs STM/DNR*	Objem DNR pro jednu zkumavku pro koncovou směs STM/DNR*	Směs STM/DNR přidaná do zkumavky
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

* Objemy uvedené v těchto sloupcích se nesmí přidávat přímo do zkumavky se vzorkem.

- b. Protřepáním důkladně promíchejte roztok.
7. Vyměňte zkumavky po jedné z centrifugy a umístěte je na stojan nebo konverzní stojan. Růžová/oranžová peleta by měla být přítomna na dně každé zkumavky.
- Poznámka:** Vzorky, které po centrifugaci nemají viditelnou peletu, nejsou vhodné pro testování a měly by být zlikvidovány.

8. Manipulace s každou zkumavkou jednotlivě:

- a. Sejměte víčko a položte na papírový ubrousek bez vláken.
- b. Opatrně slijte supernatant.
- c. Držte zkumavku v obrácené pozici a jemně blotujte (asi šestkrát) na savých papírových ubrouscích bez vláken, až ze zkumavky neodkapává žádná kapalina. Pokaždé použijte čistou část ubrousku. Během osušování **nenechte** sklouznout buněčnou peletu dolů do zkumavky.
- Poznámky:**
- Neblotujte na stejném místě na savých papírových ubrouscích bez vláken více než jednou.
 - Je důležité, abyste blotováním odstranili co největší množství PreservCyt Solution. Nicméně je běžné, že i po blotování uvidíte zbytky PreservCyt Solution.
- d. Umístěte zkumavku na stojan nebo konverzní stojan.

VORTEXOVÁNÍ A DENATURACE

Postup při manuálním vortexování

1. Přidejte požadované množství STM/DNR ke každé peletě (viz Tabulka 2). Uzavřete každou zkumavku víčkem a znovu suspendujte pelety tak, že každou zkumavku budete zvlášť vortexovat alespoň 30 sekund na nejvyšší rychlosti. Je-li obtížné peletu znovu suspendovat, vortexujte dalších 10-30 sekund nebo do doby, kdy se peleta uvolní ze dna zkumavky. Je-li i po dalším vortexování peleta nerozpuštěná (celkově maximálně 2 minuty), poznamenejte si identifikátor vzorku a přejděte k dalšímu kroku.
2. Umístěte zkumavky na stojan.

3. Stojan vložte do vodní lázně při $65 \pm 2^\circ\text{C}$ na 15 ± 2 minut. Dbejte na to, aby vodní hladina dostačovala k zakrytí veškeré kapaliny ve zkumavkách.
4. Vyměte stojan se vzorky z vodní lázně a jednotlivě vortexujte vzorky po dobu 15-30 sekund.
Poznámka: Ujistěte se, že všechny pelety jsou v tomto okamžiku zcela resuspendovány. Vzorky, které stále mají viditelnou peletu, nejsou vhodné pro testování a měly by se zlikvidovat.
5. Vložte opět stojan na 30 ± 3 minuty do vodní lázně o teplotě $65 \pm 2^\circ\text{C}$ a pokračujte v denaturaci.
6. Přistupte ke kroku *Hybridizace* nebo viz bod *Volitelné zastavení*, kde jsou pokyny k uložení a zpracování denaturovaných vzorků.

Postup při použití třepačky MST Vortexer 2 pro více vzorků

Poznámky:

- Postup s třepačkou MST Vortexer 2 je validován pro vzorky s PreservCyt Solution po odstředování a dekantaci supernatantu.
 - Pro zpracování vzorků s PreservCyt Solution je určená pouze třepačka MST Vortexer 2.
 - Konverzní stojan a víko jsou specificky konstruovány, aby pojaly zkumavky *digene* HC2 Sample Conversion (15 ml kónické značky VWR nebo Corning). Uživatel by měl používat na konverzním stojanu v jednu chvíli pouze jeden typ zkumavky. Jiné značky nejsou pro použití validovány.
 - Je nutné přísně dodržovat určené časy vortexování konverzního stojanu s víkem.
 - Konverzní stojan a víko nelze použít při protřepávání sad kalibrátorů testu HC2 DNA nebo kontrol kvality. Výška STM zkumavek zabraňuje adekvátnímu vortexování pomocí konverzního stojanu s víkem.
1. Po blotování všech označených 15 ml kónických zkumavek umístěte zkumavky na konverzní stojan na jejich správné pozice.
 2. Ke každé peletě přidejte příslušné množství směsi STM/DNR (viz Tabulka 2).
 3. Zakryjte 15 ml kónické zkumavky fólií DuraSeal tak, že přetáhnete fólii přes zkumavky ve stojanu.
 4. Umístěte víko stojanu na zkumavky pokryté fólií a víko zajistěte zaklapnutím dvou postranních spon. Když bude víko pevně uchycené, odřízněte řezačkou fólii.
 5. Otočte červenou páčku tak, aby byla v horizontální pozici.
 6. Umístěte konverzní stojan a víko na třepačku MST Vortexer 2 tak, aby největší roh stojanu se zářezy byl umístěn v pravém předním rohu. Umístěte konverzní stojan a víko na plošinu třepačky MST Vortexer 2 tak, aby byl pevně uchycen vodítky. Posunutím červené páčky do vertikální pozice upevněte stojan na místě. Tím stojan pevně uchytíte.
 7. Dbejte na to, aby nastavení otáček bylo na 100 (maximální otáčky) a přepínač generátoru impulzů byl v poloze OFF.
 8. Zapněte spínač třepačky Vortexer do pozice ON (zapnuto). **Zkumavky protřepávejte 30 sekund.**
 9. Přepněte síťový vypínač třepačky Vortexer do polohy OFF (Vypnuto).
 10. Zvedněte červenou páčku a vyjměte konverzní stojan a víko z třepačky MST Vortexer 2.
 11. Stojan vložte do vodní lázně při $65 \pm 2^\circ\text{C}$ na 15 ± 2 minut. Zajistěte, aby vodní hladina zcela zakrývala veškerou kapalinu ve všech zkumavkách.
 12. Po 15 minutové inkubaci vyjměte stojan se vzorky z vodní lázně.
 13. Před tím, než umístíte stojan na třepačku MST Vortexer 2, stojan osušte, abyste zabránili rozstříku.
 14. Zajistěte konverzní stojan a víko na třepačce MST Vortexer 2, jak je uvedeno v *Kroku 6*.
 15. Nastavte otáčky na 100 a zapněte otočte vypínačem napájení třepačky Vortexer do polohy ON (zapnuto). **Míchejte do víru (vortexujte) po dobu 1 minuty.**

16. Otočte spínač třepačky Vortexer do pozice vypnuto (OFF).
Poznámka: Postup s třepačkou MST Vortexer 2 standardizuje rychlost míchání, čas a zpracování a eliminuje tak potřebu vizuálně kontrolovat buněčné pelety, jak to je nutné při manuálním postupu vortexování.
17. Vložte opět stojan na 30 ± 3 minuty do vodní lázně o teplotě 65 ± 2 °C a pokračujte v denaturaci.
18. Vyměňte stojan z vodní lázně, stojan osušte a upevněte do třepačky.
19. Zapněte napájecí vypínač třepačky Vortexer do pozice ON (zapnuto). **Vortexujte 10 vteřin při maximální rychlosti.**
20. Přepněte síťový vypínač třepačky Vortexer do polohy OFF (Vypnuto). Vyměňte stojan.
21. Okamžitě sejměte víko stojanu a fólii DuraSeal ze vzorků.
22. Přistupte ke kroku *Hybridizace* nebo viz bod *Volitelné zastavení*, kde jsou pokyny k uložení a zpracování denaturovaných vzorků.

Postup přípravy vzorků SurePath (POUZE pro testování DNA HPV s vysokým rizikem)

Po cytologickém zpracování pokračujte následujícím způsobem:

1. Pozorovaný objem kapaliny se musí rovnat 2,8 ml.
POZOR: Pokud se ukáže, že zbytková buněčná peleta obsahuje méně než 1 ml tekutiny, je možné, že nebyla po cytologii přidána konzervační kapalina SurePath a vzorek NENÍ vhodný pro testování DNA vysoce rizikového HPV.
2. Vytemperujte vzorky na pokojovou teplotu.
3. Odstřeďte vzorek ve výkyvném korečkovém rotoru při $800 \pm 15 \times g$ po 10 ± 1 minut.
4. Vyměňte zkumavky z odstředivky.
5. Ihned po centrifugování opatrně slijte supernatant a jemně blotujte každou zkumavku (asi 3 krát) na savých papírových ubrouscích, až ze zkumavky neodkapává žádná kapalina. Pozorujte pelety v každé zkumavce. Během osušování nenechte sklouznout buněčné pelety dolů do zkumavky.
6. Umístěte zkumavky do stojanu.
7. Přidejte 200 µl STM do každé pelety opakovacím nebo nastavitelným pipetovačem.
Poznámka: Zkumavky lze míchat bez uzavření.
8. Resuspendujte každou peletu vortexováním každé zkumavky zvlášť na 15 sekund při nejvyšší rychlosti. Pokud se pelety obtížně resuspendují, vortexujte je dalších 5 až 30 sekund nebo do doby, kdy se peleta uvolní ze dna zkumavky a je rozpuštěná.
9. Pipetujte 100 µl připravené denaturační reagentie (s barvivem indikátoru) do každé pelety opakovacím nebo nastavitelným pipetovačem.
POZOR: Postupujte opatrně, abyste se nedotkli stěn zkumavky – mohlo by dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků.
Při likvidaci zbylého denaturačního činidla postupujte v souladu s platnými státními a místními předpisy pro likvidaci korozivních látek.
10. Promíchejte každou peletu vortexováním každé zkumavky zvlášť na 5 sekund při nejvyšší rychlosti.
Poznámka: Zkumavky lze míchat bez uzavření.
Označte 15 ml kónickou zkumavku příslušnou identifikací a typem vzorku (například „SP“ pro typ SurePath vzorku) a umístěte je do stojanu.
Poznámka: Pokud používáte systém Rapid Capture pro poloautomatické zpracování analýzy, musí se použít 15 ml kónické zkumavky značky VWR nebo Corning pro správné umístění do konverzního stojanu *digene* (stříbrný stojan).

11. Převeďte celý objem zkumavky do 15 ml kónické zkumavky se šroubovým uzávěrem pomocí jednorázové 7ml přenosové pipety se standardní špičkou nebo ekvivalentní pipetou¹.
12. Uzavřete 15 ml kónické zkumavky.
13. Inkubujte ve vodní lázni při $65 \pm 2^\circ\text{C}$ 90 ± 5 minut.

POZOR: Tato inkubační doba je delší, než se požaduje pro jiné schválené typy vzorků.

14. Pokud bude testování HPV dokončeno ve stejný den, denaturujte kalibrátory testu *digene* HC2 HPV DNA podle tohoto návodu k obsluze.
15. Vyjměte stojan se vzorky z vodní lázně.

Volitelný bod zastavení

Po denuraci mohou být STM vzorky a konvertované vzorky PreservCyt a SurePath skladovány přes noc při teplotě $2-8^\circ\text{C}$, nebo při -20°C po dobu do 3 měsíců. V případě skladování v lednici přes noc můžete vzorky ponechat na konverzním stojanu uzavřené fólií DuraSeal a víkem stojanu. Před skladováním při -20°C musíte odstranit víko stojanu a fólii DuraSeal a zkumavky musíte uzavřít víčky. V kterémkoliv případě se musí vzorky vytemperovat na pokojovou teplotu ($20-25^\circ\text{C}$) a důkladně protřepat předtím, než přistoupíte k hybridizačnímu kroku.

Poznámka: Denaturované vzorky neuchovávejte na suchém ledu.

Smí se provést maximálně 3 cykly zmrazení/roztátí maximálně 2 hodiny při pokojové teplotě během každého cyklu roztátí.

HYBRIDIZACE: METODY KOMBINOVANÉ SMĚSNÉ SONDY (CPC) A DVOU SOND

Poznámky:

- Směsi HPV sond jsou viskózní. Probe Mix (směs sond) se musí důkladně promíchat a aby do každé jamky hybridizační mikrodestičky se musí zcela vydat požadované množství. Viz odstavec *Příprava reagensů a uchování*.
- Jestliže byl denaturovaný vzorek uskladněn při -20°C , ponechte vzorek roztát na teplotu $20-25^\circ\text{C}$ a důkladně promíchejte do víru (vortexujte) před začátkem hybridizace.
- Před použitím předehřejte mikrodestičkový inkubátor I na $65 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu alespoň 60 minut. Viz *Uživatelská příručka Microplate Heater I*, kde jsou další pokyny.

Metoda hybridizace za použití hybridizační destičky a mikrodestičkového inkubátoru I

Poznámka: Vzorky odebrané odběrovým zařízením *digene* HC2 DNA Collection Device v STM a zpracovávané metodou MST Vortexer 2 lze hybridizovat pouze s využitím metody Microplate Heater I.

1. Připravte si hybridizační mikrodestičku a označte ji.
2. Po inkubaci vyjměte kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky z vodní lázně. Pokud se používá třepačka Multi-Specimen Tube Vortexer 2, protřepávejte celý stojan vzorků STM minimálně 5 sekund při nastavené maximální rychlosti. U vzorků PreservCyt Solution nebo SurePath protřepávejte celý konverzní stojan Conversion Rack minimálně 10 sekund při maximální rychlosti. Jinak můžete třepat každou zkumavku do víru jednotlivě, po dobu nejméně 5 vteřin.
3. Na **dno** prázdné jamky hybridizační mikrodestičky odpipetujte po 75 μl kalibrátoru, kontroly kvality, nebo vzorku podle rozložení destičky podle *Nastavení*. Nedotýkejte se stěn jamek a

¹ Pro ověřovací testy společnosti QIAGEN byly používány 15 ml kónické zkumavky značky VWR

omezte možnost tvorby vzduchových bublinek. Použijte čistou dlouhou pipetovací špičku pro každý přenos, abyste zamezili zkřížené kontaminaci kontrol kalibrátoru, kvality nebo vzorků. Neodstraňujte zařízení pro odběr vzorků z transportní zkumavky. Denaturované vzorky lze uzavřít šroubovými krytkami pro odběr vzorků a uložit pomocí zařízení na odběr vzorků, která ve zkumavkách zbudou. Na denaturované vzorky PreservCyt můžete opět nasadit jejich původní víčka.

Poznámka: Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytnout v případě, když alikvotní podíly vzorků nejsou přeneseny opatrně. Nedotýkejte se stěny zkumavky špičkou pipety během přenosu vzorku, když vyjímáte 75 μ l alikvotní podíl.

4. Po přenesení posledního vzorku zakryjte mikrodestičku víkem mikrodestičky a **hybridizační mikrodestičku inkubujte 10 minut při 20-25 °C.**
5. Odměřte alikvotní podíl připravené a důkladně protřepané (do víru) směsi sondy do špičky opakovací pipety. Pozorně napipetujte 25 μ l směsi sondy do každé jamky, obsahující kontrolu kalibrátoru, kvality a vzorky, použijte 8kanálovou pipetu a pro každou řadu nové špičky. Nadávkujte objem sondy do každé hybridizační jamky; vyhněte se zpětnému rozstříkávání. Nedotýkejte se stěn jamek. Během trvání denaturační inkubace vložte na mikrodestičku příslušné víčko.
6. Zakryjte hybridizační mikrodestičku víkem mikrodestičky a protřepávejte 30 sekund na rotační třepače Hybrid Capture System Rotary Shaker I nastavené na 1.100 \pm 100 ot/min 3 \pm 2 minuty. Kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky by měly po třepání zežloutnout. Jamky, které zůstaly fialové, patrně neměly patřičné množství směsi sondy. Přidejte dalších 25 μ l směsi sondy do vzorků, které zůstaly fialové, a znovu třepajte. Jestliže jamky zůstanou fialové i po této proceduře, vzorky by měly být testovány znovu.

Poznámky:

- Po třepání mají vzorky roztoku PreservCyt zrudnout (místo zežloutnutí).
- Umístěte hybridizační mikrodestičku do ohříváče mikrodestiček I, dbejte na to, aby nedocházelo k rozstříkávání.

7. Inkubujte v předehřátém a vytemperovaném ohříváči mikrodestiček I při 65 \pm 2 °C po 60 \pm 5 minut.

Metoda hybridizace používající mikrozukavky a vodní lázeň

Poznámky:

- Zpracování vzorků odebraných odběrovým zařízením *digene* HC2 DNA Collection Device v STM a zpracovávané metodou MST Vortexer 2 pro míchání a metodou vodní lázně pro hybridizaci nebylo validováno. Vzorky odebrané odběrovým zařízením *digene* HC2 DNA Collection Device v STM a zpracovávané metodou MST Vortexer 2 lze hybridizovat **pouze** s využitím metody Microplate Heater I.
- Pokud byly denaturované vzorky uchovávány při -20 °C, nechte vzorky roztát při 20-25 °C a důkladně vzorky protřepejte předtím, než přikročíte k hybridizaci.

1. Do stojanu mikrozukavek umístěte požadovaný počet čistých hybridizačních mikrozukavek a označte je.
2. Po inkubaci vyjměte kontroly kalibrátoru, kvality a vzorky z vodní lázně. Míchejte každou zkumavku jednotlivě (vortex) po dobu nejméně 5 vteřin, těsně před odebráním alikvotů.
3. Na **dno** prázdné jamky hybridizační mikrozukavky odpipetujte po 75 μ l kalibrátoru, kontroly kvality, nebo vzorku podle rozložení destičky podle Nastavení. Nedotýkejte se stěn mikrozukavek a omezte tvoření vzduchových bublinek. Použijte čistou dlouhou pipetovací špičku pro každý přenos, abyste zamezili zkřížené kontaminaci kontrol kalibrátoru, kvality nebo vzorků. Neodstraňujte kartáček k odběru vzorků z transportní zkumavky. Denaturované vzorky

Ize uzavřít šroubovými krytkami pro odběr vzorků a uložit pomocí zařízení na odběr vzorků, která ve zkumavkách zbudou.

Poznámka: Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytnout v případě, když alikvotní podíly vzorků nejsou přeneseny opatrně. Nedotýkejte se stěny zkumavky špičkou pipety během přenosu vzorku, když vyjímáte 75 μ l alikvotní podíl.

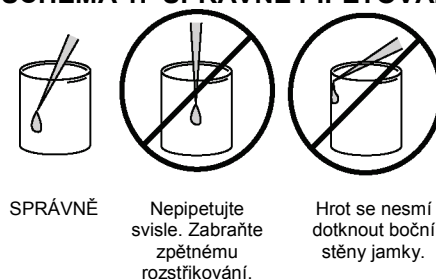
- Po převedení posledního vzorku **inkubujte hybridizační mikrozkuavky 10 minut při 20-25 °C.**
 - Odměřte alikvotní podíly připravené a důkladně promísené (do víru) směsi sondy do zásobníku činidla na jedno použití. Pozorně napipetujte 25 μ l směsi sondy do každé mikrozkuavky, obsahující kontrolu kalibrátoru, kvality a vzorky, použijte 8-kanálovou pipetu a pro každou řadu nové špičky. Nadávkujte objem sondy do každé hybridizační mikrozkuavky; zabraňte zpětnému rozstříkování. Nedotýkejte se stěn zkumavek. Zkontrolujte zespodu stojan, aby bylo zajištěno, že všechny zkumavky dostaly odpovídající množství Probe Mix (směs sond).
 - Zakryjte mikrozkuavky fólií, aby byly patřičně uzavřeny. Na horní stranu stojanu dejte kryt stojanu. Protřepávejte stojan mikrozkuavek na rotační třepačce I nastavené na 1.100 ± 100 ot/min 3 ± 2 minuty. *Kontroly, kalibrátory a vzorky by měly po třepání zežloutnout.* Zkumavky, které zůstaly fialové, patrně neměly patřičné množství směsi sondy. Přidejte dalších 25 μ l směsi sondy do vzorků, které zůstaly fialové, a znovu třepejte. Jestliže zkumavky zůstanou fialové i po této proceduře, vzorky by měly být testovány znovu.
- Poznámka:** Vzorky roztoku PreservCyt by měly po třepání zrudnout místo zežloutnutí.
- Inkubujte ve vodní lázni při 65 ± 2 °C 60 ± 5 minut. Ve vodní lázni musí být dostatečně vysoká hladina vody na zakrytí celého objemu hybridizační směsi. Stojan mikrozkuavek bude vodní lázni plovat.

Poznámka: Vytvořte soubor rozvržení desky pomocí softwaru pro analýzu rozborů *digene*, pokud jste tak již neučinili dříve.

IMOBILIZACE HYBRIDU

- Ze sestavy imobilizační mikrodestičky odstraňte všechny jamky kromě těch, které jsou vyžadovány. Vraťte nepoužité jamky mikrodestičky to původního obalu a obal uzavřete. Značkovačem očislujte jednotlivé sloupce 1, 2, 3... Mikrodestičku označte příslušným identifikačním štítkem. Vzorky budou dávkovány do jamek podle příkladu uspořádání uvedeného pod heslem Uspořádání pokusu.
- Opatrně vyjměte hybridizační mikrodestičku, obsahující kalibrátory, kontroly a vzorky z ohříváče mikrodestiček I. Ihned sejměte víko destičky a umístěte ji na čisté místo. V alternativním uspořádání vyjměte stojánek s mikrozkuavkami z vodní lázně. Ihned sejměte víko stojánku a pomalu odstraňte krycí fólii destičky, tahem nahoru a ve směru přes stojánek.
- Převedte celý obsah (přibližně 100 μ l) - sestávající z kontrol, kalibrátorů a vzorků - z jamek hybridizační mikrodestičky (nebo mikrozkuavek) na dno odpovídajících imobilizačních jamek mikrodestičky za použití 8-kanálového pipetovacího zařízení. Použijte nové pipetové hroty na 8kanálovém pipetovači pro každý přenesený sloupec a nechte každou špičku pipety dobře vypustit, aby bylo jisté, že došlo k úplnému přenosu vzorku. Pokud to bude žádoucí, pipetovač je možné stabilizovat umístěním **středu** špiček pipety na horním okraji jamek imobilizační mikrodestičky (viz *Schéma 1*).

SCHÉMA 1: SPRÁVNÉ PIPETOVÁNÍ



4. Zakryjte imobilizační mikrodestičku příslušným víkem nebo použijte krycí fólii na destičku a třepejte na rotační třepečce I při 1100 ± 100 ot/min, při $20 - 25$ °C po 60 ± 5 minut.
5. Připravte promývací pufr a zkontrolujte nádržky oplachování a odpadní kapaliny automatické promývačky destiček během inkubace. Viz odstavec Příprava reagensů a uchovávání
6. Odstraňte kapalinu z jamek vyklepnutím do výlevky; úplně obraťte destičku nad výlevkou a silně jí zatřepete směrem dolů. Opatrnost musí být věnována vzdálenosti ode dna výlevky, aby nedošlo k tomu, že by se rozstříknutá kapalina nedostala zpět na destičku odrazem ode dna výlevky. **Neobracejte destičku spodní stranou nahoru**, odstraňte vodu silným poklepáním, 2–3x, na čistých utěrkách Kimtowels nebo ekvivalentních papírových ručnicích, které nepouštějí vlákno. Dbejte na to, aby byla odstraněna veškerá kapalina z jamek a horní strana destičky byla suchá.

DETEKCE HYBRIDU

Poznámky:

- Přidávky provádějte napříč destičkou zleva dooprava za použití 8kanálového pipetovače.
 - Doporučuje se použití techniky reverzní pipetace, aby se zlepšila konzistence dávkování reagentie. U této techniky jsou pipetové špičky zpočátku přeplněné tak, že je použita druhá zarážka na ovladači pipetovacího zařízení pro nasávání a dávkování (na pístu). Viz postup popsany níže. Otřete špičky na zásobníku činidla (na jedno použití), aby byl odstraněn přebytek činidla před jeho dávkováním na destičku.
 - Pokud je to žádoucí, pipetovač lze stabilizovat opřením středu špiček pipety o horní okraj jamek imobilizační mikrodestičky. Dbejte na to, abyste se nedotkli boků jamek mikrodestičky, protože by mohlo dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků. Viz Schéma 1 uvedené výše.
1. Do nádoby na jednorázové reagentie dodejte alikvotní množství příslušného objemu detekční reagentie 1 (viz odstavec *Příprava reagensů a uchovávání*, kde jsou uvedeny pokyny). Opatrně napipetujte 75 μ l detekční reagentie 1 do každé jamky imobilizační mikrodestičky pomocí 8kanálové pipety a za použití reverzní pipetovací techniky.

Reverzní pipetovací technika – postup:

- a) Připojte špičky na 8kanálový pipetovač; dbejte na to, aby byly všechny špičky pevně nasazeny.
 - b) Zatlačte píst pipetovače za první zarážku směrem k druhé zarážce.
 - c) Ponořte špičky do roztoku detekční reagentie 1.
 - d) Pomalu uvolňujte píst a nechte reagentii, aby zaplnila špičky.
 - e) Dávkujte roztok do jamek mikrodestičky přitlačením pístu (75 μ l) k první zarážce. Neuvolňujte píst předtím, než ponoříte špičky znovu do roztoku detekční reagentie 1.
 - f) Znovu naplňte špičky a opakujte, dokud nebudou naplněny všechny jamky. Plňte jamky mikrodestičky zleva doprava. Dbejte na to, aby všechny jamky byly naplněny na základě pozorování intenzity růžové barvy. Všechny jamky by měly mít podobnou intenzitu.
2. Pokryjte destičky příslušným víčkem nebo čistou fólií Parafilm (nebo ekvivalentní fólií) a proveďte inkubaci při $20 - 25$ °C po dobu 30 - 45 minut.

PROMÝVÁNÍ

Promyjte imobilizační destičku za použití jedné z uvedených dvou metod, jak je popsáno níže.

Metoda promývačky Automated Plate Washer

Poznámka: Promývačku Automated Plate Washer vždy mějte **ZAPNUTOU**. Dbejte na to, aby byla oplachovací nádoba naplněná a odpadní nádoba prázdná. Promývačka Automated Plate Washer bude v rámci čištění rutinně oplachovat systém. Viz Uživatelská příručka promývačky Automated Plate Washer, kde jsou další pokyny.

PŘEDTÍM KAŽDÝM POUŽITÍM:

- Dbejte na to, aby promývací nádoba byla naplněna nejméně na značku 1 litru roztokem promývacího pufru. Pokud ne, připravte roztok promývacího pufru. Viz odstavec Příprava reagentů a uchovávání
- Dbejte na to, aby byla oplachovací nádoba naplněná deionizovanou nebo destilovanou vodou.
- Dbejte na to, aby byla odpadní nádoba prázdná a byla bezpečně připevněna krytka.
- Promývačka Automated Plate Washer se bude plnit automaticky před každým promýváním a oplachovat po každém promývání.

1. Odeberte víko destičky a umístěte destičku na platformu promývačky Automated Plate Washer.
2. Zajistěte, aby bylo zapnuto napájení a aby se na displeji objevilo „Digene Wash Ready“ (digene připraven k promývání) nebo „P1“.

Poznámka: Je-li použita jen část pruhu imobilizačních jamek, bude potřeba umístit prázdné jamky mikrodestičky v imobilizační destičce, aby se před vymýváním doplnil celý sloupec.

3. Zvolte počet stripů, které mají být promyty, zmáčknutím tlačítka "řady" ("Rows") a pak pomocí "+" nebo "-" nastavte hodnotu. Stisknutím klávesy „Rows“ se vrátíte k „Digene Wash Ready“ nebo „P1“.
4. Stisknutím „Start/Stop“ začnete.
5. Promývačka provede šest plnicích a výpustných cyklů, což potrvá přibližně 10 minut. Potom následuje krátká přestávka v programu, je třeba počkat a nevyndávat destičku příliš brzy. Jakmile promývačka Automated Plate Washer dokončí promývání, na displeji se objeví „Digene Wash Ready“ nebo „P1“.
6. Po skončení programu vyndejte mikrodestičku z promývačky. Destička má být bílá a v jamkách mikrodestičky nemá zůstat žádná růžová kapalina.

Metoda ručního promývání

1. Odstraňte detekční čidlo 1 z jamek tak, že na destičku položíte čisté tampóny Kimtowels (nebo ekvivalentní papírové ubrousky bez vláken) a opatrně ji převrátíte. Před obrácením dnem vzhůru dbejte na to, aby byl papír ve styku s celou plochou povrchu destičky. Nechte destičku odkapat po dobu 1 - 2 minut. Důkladně vysušte (blotujte) čistými tampóny Kimtowels (nebo ekvivalentními papírovými ubrousky bez vláken). Opatrně zlikvidujte použité papírové ubrousky, aby se zabránilo kontaminaci alkalickou fosfatázou v dalších krocích.
2. Pomocí promývacího aparátu šestkrát ručně destičku promyjte. Každá jamka je promyta k přetečení, aby bylo odstraněno detekční čidlo 1 z horního okraje jamek. Promývání začíná u jamky A1 a pokračuje ve stylu serpentine doprava a dolů. Po naplnění všech jamek dekantujte kapalinu do výlevky prudkým pohybem dolů. Druhé promývání začíná u jamky H12 a pokračuje ve stylu serpentine doleva a nahoru. Tento sled 2 promývání se opakuje znovu dvakrát tak, aby byl celkový počet promývání na jamku roven 6.
3. Po promývání vysušte (blotujte) destičku tak, že ji obrátíte na čisté tampóny Kimtowels (nebo ekvivalentní papírové ubrousky bez vláken) a silně na ni 3 - 4 krát poklepete. Papírové ručníky vyměňte a znovu vysoušejte. Ponechte destičku obrácenou a nechte ji 5 minut odkapat. Blotujte destičku ještě jednou.
4. Destička má být bílá a v jamkách mikrodestičky nemá zůstat žádná růžová kapalina.

AMPLIFIKACE SIGNÁLU

POZNÁMKY:

- K manipulaci s detekční reagentii 2 použijte nový pár rukavic.
 - Přidejte **pouze** alikvotní množství reagentie požadované k provedení analýzy do jednorázové nádoby reagentie, aby nedošlo ke kontaminaci detekční reagentie 2. Viz oddíl Příprava činidel. **Nevracejte detekční reagentii 2 do originální lahve. Nepoužitý materiál později zlikvidujte.**
 - Přídavek detekční reagentie 2 je nutné provést bez přerušení. Inkubační doba obsahu všech jamek musí být pokud možno stejná.
 - Dbejte na to, abyste se nedotkli boků jamek mikrodestičky a aby se reagentie nerozstříkala zpět na špičky, protože by mohlo dojít ke křížové kontaminaci vzorků (viz Schéma 1).
1. Opatrně napipetujte 75 μ l detekční reagentie 2 do každé jamky imobilizační mikrodestičky za použití 8kanálové pipety, jak bylo popsáno dříve. Všechny jamky mikrodestičky by měly zežloutnout. Dbejte na to, aby všechny jamky byly naplněny na základě pozorování intenzity barvy. Všechny jamky by měly mít podobnou intenzitu.
 2. Zakryjte mikrodestičky příslušným víčkem nebo čistou fólií Parafilm (či ekvivalentní), a proveďte inkubaci při 20 - 25 °C po dobu 15 minut. Chraňte před přímým slunečním světlem.
 3. Přečtěte mikrodestičku na přístroji DML po 15 minutách inkubace (a ne déle než 30 minut inkubace).
 4. Protokol softwaru specifický pro umožní zadávat platné informace o analýze přímo do softwaru.
 5. Jestliže nebyla použita celá mikrodestička, vyndejte nepoužité jamky mikrodestičky z držáku mikrodestičky, důkladně držák vypláchněte destilovanou či deionizovanou vodou, vysušte a uschovejte pro příští stanovení.

OVĚROVACÍ KRITÉRIA PRO KALIBRACI STANOVENÍ

Ověření kalibrace analýzy se provádí s cílem zajistit, že reagentie, dodávaný kalibrátor a materiály kontroly kvality fungují řádně a umožňují přesné stanovení hraniční hodnoty analýzy. Test *digene* HC2 HPV DNA vyžaduje kalibraci u každé analýzy, proto je nezbytné každou analýzu ověřit pomocí následujících kritérií. Tento ověřovací postup není určen jako náhrada za vnitřní testování kontroly kvality. Protokoly analýzy ze softwaru pro rozbor analýz *digene* automaticky ověřují následující kritéria.

1. Negativní kalibrátor

Negativní kalibrátor musí být zařazen třikrát pro každý zkušební test. Průměr negativního kalibrátoru musí být ≥ 10 a ≤ 250 RLU, aby se přistoupilo k další krokům. Výsledky negativního kalibrátoru by měly vykazovat variační koeficient (% CV) ≤ 25 %. Je-li % CV > 25 %, vyřadte hodnotu kontroly o hodnotě RLU nejvíce vzdálené od průměru jako „ležící mimo rozsah“, a znovu vypočítejte průměr za použití zbylých dvou hodnot pro kontrolu. Pokud bude rozdíl mezi průměrem a každou ze dvou hodnot ≤ 25 %, přistupte ke kroku 2. Jinak je ověření kalibrace analýzy neplatné a analýza se musí pro všechny vzorky pacienta zopakovat. V souladu s tím by se výsledky vzorků pacienta neměly hlásit.

2. Kalibrátory

Kalibrátor/y musí být zařazen/y třikrát pro každý test. Pro metodu CPC, musí být oba kalibrátory musí být zařazen/y třikrát. Výsledky kalibrátoru by měly vykazovat variační koeficient (% CV) ≤ 15 %. Pro CPC musí % CV LRC, HRC a kombinované LRC-HRC vykazovat % CV ≤ 15 %. Je-li % CV > 15 %, vyřadte hodnotu kalibrátoru o hodnotě RLU nejvíce vzdálené od průměru jako „ležící mimo rozsah“, a znovu vypočítejte průměr za použití zbylých hodnot pro kalibrátor. Pouze 1 LRC a 1 HRC replikáty mohou být vynechány. Pokud bude % CV kalibrátorů ≤ 15 %, přistupte ke kroku 3. Jinak je ověření kalibrace analýzy neplatné a analýza se musí pro všechny vzorky pacienta zopakovat. V souladu s tím by se výsledky vzorků pacienta neměly hlásit.

Ověření kalibrace analýzy popsané shora pro kalibrátory provádí automaticky software pro analýzu rozborů *digene* a tiskne zprávu s analýzou dat. **Protokoly rozborů analýzy *digene* pro HPV automaticky ověří, že % CV kalibrátorů nízkého rizikového a vysoce rizikového HPV je ≤ 15 %.** Ovšem verze softwaru v1.0.2 a v.1.0.3 pro rozbor analýzy *digene* NEBUDOU zneplatňovat analýzu, pokud nebude % CV pro kalibrátory > 25 %. Proto musí uživatel ručně ověřit, že % CV vypočítaný softwarem pro rozbor analýzy *digene* je ≤ 15 % a postupovat určeným způsobem pro situaci 1 v následující tabulce. Spadají-li hodnoty replikátů % CV pro kalibrátor mezi 15 a 25, řiďte se instrukcemi pro situaci 2 či 3 v tabulce uvedené níže, a proveďte doporučenou „akci uživatele.“

Situace	Zjištěné % CV pro LRC nebo HRC replikáty	Kroky podniknuté softwarem pro rozbor analýzy <i>digene</i>	Akce uživatele
1	≤ 15 %	Stanovení označené jako „platné“	Výsledky mohou být vykázaný, není vyžadována žádná další akce.
2	mezi 15 % a 25 %	Žádné hodnoty „ležící mimo rozsah“ nebyly vyřazeny a stanovení označené jako „platné“	Vyřadte RLU hodnotu kalibrátoru nejdále od průměru. Znovu vypočítejte % CV kalibrátoru s dvěma zbylými hodnotami. Je-li % CV zbylých RLU hodnot > 15 %, stanovení je neplatné. Výsledky nesmí být vykázaný. Pokud bude % CV zbývajících hodnot RLU ≤ 15 %, přepočítejte hraniční hodnotu analýzy, pak přepočítejte poměr RLU/hraniční hodnota pro každý vzorek pomocí této hraniční hodnoty. Tyto přepočítané výsledky mohou být vykázaný.
3	mezi 15 % a 25 %	Jedna hodnota „mimo rozsah“ pro každý kalibrátor vyřazena stanovení označené jako „platné“	Stanovení je neplatné. Výsledky nesmí být vykázaný. Stanovení musí být opakováno.
4	> 25 %	Jedna hodnota „mimo rozsah“ vyřazena a stanovení označené jako „neplatné“	Stanovení je neplatné. Výsledky nesmí být vykázaný. Stanovení musí být opakováno.

Pro ruční výpočet % CV, jak je vyžadováno v situaci 2 výše, by měl uživatel vydělit standardní odchytku (STDEV) (n-1) hodnot RLU zbývajících replikátů průměrem hodnot RLU zbývajících replikátů (LRC či HRC či obou) a tento výsledek vynásobit 100.

Pro výpočet % CV programem Microsoft® Excel® (dodávaným s předchozí verzí softwaru pro rozbor analýzy *digene*) může uživatel vypočítat směrodatnou odchytku replikátů kalibrátoru pomocí vzorce *STDEV* a stanovit průměrný RLU kalibrátoru pomocí vzorce *AVERAGE*. Když jsou získány tyto hodnoty, vydělte *STDEV* hodnotou *AVERAGE* a vynásobte výsledek 100, tak získáte hodnotu % CV.

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

Jestliže máte nějaké otázky spojené s výpočtem hodnot % CV, znovu vypočítanou hranicí positivity stanovení, nebo přepočítanými hodnotami poměru RLU/hranice positivity u vzorků, zavolejte prosím vašeho místního zástupce firmy QIAGEN .

Ke stanovení reprodukovatelnosti kalibrátoru a odhadu frekvence, jež může být nezbytná pro ruční přepočítání byly zkompileovány výsledky ze tří klinických hodnocení zahrnujících 152 běhů analýzy provedených s testem *digene* HC2 HPV DNA. Výsledky ukázaly, že průměr % CV pro těchto 152 pokusů byl 8,1. Vezmeme-li v úvahu všechny tři replikáty kalibrátoru pro zkušební test, pozorována reprodukovatelnost kalibrátoru byla > 15 % CV pouze pro 17 z 152 pokusů (11,2 %); přitom 10 z těchto 17 zkušebních testů poskytlo výsledek pro % CV mezi 15 - 25 (situace 2). Ze zmíněných 17 zkušebních testů, které poskytly hodnotu % CV > 15, pouze jediná hodnota ležela „mimo rozsah“ a nebyla vzata v úvahu a hodnota % CV byla přepočítána. Podle akce uživatele pro situaci 2, pouze jedna hodnota % CV zkušebního testu zůstala > 15, tento zkušební test byl tudíž neplatný. Hodnoty % CV pro zbývajících 151 zkušebních testů byly vypočítány pro hodnotu průměru % CV rovnou 6,0.

3. Výsledky průměrů pro kalibrátor (LRC či HRC) a pro negativní kalibrátor (NC) jsou použity k výpočtu poměru LRC/NC či HRC/NC pro každou sondu. Dřívější verze protokolů (v. 1.0.2 a v. 1.0.3) softwaru pro rozbor analýzy *digene* NEBUDOU nepočítají správně přijatelné rozsahy. Tyto poměry musí splňovat následující kritéria pro ověření kalibrace analýzy předtím, než bude možné interpretovat výsledky vzorků.

METODA CPC	METODA DVOU SOND
Ověření kalibrace analýzy přijatelné rozmezí	Ověření kalibrace analýzy přijatelné rozmezí
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (strana nízkého rizika)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (strana vysokého rizika)
$2,0 \leq (LRC \text{ a } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Spočítejte příslušné poměry $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$ nebo $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ pro každou ze sad sond. Pokud budou poměry $\geq 2,0$ a ≤ 15 , pokračujte k dalšímu kroku. Pokud kterýkoliv z poměrů je $< 2,0$ nebo > 15 , **analýza je pro takovou konkrétní sondu neplatná a test se musí opakovat.** Zopakujte pokusy se všemi vzorky od pacientek pro tento krok.

Poznámka: Přijatelné rozsahy pro negativní kalibrátor a pozitivní kalibrátory byly stanoveny pouze pro přístroje DML.

VÝPOČET HRANIČNÍ HODNOTY

Poté, co bylo stanovení prohlášeno za platné (podle kritérií uvedených výše) hodnoty hranice positivity pro určení pozitivních vzorků jsou následující:

1) Metoda kombinované směsné sondy: $\frac{\text{LRC replikátů} + \text{HRC replikátů}}{\text{počet replikátů}}$

2) Metoda dvou sond: Hraniční hodnota sondy pro nízko rizikový HPV = $\text{LRC}\bar{x}$
 Hraniční hodnota sondy pro vysoce rizikový HPV = $\text{HRC}\bar{x}$

Příklad výpočtů hranice positivity					
pro:		Sonda pro nízko rizikový nebo vysoce rizikový HPV Metoda duální sondy	Metoda CPC sondy nízko rizikového HPV	Sonda pro vysoce rizikový HPV Metoda CPC	Kombinovaná sonda HPV Metoda CPC
	Hodnoty NC RLU	Hodnoty RLU LRC či HRC	Hodnoty RLU LRC	Hodnoty RLU HRC	Hodnoty RLU LRC a HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Průměrná hodnota RLU	96	318	340	287*	318,8*
% CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$	Neuvedeno	3,31	3,54	3,00	3,32

Průměrná hodnota RLU pro pozitivní kalibrátor určuje hodnotu hranice positivity stanovení. Proto je pozitivní hraniční hodnota ($\text{LRC}\bar{x}$) = 318.

* Průměrná hodnota % CV všech 6 replikátů byla 16,8. Replikáty o hodnotě 235 byly vynechány jako „ležící mimo rozsah“. % CV zbývajících replikátů bylo 13,0 s průměrem 318,8. Počáteční % CV pro HRC bylo 11,5.

Všechny hodnoty RLU pro vzorky by měly být převedeny na poměr k příslušné hodnotě hranice positivity. Například všechny testy stanovení provedené pomocí HPV sondy pro nízké riziko by měly být vyjádřeny jako poměr RLU vzorku/hodnota hranice positivity pro nízké riziko. Totéž by mělo být provedeno se vzorky testovanými HPV sondou pro vysoké riziko nebo sondou CPC.

Poznámky: Hodnoty RLU/CO a pozitivní/negativní výsledky pro všechny vzorky jsou hlášeny ve *Zprávě o analýze dat* přístroje DML.

V případě aplikace Rapid Capture System, softwarový protokol HPV RCS byl naprogramován tak, aby aplikoval adjustační faktor kalibrace (CAF) o hodnotě 0,8 na průměr hodnoty RLU platných replikátů pozitivních kalibrátorů. Tento faktor (CAF) je nutný k tomu, aby charakteristiky účinnosti testu byly stejné jako u manuálního postupu. Tato změna se týká pouze analýz prováděných pomocí aplikace Rapid Capture System. Aby bylo možné dosáhnout správných výsledků testu, je nezbytně nutné zvolit správný softwarový protokol při použití každé testovací metody. Všechny hodnoty RLU pro vzorky by měly být převedeny na poměr k příslušné hodnotě hranice positivity (CO). Například, všechny analýzy by měly být vyjádřeny jako poměr RLU vzorku/hraniční hodnoty positivity (CO).

KONTROLA KVALITY

Vzorky kontroly kvality se dodávají s testem *digene* HC2 HPV DNA. Pokyny pro zadávání čísla šarží a dat použitelnosti kontrol kvality naleznete v příslušné uživatelské příručce. Tyto kontroly kvality musí být součástí každého zkušebního testu a hodnota RLU/CO každé kontroly kvality musí spadat do limitu následujících přijatelných rozmezí, aby byl daný pokus považován za platný. **Jestliže kontroly kvality nespádají do daných rozmezí, stanovení je neplatné a musí být opakováno.** Následkem toho, žádné výsledky týkající se pacientek nemohou být zaznamenány pro neplatné stanovení.

Kontrola kvality	HPV typ	Očekávaný výsledek (hodnota RLU/CO) HPV sonda pro nízké riziko			
		minimum	maximum	průměr	% CV
QC1-LR	nízké riziko (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	vysoké riziko (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Kontrola kvality	HPV typ	Očekávaný výsledek (hodnota RLU/CO) Sonda pro vysoce rizikový HPV			
		minimum	maximum	průměr	% CV
QC1-LR	nízké riziko (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	vysoké riziko (HPV 16)	2	8	5,0	25

Kontrola kvality	HPV typ	Očekávaný výsledek (hodnota RLU/CO) CPC HPV sonda			
		minimum	maximum	průměr	% CV
QC1-LR	nízké riziko (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	vysoké riziko (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Materiály pro kontrolu kvality, které jsou k dispozici v soupravě, jsou klonované cílové DNA HPV a nejsou odvozeny od přírodního typu HPV. Je to stejný typ materiálu používaný pro kalibrátory dodávané s testem *digene* HC2 HPV DNA.
2. Tento materiál kontroly kvality nebude působit jako vhodná kontrola pro zpracování roztoku PreservCyt nebo konzervační kapaliny SurePath.
3. Kontroly kvality, které jsou k dispozici u této testovací soupravy, musí být použity pro interní kontrolu kvality. Přídavné kontroly kvality mohou být testovány podle směrnic nebo požadavků místních nebo národních předpisů nebo pravidel příslušných organizací.

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ PRO VZORKY

Poznámka: Hraniční hodnota testu *digene* HC2 HPV DNA 1pg/ml je ekvivalentní 100.000 HPV kopií/ml nebo 5.000 HPV kopií na analýzu.

1. Vzorky STM s poměrem RLU/hraniční hodnota $\geq 1,0$ u sondy nízko rizikového HPV se považují za „pozitivní“ pouze pro 1 nebo více pro typy HPV 6, 11, 42, 43 nebo 44.
2. Vzorky STM s poměrem RLU/hraniční hodnota $\geq 1,0$ se považují za „pozitivní“ pro sondu vysoce rizikového HPV pouze pro 1 nebo více u typu HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.
3. V případě testování vzorků PreservCyt, doporučuje firma QIAGEN opětný test vzorku, je-li poměr RLU/hodnota hranice positivity $\geq 1,0$ a $< 2,5$. Jestliže výsledek prvního opětného testu je pozitivní ($\geq 1,0$ RLU/CO), lze vzorek považovat za pozitivní a další testy nejsou nutné. Pokud však bude první výsledek opakovaného testu negativní ($< 1,0$), pak se musí dokončit druhý opakovaný test (třetí výsledek), aby byl získán výsledek konečný. Za konečný výsledek určený k vykázání je pokládán výsledek druhého opětného testu.
4. Je-li poměr RLU/hodnota vzorku blízko, ale menší než 1,0 a je podezření na infekci HPV s vysokým rizikem, uvažujte o použití alternativní testovací metody nebo opakování testu vzorku.
5. Vzorky STM s poměrem RLU/hraniční hodnota $\geq 1,0$ jak u sondy nízko rizikového HPV, u sondy vysoce rizikového HPV se považují za „pozitivní“ pouze pro 1 nebo více pro typy HPV z každé skupiny sond.
6. Vzorky STM s poměrem RLU/hraniční hodnota $\geq 1,0$ se považují za „pozitivní“ u koktailu kombinované sondy pouze pro 1 nebo více u typu HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.
7. Vzorky s poměrem RLU/hraniční hodnota $< 1,0$ pro koktail kombinovaných sond nebo jak u sondy nízko rizikového HPV, u sondy vysoce rizikového HPV se považují za „negativní“ nebo „nedetekována DNA HPV“ pouze pro 18 testovaných typů HPV. Sekvence DNA HPV jsou buď nepřítomny, nebo jsou úrovně DNA HPV pod úrovní detekčního limitu stanovení.

ÚDAJE NA PODPORU INDIKACE HPV S NÍZKÝM A S VYSOKÝM RIZIKEM

Pacientky klinického screeningu s výsledky stěru z děložního čípku ASC-US pro stanovení potřeby doporučení ke kolposkopii

Studie s názvem „Užitečnost testování DNA HPV pro prioritovanou skupinu žen s hraničními výsledky Pap nátěrů“ byla provedena v roce 1996 v U.S.A. pod vedením výzkumné nadace Kaiser Foundation Research Institute a skupiny Kaiser Permanente Medical Group. Cervikální vzorky pro rutinní stěr z děložního čípku a pro test *digene* HC2 HPV DNA byly získány od žen, které navštívily několik Kaiserových klinických pracovišť. Výchozí stěry z děložního čípku byly hodnoceny podle Klasifikace Bethesda. Pokud jde o ekvivalentní terminologii screeningu cervikálního nádorového onemocnění v Evropském společenství viz European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening⁴⁰. Ženy, ve věku 15 let a starší, s výsledky Pap nátěru ASC-US (atypické buňky neurčené závažnosti) se vrátily na kolposkopii a biopsii. Kolposkopicky orientované histologické vzorky byly zkoumány patologi a byla formulována počáteční diagnóza. Každý histologický vzorek byl též přezkoumán nezávislým patologem a nesrovnalosti mezi původním výrokem a nezávislým přezkoumáním byly posouzeny třetím patologem (výsledkem je konsenzus).

Testování DNA HPV bylo provedeno na výchozích vzorcích a použila se pouze sonda vysoce rizikového HPV. Testování DNA HPV bylo provedeno prototypem testu *digene* HC2 HPV DNA, který obsahoval sondy na 11 typů HPV ze 13 včetně sondy vysoce rizikového HPV, ale neobsahoval sondy typů HPV 59 a 68. Neočekává se, že by se tento rozdíl projevil ve výrazně rozdílném profilu účinnosti těchto dvou stanovení.

Byly k dispozici výsledky testu HPV a histologické diagnózy pro 885 žen s Pap nátěry ASC-US. Testování většiny pacientů bylo provedeno se vzorky odebranými jak v STM, tak roztoku PreservCyt. Díky podobnostem mezi charakteristikami chování testu *digene* HC2 HPV DNA pro STM a médiu PreservCyt je chování analýzy prezentováno pouze pro roztok PreservCyt.

Tabulka 3 ukazuje, že u pacientek vyznačujících se arbitrážním stěrem z děložního čípku ASC-US je negativní prediktivní hodnota testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA u výskytu HSIL nebo většího onemocnění při kolposkopii 99 %.

Tabulka 3
Porovnání testu *digene* HC2 HPV DNA versus konsensus histologie
Populace Pap definovaná jako ASC-US
Studie Kaiser, vzorky roztoku PreservCyt

	HSIL nebo vážnější v době provedení kolposkopie			Celkem
		+	-	
Vysoce rizikový HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Celkem	71	814	885

Citlivost [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 95 % CI = 84,3 to 97,7
 specifická [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 95 % CI = 57,7 to 64,4
 výskyt choroby = 8,0 % (71/885)
 pozitivní prediktivní hodnota stanovení = 17,2 % (66/383)
 negativní prediktivní hodnota stanovení = 99,0 % (497/502)

Tabulka 4 ukazuje teoretické pozitivní a negativní předpovídané hodnoty pro různé četnosti výskytu počáteční ASC-US, která se ukázala být HSIL, nebo vyšší, založené na výsledcích sondy HPV pro vysoké riziko.

Tabulka 4
Teoretická pozitivní a negativní prediktivní hodnota
Sonda pro vysoce rizikový HPV
výsledky Pap nátěru ASC-US

Teoretická četnost výskytu pro HSIL	Počáteční výsledek Pap nátěru ASC-US	
	Pozitivní prediktivní hodnota stanovení	Negativní prediktivní hodnota stanovení
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

Tabulka 5 ilustruje variace mezi různými věkovými skupinami zahrnutými v této studii:

Tabulka 5
Údaje studie Kaiser
Chování testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA versus konsensus histologie
Výsledky (HSIL)
Charakteristiky s ohledem na věk

	Věk <30	Věk 30–39	Věk >39
n	287	233	365
Četnost výskytu choroby (%)	12,2	11,2	2,7
Citlivost (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95 % interval spolehlivosti	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Specifická (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95 % interval spolehlivosti	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Negativní prediktivní hodnota (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Pozitivní prediktivní hodnota (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Klinická citlivost a specifická pro určení rizika choroby vysokého stupně závažnosti u žen s LSIL nebo HSIL Pap nátěry

Multicentrická klinická studie používající test *digene* HC2 HPV DNA byla provedena pomocí vzorků odebraných z několika nemocnic s vysokou prevalencí cervikálního onemocnění a HPV a klinik provádějících kolposkopii ve zdravotnických střediscích (3 pracoviště) na západě a jihu Spojených států. Testování HPV bylo provedeno ve 3 výzkumných pracovištích, která nebyla přidružena ke kolposkopickým klinikám, kde byly odebrány vzorky. Populace pro tuto klinickou studii zahrnovala ženy s diagnózou buď LSIL nebo HSIL, založenou na nedávném Pap nátěru, a pro které byla doporučena následná kolposkopie. Bylo zaregistrováno 702 pacientek, z nich 327 mělo výsledky Pap nátěru větší než ASC-US a mělo k dispozici dostatečné informace; 96 z těchto žen mělo konečný statut choroby určen jako HSIL nebo větší. Byly získány vzorky exfoliovaných cervikálních buněk byly získány buď odběrovým zařízením *digene* HC2 DNA a pak vloženy do STM, nebo kartáčkovým zařízením, které bylo následně opláchnuto v roztoku PreservCyt. Vzorky byly odebrány v době kolposkopie. Vzorky byly testovány testem *digene* HC2 HPV DNA a výsledky porovnány se stavem onemocnění určeným u každé pacientky.

Stav onemocnění byl založen na výsledcích histologického vyšetření s tím, že když byla histologie negativní, nebo histologický výsledek chyběl, stav onemocnění byl stanoven cytologií v době kolposkopického vyšetření (viz *tabulka 6*). Test *digene* HC2 HPV DNA byl proveden ve 3 velkých městských zdravotnických střediscích nespojených s pracovišti provádějícími odběr vzorků pro kolposkopii. Cytologie byla provedena v referenční patologické laboratoři a histologie byla provedena v institucích, které provedly kolposkopii. Výsledky testu byly porovnány se stavem onemocnění pro vyhodnocení citlivosti, specifity a negativní a pozitivní prediktivní hodnoty testu pro detekování cervikální neoplazie vysokého stupně. Díky podobnostem mezi charakteristikami chování testu *digene* HC2 HPV DNA pro STM a médií PreservCyt je chování analýzy prezentováno pouze pro roztok PreservCyt.

Nebyl pozorován žádný rozdíl ve výsledcích vysoce rizikového HPV ze vzorků STM a vzorků PreservCyt. Následující tabulka ukazuje výsledky se sondou HPV pro vysoké riziko v této populaci:

Tabulka 6
Algoritmus statutu choroby u pacientek

Výsledek cytologie	Výsledek histologie	Statut choroby
NEG	NEG či neprovedena *	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Tumor	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	neprovedena*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Tumor	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	neprovedena*	HSIL
Tumor	HSIL	HSIL
NEG	Tumor	HSIL+
LSIL	Tumor	HSIL+
HSIL	Tumor	HSIL+
Tumor	neprovedena*	HSIL+
Tumor	Tumor	HSIL+

* Biopsie a/nebo endocervikální kyretáž (ECC) nebyla provedena, protože při kolposkopii nebyly pozorovány žádné abnormality, případně nebyly k dispozici histologické výsledky.

Tabulky 7 a 8 představují chování testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA bylo stanoveno pomocí 327 vzorků PreservCyt, z nichž 96 bylo odebráno ženám, u nichž bylo diagnostikováno cervikální onemocnění vysokého stupně. Srovnání byla provedena s využitím všech studijních pacientek s abnormálními arbitrážními výsledky stěru z děložního čípku. Srovnání jsou vyobrazena pro vzorky PreservCyt testované sondou vysoce rizikového HPV.

Tabulka 7
Výsledky sondy vysoce rizikového HPV

Výsledek Pap nátěru	Konečný statut choroby						Celkem
	HSIL		LSIL		Negativní		
	POZ	NEG	POZ	NEG	POZ	NEG	
Výsledky HPV s vysokým rizikem							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224

HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Celkem	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Tabulka 8 ukazuje, že test *digene* HC2 HPV DNA využívající sondu vysoce rizikového HPV prokázal přibližně 93 % celkovou citlivost pro identifikaci žen s neoplazií vysokého stupně v populaci doporučené ke kolposkopii na základě diagnózy stěru z děložního čípku LSIL, HSIL nebo ekvivalentní. Test rovněž prokázal negativní prediktivní hodnotu téměř 93 % v této populaci.

Tabulka 8
Charakteristiky chování
testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA u pacientek s doporučením
pro Pap nátěr LSIL nebo vyšší a s konečným statutem choroby HSIL

Výsledek sondy HPV pro vysoké riziko	Úroveň Pap LSIL nebo HSIL → HSIL choroba			Celkem
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Celkem		96	231	327

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

95 % CI = 85,6 to 97,0

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

95 % CI = 33,1 to 46,0

četnost výskytu pro úroveň LSIL - vývin do konečné HSIL = 21,4 %

četnost výskytu pro úroveň HSIL - vývin do konečné HSIL = 46,6 %

celková pozitivní prediktivní hodnota = 38,9 % (89/229)

celková negativní prediktivní hodnota = 92,8 % (91/98)

Zatímco se zdá, že specifická testu *digene* HC2 HPV DNA bude poněkud nízká, neočekává se přísná korelace mezi nepřítomností neoplazie a negativním výsledkem HPV. DNA HPV se může vyskytovat u žen, u kterých se nevyvinula choroba do vysokého stupně. Ve skutečnosti, když bylo provedeno testování HPV Polymerase Chain Reaction (PCR) (reakce řetězce polymerázy HPV) (analýza pouze pro výzkumné účely) na vzorcích s pozitivními výsledky testu HPV a jejichž odpovídající stav onemocnění byl nižší než neoplazie nízkého stupně, bylo téměř 75 % pozitivních.

Tabulka 9 ukazuje teoretické pozitivní a negativní předpovídané hodnoty (sonda HPV pro vysoké riziko) pro počáteční LSIL nebo HSIL, které byly identifikovány kolposkopií jako HSIL nebo vážnější forma choroby.

Tabulka 9
Teoretická pozitivní a negativní prediktivní hodnota
Sonda pro vysoce rizikový HPV
počáteční výsledky Pap nátěru LSIL nebo HSIL

Teoretická prevalence pro HSIL	Počáteční výsledek Pap nátěru LSIL nebo HSIL	
	Stanovení pozitivní Prediktivní hodnota	Stanovení negativní Prediktivní hodnota
5	7,4	99,0
10	14,5	97,9
15	21,2	96,8
20	27,6	95,5
25	33,7	94,1
30	39,6	92,6

35	45,1	90,9
40	50,4	89,0
45	55,5	86,8
50	60,4	84,3

ÚDAJE PODPORUJÍCÍ INDIKACI HPV S VYSOKÝM RIZIKEM Z PRIMÁRNÍHO SCREENINGU

Klinická účinnost pro pacientky s normálními výsledky Pap nátěru, které se podrobí screeningu, jako pomocný nástroj pro posouzení rizika a pro zacházení s pacientkami

Níže jsou popsány výsledky osmi nezávislých klinických studií provedených významnými zdravotnickými, univerzitními a vládními institucemi ve Spojených státech a v zahraničí. Studie využívaly zavedené metody stěru z děložního čípku při použití v zemích, kde se studie prováděly. Ve všech případech (kromě dvou) byl použit systém kategorizace Bethesda pro interpretaci výsledků Pap. Kromě toho bylo pro každou studii diagnostikováno cervikální onemocnění vysokého stupně pomocí biopsie řízené kolposkopií. Tyto studie hodnotily klinickou užitečnost testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA při srovnání stěru děložního čípku u starších žen (obecně starších 30-35 let). Všechny studie kromě jedné rovněž prováděly prospektivní testování HPV pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Studie byly průřezovými screeningovými studiemi celkové populace využívající test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, pokud není dále uvedeno jinak. Jak je naznačeno, dvě z osmi screening studií byly provedeny ve Spojených státech, dvě v Evropě, dvě v Latinské Americe, jedna v Africe a jedna v Asii.

Chování testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pozorované v šesti průřezových studiích je shrnuto v tabulkách 10 a 11 pro ženy ve věku 30 let a starší, u nichž byla diagnostikována histologicky potvrzená cervikální neoplazie vysokého stupně, která je definována jako cervikální intraepiteliální neoplazie (definovaná jako CIN 3 nebo závažnější).

Tabulka 10
Odhady chování testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA
Citlivost a specifita

Populace	n	Citlivost (%)			Specifita (%)		
		PAP samotný	HPV samotný	HPV + PAP	PAP samotný	HPV samotný	HPV + PAP
Západní Evropa 1	7592	51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7 453/7 565)	96,2 (275/7 565)	95,1 (7 193/7 565)
		95 % CI	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2- 98,8	95,7-96,6
Latinská Amerika 1	6115	58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5 962/6 038)	93,9 (5 669/6 038)	93,4 (5 637/6 038)
		95 % CI	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5
Latinská Amerika 2 [†]	6176	77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5 745/6 108)	94,0 (5 742/6 108)	89,9 (5 490/6 108)
		95 % CI	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6
Afrika	2925	84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2 436/2 818)	80,0 (2 253/2 818)	76,4 (2 152/2 818)
		95 % CI	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4
Asie	1936	97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1 445/1 894)	83,0 (1 572/1 894)	68,0 (1 287/1 894)
		95 % CI	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0
U.S. 1	1040	50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1 013/1 038)	96,2 (999/1 038)	95,5 (991/1 038)
		95 % CI	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3

[†] Data HC2, byla-li k dispozici, data HCS byla použita jinak, spojená data.

Tabulka 11
Odhady chování testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA
pozitivní a negativní předpovídané hodnoty

Populace	n	Četnost výskytu (%)	Pozitivní prediktivní hodnota (%)			Negativní prediktivní hodnota (%)		
			CIN 3	PAP samotný	HPV samotný	HPV + PAP	PAP samotný	HPV samotný
Západní Evropa 1	7592	0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)
		95 % CI	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0
Latinská Amerika 1	6115	1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		95 % CI	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98
Latinská Amerika 2†	6176	1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)
		95 % CI	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95
Afrika	2925	3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)
		95 % CI	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76
Asie	1936	2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)
		95 % CI	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0
U.S. 1	1040	0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		95 % CI	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0

† Data HC2, byla-li k dispozici, data HCS byla použita jinak, spojená data

Napříč všemi studiemi je tu jednotné a často velmi signifikantní zlepšení citlivosti testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA vůči samotnému stěru z děložního čípku. Stejně tak jako citlivost, negativní prediktivní hodnota (NPV) testu HPV převyšuje ve všech případech hodnotu pro samotný Pap test a blíží se 100 %. Tato NPV ukazuje vysokou pravděpodobnost nepřítomnosti cervikální choroby vysokého stupně nebo rakoviny u cytologicky normálních žen, které nemají HPV infekci.

Přestože je specifická testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA je nižší než u stěru děložního čípku samotného, analýza poměru pravděpodobnosti prokázala, že snížení pozorované specifické není dostatečně významné, aby nepříznivě ovlivnilo klinickou užitečnost využití testu k identifikaci žen, u nichž je malé nebo žádné riziko, že mají cervikální onemocnění nebo že u nich vznikne. Nicméně je důležité, že rozhodnutí doporučit pacientku na kolposkopii je založeno na všech klinických a rizikových informacích a anamnéze pacientky, které má lékař k dispozici. Důležité proměnné zahrnují historii infekcí HPV a/nebo abnormálních stěrů z děložního čípku, věk při prvním pohlavním styku, počet sexuálních partnerů a souběžné pohlavně přenosné choroby^{27,28}.

Ačkoli se četnost výskytu choroby vysokého stupně podstatně nemění ve studiích, podle kterých byla účinnost stanovena, četnost výskytu HPV infekce mezi populací může účinnost ovlivnit, a mění se typicky s populací pacientek. Kromě toho se ukázalo, že prevalence infekce HPV dramaticky klesala s věkem^{28,30-37,41}. Pozitivní prediktivní hodnoty klesají při testování populací s nízkou prevalencí nebo jednotlivců s malým rizikem infekce.

Byly provedeny generační analýzy pomocí výsledků ze dvou studií; jedna byla provedena ve Spojených státech National Cancer Institute (NCI) (Národní ústav pro nádorová onemocnění) v Portlandu, Oregon, a druhou provedli ve Francii v Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims (Laboratoř Pol Bouin C.H.U, Remeš). Tyto průběžné analýzy byly provedeny, aby prokázaly, že pacientky s Pap negativní/HPV negativní mají nižší riziko výskytu cervikální choroby, ve srovnání s tradičně definovanou skupinou žen s nízkým rizikem, jejichž HPV statut není znám, a ve srovnání s pacientkami majícími Pap negativní/HPV pozitivní.

Výsledky těchto průběžných analýz jsou prezentovány v tabulkách 12 a 13 (níže).

Tabulka 12
Souhrn výsledků: NCI a studie z Francie
relativní riziko choroby vysokého stupně

Studijní skupina	Věk	Klasifikace – nízké riziko	n	Případy CIN 3+	Výskyt (na 100 pacientko-let)	Relativní riziko (95% CI)
NCI	30 let a starší	Pap normální, HPV negativní	12 054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		po sobě jdoucí normální testy Pap*	9 429	19	0,048	1,000
	Všechny	Pap normální, HPV negativní	17 594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		po sobě jdoucí normální testy Pap*	13 392	44	0,082	1,000
Francie	30 let a starší	Pap normální, HPV negativní	1 690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		po sobě jdoucí normální testy Pap*	2 026	4	0,099	1,000
	Všechny	Pap normální, HPV negativní	2 180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		po sobě jdoucí normální testy Pap*	2 650	7	0,136	1,000

*Tři normální testy Pap ročně, po dobu přibližně 2 let.

Tabulka 13
Souhrn výsledků: NCI a studie z Francie
výskyt choroby stratifikovaný podle statutu HPV na základní čáře

Studijní skupina	Věk	Počáteční statut	n	Případy CIN 3+	Výskyt (na 100 pacientko-let)	Relativní riziko (95% CI)
NCI	30 let a starší	Pap normální, HPV pozitivní	1 078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Pap normální, HPV negativní	12 054	28	0,043	1,00
	Všechny	Pap normální, HPV pozitivní	2 561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Pap normální, HPV negativní	17 594	48	0,056	1,00
Francie	30 let a starší	Pap normální, HPV pozitivní	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap normální, HPV negativní	1 696	3	0,084	1,00
	Všechny	Pap normální, HPV pozitivní	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap normální, HPV negativní	2 180	3	0,066	1,00

Klinická užitečnost výsledků testu HPV se dále projevuje tím, že ukáže zvýšené riziko cervikální choroby u HPV pozitivních žen ve srovnání s HPV negativními ženami.

ANALYTICKÁ CITLIVOST

Byl testován neklinický panel plazmidové DNA klonovaného HPV, aby se stanovilo, zda každý ze 18 typů HPV je detekovatelný testem *digene* HC2 HPV DNA a určila analytická citlivost analýzy pro každý z typů HPV. Pro každou cílovou koncentraci HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml a 0,2 pg/ml) od každého z 18 DNA typů HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68) byl třikrát proveden pokus se sondou HPV pro nízké riziko nebo sondou HPV pro vysoké riziko, podle potřeby. Byl vypočítán průměrný signál RLU pro každou koncentraci každého typu HPV a porovnána s pozitivním kalibrátorem.

Detekovatelná hranice každého typu HPV v STM je uvedena v tabulce 14. Detekovatelné hranice se pohybovaly od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml, v závislosti na testovaném typu HPV. Všechny typy HPV byly detekovatelné při odhadnuté úrovni 1,09 pg cílové DNA HPV na 1 ml STM vzorku. Průměrná hranice detekovatelnosti všech 18 DNA typů HPV byla 1,09 pg/ml se standardní odchylkou 0,05.

Tabulka 14
Souhrn mezí detekce testu *digene* HC2 HPV DNA
citlivosti pro každý typ DNA HPV v STM

DNA HPV typ	Detekovatelná koncentrace DNA HPV (pg/ml)	standard odchylka	95 % spolehlivost Rozsah
6	1,33	0,03	1,22-1,46
11	1,13	0,05	1,00-1,29
16	1,09	0,06	0,94-1,29
18	1,05	0,05	0,88-1,29
31	1,01	0,05	0,91-1,15
33	1,35	0,02	1,26-1,45
35	1,11	0,05	0,95-1,31
39	1,39	0,09	1,16-1,71
42	1,20	0,05	1,02-1,44
43	0,85	0,03	0,86-1,07
44	1,17	0,04	1,02-1,36
45	1,14	0,04	0,99-1,35
51	0,78	0,10	0,70-0,88
52	1,37	0,06	1,21-1,58
56	0,62	0,04	0,58-0,67
58	0,82	0,04	0,73-0,94
59	1,10	0,06	1,00-1,21
68	1,19	0,04	1,03-1,39
Průměr (všechny typy)	1,09	0,05	0,97-1,27

ÚČINNOST KOMBINOVANÉ SMĚSNÉ SONDY (CPC)

Stejný neklinický panel plazmidové DNA HPV popsany shora byl testován s cílem stanovit analytickou citlivost každého z 18 typů HPV v testu *digene* HC2 HPV DNA podle protokolu koktailu kombinovaných sond (CPC), jak to popisuje tato příbalová informace. Analytická citlivost pro protokol CPC se pohybovala od 0,58 pg/ml do 1,39 pg/ml a všechny typy HPV byly detekovatelné při odhadnuté úrovni 0,95 pg/ml cílové DNA HPV na 1 ml vzorku. Průměrná mez detekovatelnosti všech 18 typů HPV byla 0,95 pg/ml se směrodatnou odchylkou 0,07. Tato citlivost je ekvivalentní analytické citlivosti, kterou naleznete u metody duální sondy testu *digene* HC2 HPV DNA.

EKVIVALENCE MEZI VZORKY STM A ROZTOKU PRESERVICYT

Ekvivalence mezi vzorky STM a roztoku PreservCyt byla zkoumána z hlediska rovnocenné obnovy DNA HPV 18 z přibližně 10^6 pozitivních buněk HeLa obsahujících integrovaných 18 genomů HPV přimíchaných do STM a negativního buněčného souboru roztoku PreservCyt. Každý typ vzorku byl zpracován podle svých příslušných postupů zpracování/denaturace popsanych v příslušném návodu a testován testem *digene* HC2 HPV DNA pomocí sondy vysoce rizikového HPV. Výsledky prokázaly, že výtěžek DNA 18 HPV z lidských nádorových buněk je ekvivalentní pro tato dvě média a že postup přípravy roztoku PreservCyt neovlivňuje analytickou citlivost testu *digene* HC2 HPV DNA.

KORELACE VÝSLEDKU VZORKŮ SUREPATH SE VZORKY STM V KLINICKÉ POPULACI

Klinické hodnocení ve dvou fázích bylo vedeno v 6 sběrných centrech a 3 testovacích místech v rámci USA. Pro účast ve studii byli vybráni pacienti navštěvující kliniky STD, porodní/gynekologickou kliniku,

kolposkopickou kliniku, nemocnice nebo centra plánovaného rodičovství podle předem stanovených kritérií pro zařazení a vyloučení ze studie. Ve fázi proveditelnosti, určené ke stanovení vhodné hraniční hodnoty analýzy *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro použití vzorků SurePath, bylo přibližně zařazeno 400 pacientek. Klinická validační fáze, kdy bylo zařazeno přibližně 1.500 pacientek pro vyhodnocení zvolené hraniční hodnoty analýzy, začala po předběžné analýze fáze proveditelnosti a prokázala, že hraniční hodnota analýzy 1,0 RLU/CO využívající vzorky SurePath, dosáhla přijatelné shody s výsledky vzorků STM.

V obou hodnotících fázích byly spárovány cervikální vzorky SurePath a STM od všech účastníků ženského pohlaví, které k tomu daly souhlas. Vzorky SurePath byly poté odeslány do cytologické laboratoře k přípravě sklíčka. Po cytologické přípravě byly testovány zbývající vzorky SurePath a odpovídající vzorky STM testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA s využitím hraniční hodnoty analýzy 1,0 RLU/CO.

Tabulka 15 uvádí korelaci výsledků SurePath se spárovanými vzorky STM ve finálních výsledcích vhodných pro analýzu dat získaných z celkové populace účastníků.

Tabulka 15
Shoda výsledku SurePath s STM
(všech věkových kategorií a všech cytologických typů)
(n = 1 490)

Pozitivní shoda % 95 % CI (n/N)		Negativní shoda % 95 % CI (n/N)	
Všechny pozitivní	Subset vysoce pozitivních (RLU/CO ≥ 2,5)	Všechny negativní	Subset s nízkou negativitou RLU/CO (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1 011/1 061)	96,0 94,6, 97,1 (1 002/1 044)

Výsledky predikují, že relativní citlivost a specifická analýza používající vzorky SurePath vysoce koreluje s výsledky obsaženými v testování vzorků typu STM, jak to prokazuje nižší limit 95 % intervalu spolehlivosti jak pro pozitivní, tak negativní shodu.

REPRODUKOVATELNOST

Byla provedena multicentrická studie reprodukovatelnosti pro stanovení reprodukovatelnosti mezi dny, pracovišti a celkové reprodukovatelnosti testu *digene* HC2 HPV DNA s využitím panelů cílů DNA HPV a HPV pozitivních a HPV negativních klinických vzorků.

Tři externí laboratoře prováděly testování se stejnou šarží sad testů *digene* HC2 HPV DNA ve 3 různých dnech s identickým panelem reprodukovatelnosti. Panel reprodukovatelnosti zahrnoval následující vzorky: 12 denaturovaných klinických STM rezervoárů vzorků; 3 nedenaturované klinické rezervoáry vzorků PreservCyt roztoku; negativní kalibrátor; pozitivní kalibrátory pro nízké riziko a vysoké riziko, v koncentracích 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml a 10 pg/ml. Všichni členové panelu byly testovány každý den trojmo jak sondou vysoce rizikového HPV, tak metodami CPC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16
Souhrn celkové statistiky pro
multicentrickou reprodukovatelnost testu *digene* HC2 HPV DNA.

Statistická Měřit	SONDA PRO VYSOCE RIZIKOVÝ HPV	Kombinovaná směsná sonda (CPC)	Kombinované Výsledky sondy pro vysoce rizikový HPV a CPC^a
Podíl očekávaných pozitivních výsledků a pozorovaných pozitivních výsledků	100 % (99,0–100,0)	99,8 % (98,92–100,0)	99,9 % (99,38–100,0)
Podíl očekávaných negativních a pozorovaných negativních výsledků	99,0 % (97,49-99,73)	98,9 % (96,79-99,77)	99,0% (97,88-99,58)
Shoda	99,5 % (98,70-99,86)	99,5 % (98,70-99,86)	99,5 % (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^aČísla v závorkách označují intervaly spolehlivosti 95 %. Celkové údaje jsou kombinací všech pokusů ve všech centrech.

To naznačuje, že je reprodukovatelnost testu *digene* HC2 HPV DNA s klinickými vzorky odebranými v STM velmi dobrá.

ZKŘÍŽENÁ REAKTIVITA

PANEL ZKŘÍŽENÉ REAKTIVITY

Testem *digene* HC2 HPV DNA použitým se sondami HPV byla analyzována baterie bakterií, virů a plazmidů, které se běžně nachází v ženském anogenitálním traktu společně se sbírkou kožních HPV typů, pro něž jsou k dispozici klony, s cílem určit, zda se vyskytla křížová reaktivita. Všechny mikroorganismy byly analyzovány při koncentracích 1×10^5 a 1×10^7 organismů na ml. Čištěné vzorky DNA virů a plazmidů byly testovány při koncentraci 4 ng/ml.

Níže je uveden seznam testovaných bakterií. Všechny testované bakterie byly v testu *digene* HC2 HPV DNA negativní:

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

* Byl analyzován jak kmen *E. coli* použitý pro růst plazmidů (HB101), tak klinický izolát *E. coli*.

Níže je uveden seznam testovaných virových či plazmidových DNA nebo lidského séra:

Adenovirus 2	lidský papillomavirus typu 1
Cytomegalovirus	lidský papillomavirus typu 2
Virus Epsteina-Barrové	lidský papillomavirus typu 3
Sérum pozitivní na povrchový antigen hepatitidy B	lidský papillomavirus typu 4
Herpes Simplex I	lidský papillomavirus typu 5
Herpes Simplex II	lidský papillomavirus typu 8
Virus humánní imunodeficiency (HIV, RT, DNA)	lidský papillomavirus typu 13
Simianův virus typu 40	lidský papillomavirus typu 30
	pBR322

Jedinými viry nebo plazmidy, které vykazovaly zkříženou reaktivitu v testu *digene* HC2 HPV DNA, byly HPV typu 13 a plazmid pBR322. DNA HPV 13 reagovala pouze se sondou HPV pro nízké riziko. HPV 13 je často detekován v lézích na rtech určitých etnických skupin, ale nebyl detekován v anogenitálním traktu.²⁹ Proto by se neočekávalo, že zkřížená reaktivita pozorovaná mezi HPV 13 a sondou nízkorizikového HPV testu *digene* HC2 HPV DNA způsobí klinicky matoucí výsledek pro anogenitální vzorky. Křížová reaktivita mezi pBR322 a sondami nízkorizikového a vysoce rizikového HPV testu *digene* HC2 HPV DNA se nepředpokládá, protože je obtížné odstranit veškerou vektorovou pBR322 DNA při izolaci vločky HPV. Přítomnost homologových sekvencí pBR322 byla hlášena ve vzorcích z lidských genitálů a falešně pozitivní výsledky by se mohly vyskytnout za přítomnosti vysokých hladin bakteriálního plazmidu. Ovšem u 298 klinických vzorků testovaných jako pozitivní sondami nízkorizikového a vysoce rizikového HPV testu *digene* HC2 HPV DNA se ukázalo, že nemá pozitivní výsledky kvůli pBR322, když byly

testovány sondou pBR322. Pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku testu *digene* HC2 HPV DNA kvůli homologovým sekvencím pBR322 v klinických vzorcích se zdá být nízká.

ZKŘÍŽENÁ HYBRIDIZACE

Každý z 18 typů HPV byl testován jak sondou pro nízké riziko, tak sondou pro vysoké riziko při koncentracích 4 ng/ml DNA HPV. Bylo očekáváno, že se všechny cílové HPV projeví jako pozitivní (s příslušnou skupinou sond), zatímco u žádných ze vzorků nebyl očekáván pozitivní výsledek s opačnou skupinou sond. Tato studie ukázala, že existuje nízký rozsah zkřížené hybridizace mezi HPV typy 6 a 42 (typy HPV s nízkým rizikem) a skupinou sond pro vysoké riziko (sonda HPV s vysokým rizikem). Vzorky s vysokými úrovněmi DNA HPV 6 či HPV 42 (4 ng/ml či vyšší) mohou být pozitivní pro obě skupiny sond. Klinický význam tohoto zjištění spočívá v tom, že pacientky s DNA HPV 6 či HPV 42 s úrovní 4 ng/ml či vyšší mohou být poslány na kolposkopii.

Navíc se ukázalo, že sonda vysoce rizikového HPV reaguje zkříženě s typy HPV 40, 53 a 66. Tyto typy jsou vzácné a není dostatek důkazů pro stanovení přesné korelace mezi infekcí těmito typy a vznikem onemocnění vysokého stupně³⁸. Pacienti, jejichž vzorky obsahují vysoké hladiny těchto typů DNA HPV mohou být nesprávně doporučeni na kolposkopii. V literatuře se rovněž uvádělo, že složité sondy podobné těm, které byly v tomto testu použity mohou způsobovat falešně pozitivní výsledky kvůli zkřížené hybridizaci typy HPV 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 nebo MM9.³⁹ Přestože jsou některé z těchto typů HPV vzácné nebo nové typy, s nimiž se často nesetkáváme u onemocnění vysokého stupně, pacientky, jejichž vzorky obsahují vysoké hladiny těchto typů DNA HPV mohou být nesprávně doporučeny ke kolposkopii.

VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY STM

V testu *digene* HC2 HPV DNA byl vyhodnocen účinek krve a jiných, potenciálně rušících, definovaných či nedefinovaných látek. K STM negativním a pozitivním vzorkům (soubory klinických vzorků a neklinických vzorků) byla přidána celá krev, vaginální roztok, antifungální krém a antikoncepční gel (látky, které se mohou běžně nacházet v cervikálních vzorcích) v koncentracích, které lze v cervikálních vzorcích nalézt. U žádné ze čtyřech látek nebyly v žádné koncentraci pozorovány žádné falešně pozitivní výsledky. Falešně negativní výsledky mohou být však nalezeny u klinických vzorků s úrovněmi DNA HPV v blízkosti kladné hranice positivity pro stanovení (1 pg/ml), jsou-li přítomny vysoké úrovně protiplísňového krému nebo antikoncepčního žele. Je však velice nepravděpodobné, že by klinický vzorek sestával téměř výhradně z jedné z těchto látek, protože cervix je normálně očištěn před odběrem vzorků pro Pap nátěr a testování HPV.

VLIV KRVE A JINÝCH LÁTEK NA VZORKY ROZTOKU PRESERVYCYT

V testu *digene* HC2 HPV DNA byl vyhodnocen účinek krve a jiných, potenciálně rušících, definovaných či nedefinovaných látek přítomných ve vzorcích roztoku PreservCyt. K negativním a pozitivním vzorkům roztoku PreservCyt (soubory klinických vzorků a neklinických vzorků) byla přidána celá krev, vaginální roztok, antifungální krém a antikoncepční gel (látky, které se mohou běžně nacházet v cervikálních vzorcích) v koncentracích, které lze v těchto vzorcích nalézt. U žádné ze čtyřech látek nebyly v žádné koncentraci pozorovány žádné falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Navíc látky přítomné v některých klinických vzorcích nebrání detekci DNA HPV testem *digene* HC2 HPV DNA.

REPRODUKOVATELNOST TESTU *digene* HC2 HPV DNA S KLINICKÝMI VZORKY ODEBRANÝMI V STM

Reprodukovatelnost testu *digene* HC2 HPV DNA s klinickými vzorky odebranými v STM byla stanovena ve studii používající 20 klinických souborů (10 pozitivních a 10 negativních) připravených kombinací předchozích denaturovaných a testovaných vzorků odebraných v STM kartáčky. Vzorky byly testovány v replikátech po 4 v každý z 5 dnů, celkem 20 replikátů na vzorek. Testování bylo provedeno s použitím metody kombinované směšné sondy. Průměry, standardní odchylky a 95 % intervaly spolehlivosti kolem průměru (CI) byly vypočítány pro každý vzorek během jednoho dne a pro pětidenní interval; výsledky jsou v Tabulce 17.

Tabulka 17
Průměry RLU/CO s intervaly spolehlivosti a procenta pozitivních výsledků
(v sestupném pořádku podle průměru RLU/CO)

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

Pro 5 vzorků s průměrem RLU/CO 20 % nebo více nad hranicí positivity (č.1-5), 100 ze 100 replikátů (100,0 %) bylo pozitivních. U 5 vzorků s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod hraniční hodnotou analýzy (č. 6-10) bylo pozitivních 60 ze 100 (60 %) replikátů a 40 ze 100 (40 %) bylo negativních. Pro 10 vzorků s průměrem RLU/CO více než 20 % pod hranicí positivity zkoušky, 200 ze 200 replikátů (100 %) bylo negativních.

Lze říci, že vzorky s průměrem RLU/CO 20 % nebo více nad hranicí positivity byly pozitivní po 100 % dané doby, zatímco vzorky s průměrem RLU/CO více než 20 % pod hranicí positivity byly negativní po 100 % dané doby, což znamená, že u vzorků s 20 % nebo více vzdálenými od hranice positivity lze očekávat spolehlivé výsledky. Vzorky blízko hranice positivity poskytovaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že vzorky STM získané testem *digene* HC2 HPV DNA dávají reprodukovatelné výsledky.

REPRODUKOVATELNOST TESTU *digene* HC2 HPV DNA S KLINICKÝMI VZORKY ODEBRANÝMI V ROZTOKU PRESERV CYT

Reprodukovatelnost testu *digene* HC2 HPV DNA s klinickými vzorky odebranými v roztoku PreservCyt byla stanovena ve studii používající 24 modelových vzorků v rozpětí koncentrací z pokrývajícím rozsah koncentrací DNA HPV. Vzorky obsahovaly roztok PreservCyt a bílé krvinky s a bez bakterií obsahujících 16 plazmidů HPV.

Vzorky byly testovány ve 4 replikacích, každý den z pěti dnů, a nakonec byl celkový počet replikátů na vzorek rovný 20. Každý den z 5 ve studii bylo zpracováno a testováno 8 ml alikvotního množství z každého vzorku podle návodu k použití sady *digene* HC2 Sample Conversion pro použití pouze se sondou vysoce rizikového HPV. Průměry, standardní odchylky a 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány pro každý vzorek během jednoho dne, pro pětidenní interval a pro replikáty. Průměrný interval spolehlivosti RLU/CO okolo průměru a procentuální podíl pozitivních replikátů je uveden v tabulce 18 pro každý vzorek v sestupném pořadí podle průměrného RLU/CO.

Tabulka 18
Průměry RLU/CO s intervaly spolehlivosti a procenta pozitivních výsledků
(v sestupném pořádku podle průměru RLU/CO)

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

Pro 6 vzorků s průměrem RLU/CO 20 % nebo více nad hranicí positivity (č. 1-6), 114 ze 120 replikací (95,0 %) bylo pozitivních. U 7 vzorků s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod hraniční hodnotou analýzy (č. 7-13) bylo pozitivních 88 ze 139 (63,3 %) replikátů a 51 ze 139 (36,7 %) bylo negativních. Pro 4 vzorky uvnitř intervalu 10 % nad nebo pod hranicí positivity (č. 10-13), 41 z 79 (51,9 %) replikátů bylo pozitivních a 38 (48,1 %) bylo negativních. Pro 11 vzorků s průměrem RLU/CO více než 20 % pod hranicí positivity zkoušky, 220 z 220 replikátů (100 %) bylo negativních.

Lze tedy říci, že vzorky s průměrem RLU/CO 20 % nebo více nad hranicí positivity byly pozitivní po více než 95 % dané doby, zatímco vzorky s průměrem RLU/CO 20 % nebo více pod hranicí positivity byly negativní po 100 % dané doby, což znamená, že u vzorků 20 % nebo více vzdálenými od hranice positivity lze očekávat spolehlivé výsledky. Vzorky blízko hranice positivity poskytovaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že vzorky roztoku PreservCyt získané testem *digene* HC2 HPV DNA dávají reprodukovatelné výsledky.

REPRODUKOVATELNOST TESTU *digene* HC2 HPV DNA S KLINICKÝMI VZORKY ODEBRANÝMI V KONZERVAČNÍ KAPALINĚ SUREPATH

Hodnocení reprodukovatelnosti byla prováděna s cílem charakterizovat schopnost 3 různých laboratoří získat podobný diagnostický výsledek v různých dnech a s různými chody z identické sady vzorků se známým stavem pozitivního/negativního HPV při použití hraniční hodnoty analýzy 1,0 RLU/CO. Panel vzorků pro reprodukovatelnost obsahoval 5 HPV pozitivních vzorků, 2 vzorky s koncentrací DNA HPV blízko hodnoty hranice positivity a 5 HPV negativních vzorků.

Součástí panelu byly připraveny spojením unikátních patientských vzorků SurePath se známým stavem positivity/negativity HPV za účelem získání požadovaných cílových hodnot RLU/CO. Každá součást panelu byla testována dvojmo, každý den dvakrát po dobu pěti dnů v každé ze tří spolupracujících laboratoří.

Tabulka 19
Studie reprodukovatelnosti vzorků SurePath
Kvalitativní výsledky podle jednotlivých součástí panelu

Součást panelu	Průměr RLU/CO	Očekávaný výsledek	HPV pozitivní n (%)	HPV negativní n (%)
1	0,20	negativní	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativní	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativní	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativní	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativní	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativní	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	pozitivní	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	pozitivní	60 (100)	0 (0)
9	25,65	pozitivní	60 (100)	0 (0)
10	81,52	pozitivní	60 (100)	0 (0)
11	154,18	pozitivní	60 (100)	0 (0)
12	765,29	pozitivní	60 (100)	0 (0)

REPRODUKOVATELNOST VÝSLEDKU SUREPATH PŘI POUŽITÍ SYSTÉMU RAPID CAPTURE PRO ZPRACOVÁNÍ ANALÝZY

Výsledky reprodukovatelnosti vzorků SurePath, když pro zpracování testu byl použit systém Rapid Capture System byly porovnány s výsledky získanými za použití manuálního zpracování testu. Byly provedeny dva porovnávací testy na oddělených částech stejné zpracovaného vzorku.

Tabulka 20
Shoda výsledků vzorků SurePath - uvnitř běhu - s výsledky RCS
(RCS oproti manuálnímu testu)

Pozitivní shoda % 95 % CI (n/N)		Negativní shoda % 95 % CI (n/N)	
Všechny pozitivní	Subset vysoce pozitivních (RLU/CO ≥ 2,5)	Všechny negativní	Subset s nízkou negativitou RLU/CO (< 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1 057/1 079 96,9, 98,7	98,7 1 050/1 064 97,8, 99,28

OMEZENÍ POSTUPU

Pro diagnostické použití *in vitro*

Další omezení postupu konkrétně se týkající používání tohoto systému pro testování vysokokoobjemové propustnosti vzorků viz Příručka uživatele Rapid Capture System.

- Test *digene* HC2 HPV DNA pro typy HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68 se nedoporučuje pro hodnocení podezření na pohlavní zneužívání.
- Výskyt infekce HPV mezi populací může ovlivnit účinnost postupu. Pozitivní prediktivní hodnoty klesají při testování populací s nízkou prevalencí nebo jednotlivců bez rizika infekce.
- Negativní výsledek nevylučuje možnost infekce HPV, protože velmi nízké úrovně infekce nebo chyba při odběru vzorku může způsobit falešně negativní výsledek.
- Test *digene* HC2 HPV DNA rozlišuje mezi 2 skupinami typů HPV: HPV 6/11/42/43/44 a 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Test však neposkytne rozlišení mezi typy virů uvnitř těchto skupin.
- Test *digene* HC2 HPV DNA lze použít pouze s cervikálními vzorky odebranými odběrovým zařízením *digene* HC2 DNA nebo u biopsií odebraných v STM nebo u cervikálních vzorků odebraných s využitím odběrového zařízení kartáčkového typu či kombinací kartáček/špachtle a uložených do roztoku PreservCyt, případně u cervikálních vzorků odebraných v konzervační kapalině SurePath. Bioptické vzorky lze analyzovat pouze v případě, že jsou ihned vloženy do STM a do analýzy uchovávány při -20°C.
- Odběrové zařízení *digene HC2 DNA* by se nemělo používat k odběru vzorků od těhotných žen.
- Infekce HPV není ještě definitivním důkazem přítomnosti vysokého stupně cervikální choroby, ani neznamená, že ve všech případech dojde ke vzniku vysokého stupně choroby nebo karcinomu.
- Existuje nízký stupeň zkřížené hybridizace mezi typy HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 a MM9, a sondou HPV pro vysoké riziko. Pacienti se vzorky obsahujícími vysoké hladiny těchto typů HPV mohou být nesprávně doporučení na kolposkopii³⁸.
- Test *digene* HC2 HPV DNA je navržen k detekci typů nízkého rizikového a vysoce rizikového HPV, včetně 39, 58, 59 a 68. Analytické studie provedené společností QIAGEN pomocí plazmidové DNA klonovaného HPV prokázaly, že tato analýza detekuje tyto typy v hladinách od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml. To je ekvivalentní charakteristikám detekce jiných typů HPV, které jsou cílem testu *digene* HC2 HPV DNA. Společnost QIAGEN dokázala validovat detekci těchto typů HPV pouze u omezeného počtu klinických vzorků. Díky nízké prevalenci těchto typů v celkové populaci (jak prokázal Bosch et. al.³⁶) charakteristiky chování testu *digene* HC2 HPV DNA pro detekci typů HPV 39, 58, 59 a 68 nebyly statisticky potvrzeny.
- Jsou-li přítomny vysoké koncentrace protiplísňového krému, antikoncepčního žele či výplachu v době, kdy je vzorek odebírán pro HPV test, existuje pravděpodobnost, že budou obdrženy falešně negativní výsledky v případě, že tyto vzorky obsahují úrovně DNA HPV, které poskytují hodnoty RLU/CO blízko hranice positivity stanovení.
- Je možná zkřížená reaktivita mezi sondou testu *digene* HC2 HPV DNA a plazmidovým pBR322. Přítomnost homologových sekvencí pBR322 byla hlášena ve vzorcích z lidských genitálů a falešně pozitivní výsledky by se mohly vyskytnout za přítomnosti vysokých hladin bakteriálního plazmidu.

LITERATURA

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829-2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374-384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899-901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.

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

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Pozorování	Pravděpodobné příčiny	Roztoky
Nesprávná nebo žádná barevná změna pozorovaná během denaturace.	<p>Denaturační činidlo nebylo správně připraveno nebo nebylo přidáno denaturační činidlo.</p> <p>Vzorky obsahují krev nebo jiné materiály, které maskují změnu barvy.</p> <p>pH vzorku může být neobvykle kyselé.</p>	<p>Zajistěte, aby denaturační reagentie obsahovala barva indikátoru a měla tmavě fialovou barvu.</p> <p>Přidejte denaturační reagentii ke vzorku měřením objemu vzorku (očekává se 1,5 ml). Jestliže objem ukazuje, že nebyla přidána denaturační reagentie, přidejte ji, zamíchejte a, je-li pak pozorována příslušná barevná změna, pokračujte ve stanovení.</p> <p>Popsaná přesná změna barvy se u těchto typů vzorků neočekává; výsledky testu <i>digene</i> HC2 HPV DNA by neměly být nepříznivě ovlivněny.</p> <p>Jestliže neplatí žádné jiné příčiny, vzorek může být neobvykle kyselý a nedojde k očekávané barevné změně. Před použitím kyseliny octové na děložní čípek odeberte nový vzorek, protože nesprávné pH vzorku nepříznivě ovlivní výsledky testu.</p>
Kontroly kvality poskytují nesprávné výsledky.	<p>Pro daný test byl zvolen nesprávný protokol software (tj. CPC protokol pro metodu dvou sond).</p> <p>Obrácené umístění QC1-LR a QC2- HR.</p> <p>Obrácené umístění LRC a QC1-LR nebo HRC a QC1-HR</p>	<p>Jestliže je zvolen nesprávný protokol softwaru pro daný test, mohou být mikrodestičky znovu odečteny během 30 minut po přidání detekčního činidla 2 za použití správného protokolu.</p> <p>Vzorky znovu otestujte.</p> <p>Vzorky znovu otestujte.</p>
Nesprávná nebo žádná barevná změna pozorovaná během hybridizace.	<p>Nedostatečné smísení směsné sondy s denaturovanými kalibrátory, kontrolami, nebo vzorky; nebo nebyla přidána směsná sonda; nebo byl přidán nesprávný objem činidla.</p> <p>Vzorky obsahují krev nebo jiné materiály, které maskují změnu barvy.</p> <p>Vzorek měl < 1 000 µl STM.</p>	<p>Třeptejte hybridizační mikrodestičku nebo mikrozkumavku po další 2 minuty. Jestliže některé jamky ještě zůstaly fialové, přidejte dalších 25 µl příslušné směsné sondy a dobře promíchejte. Jestliže se příslušná barevná změna neprojeví po přidání sondy a novém protřepání a vzorek neobsahuje krev nebo jiné materiály, proveďte test na vzorku znovu.</p> <p>Popsaná přesná změna barvy se u těchto typů vzorků neočekává; výsledky testu <i>digene</i> HC2 HPV DNA by neměly být nepříznivě ovlivněny.</p> <p>Zkontrolujte objem původního vzorku. Objem by měl být 1 350 µl ±20 µl (po odebrání 75 µl sondy HPV pro nízké a pro vysoké riziko). Je-li objem < 1 350 µl, původní vzorek obsahoval < 1 000 µl STM. Získejte nový vzorek.</p>

Pozorování	Pravděpodobné příčiny	Roztoky
<p>Analýza nespĺňuje validační kritéria. Nebyl pozorován žádný signál u kalibrátoru, kontrol kvality či u vzorků.</p>	<p>K roztoku pro ředění sondy nebyla přidána žádná sonda.</p> <p>Sonda byla během přípravy kontaminována RNázou.</p> <p>Nedostatečné smísení sondy a roztoku pro ředění sondy.</p> <p>Nedostatečné smísení zředěné sondy a denaturovaného vzorku.</p> <p>Nesprávná doba nebo teplota během hybridizačního kroku.</p> <p>Nedostatečné smísení během kroku imobilizace.</p> <p>Zaměněné sondy/směsné sondy/hybridizační zkumavky.</p> <p>Přidání nesprávného množství detekčního činidla 1 nebo inkubace provedena po nesprávnou dobu.</p> <p>Přidání nesprávného množství detekčního činidla 2 nebo inkubace provedena po nesprávnou dobu.</p> <p>Nesprávná funkce luminometru nebo nesprávné naprogramování.</p>	<p>Připravte Probe Mixes (směsi sond) podle popisu uvedeného v tomto návodu k použití. Zkumavky pečlivě označte.</p> <p>Když pipetujete sondu, použijte špičky pipet s aerosolovým filtrem a ochranné rukavice. Používejte pouze čisté, nové, jednorázové nádoby na reagenty.</p> <p>Po přidání sondy k roztoku pro ředění sondy velice důkladně promíchejte do víru (vortexing) vysokou rychlostí po dobu nejméně 5 vteřin. Musí dojít k viditelnému protřepání.</p> <p>Po přidání směsné sondy a vzorku do každé hybridizační jamky mikrodestičky či mikrozukmavky, třepejte na rotační třepačce I nastavené na 1 100 ±100 ot/min po 3 ±2 minuty. Zkontrolujte, že barevná změna z fialové do žluté proběhla v každé zkumavce/jamce mikrodestičky.</p> <p>Proveďte hybridizaci po 60 ±5 minut při 65 ±2 °C. Zkontrolujte teplotu mikrodestičkového inkubátoru I či vodní lázně. Dbejte na to, aby Microplate Heater I (ohříváč mikrodestičky I) nebo vodní lázeň byla nastavena k ohřevu vzorků na správnou teplotu a byla před použitím 60 minut předehřívána. Dbejte na to, aby hladina vody byla adekvátní pro ohřev vzorků na správnou teplotu. Vodní lázně by měly být pravidelně kalibrovány.</p> <p>Protřepejte na třepačce Rotary Shaker I 60 ± 5 minut při 20-25 °C, jak je to popsáno v tomto návodu. Ověřte otáčky třepačky Rotary Shaker I kalibrací, jak je uvedeno v odstavci Kalibrace otáček třepačky <i>Návodu k použití třepačky Rotary Shaker I</i>.</p> <p>Pozorně připravte směsné sondy a označte příslušné zkumavky těchto sond. Buďte opatrní při přidání správné sondy do správné sady hybridizačních zkumavek. Označte zkumavky se směsnými sondami, hybridizační zkumavky nebo stojánky, aby se snížilo na minimum riziko záměny.</p> <p>Napipetujte 75 µl detekčního činidla 1 do každé jamky za použití 8-kanálové pipety. Proveďte inkubaci při 20-25 °C po 30-45 minut.</p> <p>Napipetujte 75 µl detekčního činidla 2 do každé jamky za použití 8-kanálové pipety. Proveďte inkubaci při 20-25 °C po 15 až 30 minut.</p> <p>Další pokyny viz návod k použití nebo zavolejte svému místnímu zástupci QIAGEN.</p>

Pozorování	Pravděpodobné příčiny	Roztoky
<p>Zvýšené hodnoty RLU v kalibrátorech, kontrolách kvality a/nebo vzorcích (≥200 RLU v mnoha nebo všech jamkách mikrodestičky). Analýza možná nespĺňuje validační kritéria.</p>	<p>Nebylo přidáno denaturační činidlo; nebo přidán nesprávný objem činidla; nebo je nedostatečné smísení denaturačního činidla se vzorky či kalibrátory.</p> <p>Dochází k úniku světla u luminometru. Dvířka nejsou těsně uzavřena. Těsnění dvířek je vadné.</p> <p>Kontaminace detekčního činidla 2 či imobilizačních jamek na mikrodestičce detekčním činidlem 1 nebo exogenní alkalickou fosfatázou.</p> <p>Kontaminovaný promývací pufr.</p> <p>Kontaminovaná Automated Plate Washer (automatická promývačka desek).</p> <p>Nedostatečné promytí imobilizačních jamek na mikrodestičce po inkubaci s detekčním činidlem 1.</p> <p>Kontaminace jamek mikrodestičky detekční reagensy 1.</p> <p>Vysušení (blotování) hybridizačního roztoku na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers či na odpovídajících papírových ubrouscích bez vláken.</p> <p>Použity nesprávné blotovací ubrousky.</p>	<p>Dbejte na to, aby opakovací pipetovač před přidáním denaturační reagensie přesně dávkoval. Kalibrovaná pipetovací zařízení jsou naprosto nutná. Přidejte polovinu objemu denaturačního činidla do každé zkumavky a dobře promíchejte. Aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům, zajistěte, aby kapaliny promývala celý vnitřní povrch zkumavky. Kalibrátory, kontroly kvality a vzorky mají po přidání denaturačního činidla zřítovět.</p> <p>Zkontrolujte hodnotu pozadí pro luminometr tím, že přečtete údaj pro prázdnou mikrodestičku. Údaj vyšší než 50 RLU ukazuje, že existuje únik světla. Další pokyny viz návod k použití nebo zavolejte svému místnímu zástupci QIAGEN.</p> <p>Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.</p> <p>Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.</p> <p>Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.</p> <p>Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát promývacím pufrům, pokaždé přeplňte plnicí jamky nebo použijte automatickou promývačku destiček. V jamkách by po promývání neměla zůstat žádná zbytková růžová kapalina. Viz <i>Automated Plate Washer Uživatelská příručka</i>, kde naleznete další pokyny ohledně kontaminace nebo vadných funkcí.</p> <p>Zajistěte, aby všechny pracovní povrchy zůstaly čisté a suché. Při použití detekční reagensie 1 postupujte opatrně. Chraňte aerosoly.</p> <p>Neblotujte na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers, či na odpovídajících papírových ubrouscích bez vláken, které byly již dříve použity.</p> <p>Pro vysušení (blotování) použijte tampóny Kimtowels Wipers či odpovídající papírové ubrousky bez vláken.</p>

Pozorování	Pravděpodobné příčiny	Roztoky
<p>Nízké poměry PC/NC či vysoký počet vzorků s nízkými pozitivními hodnotami, s poměry < 2.0 (> 20 %). Analýza možná nespĺňuje validační kritéria.</p>	<p>Neadekvální příprava vzorku</p> <p>Sonda nedostatečně promísena či přidáno nedostatečné množství sondy při stanovení.</p> <p>Nedostatečný objem zředěné sondy přidán do každé hybridizační mikrozkušavky.</p> <p>Ztráta aktivity detekčního činidla 1.</p> <p>Nedostatečná imobilizace.</p> <p>Nedostatečné promytí.</p> <p>Kontaminovaný promývací pufr.</p>	<p>Přidejte vhodný objem denaturační reagentie a důkladně promíchejte protřepáváním. Aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům, zajistěte, aby kapaliny promývala celý vnitřní povrch zkumavky. U vzorků roztoku PreservCyt zajistěte, že správné míchání a opakovaná suspenze buněčných pelet je dokončena před inkubací denaturace. Prostudujte návod k použití sady <i>digene</i> HC2 Sample Conversion, kde naleznete všechny podrobnosti. Byla pozorována význačná barevná změna z průhledné na tmavě fialovou. Inkubujte 45 ± 5 minut při 65 ± 2 °C.</p> <p>Připravte směsné sondy podle popisu. Důkladně promíchejte protřepáním, zajistěte, aby byl vytvořen viditelný vír. Probe Mixes (směsi sond) se musí přidat do zkumavek pipetovačem s pozitivním výtlakem nebo vícekanalovým pipetovačem, aby byla zajištěna přesná dávka.</p> <p>Dbejte na to, aby 8kanalový pipetovač přesně dávkoval do hybridizační mikrodestičky nebo mikrozkušavek před přidáním Probe Mix (směs sondy). Přidejte 25 µl směsi sondy do každé jamky na mikrodestičce nebo mikrozkušavky obsahující denaturovaný kalibrátory, kontroly kvality a klinické vzorky. Dbejte na to, aby 8kanalový pipetovač přesně dávkoval do jamek hybridizační mikrodestičky před přidáním Probe Mix (směs sondy). Změna zabarvení by měla být z tmavě fialové do žluté po přidání směsné sondy a důkladném protřepání. Vzorky roztoků PreservCyt by měly zružovět místo zežloutnutí.</p> <p>Ukladněte detekční činidlo 1 při 2 - 8 °C. Použijte před uplynutím záruční doby vyznačené na vnějším štítku krabičky pro soupravu.</p> <p>Imobilizační krok by měl být proveden při použití rotační třepačky I nastavené na 1 100 ± 100 ot/min. Validujte rychlost třepačky kalibrací.</p> <p>Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát promývacím pufrům, pokaždé přepněte plnicí jamky nebo použijte automatickou promývačku destiček.</p> <p>Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.</p>
<p>Série pozitivních vzorků s přibližně stejnými hodnotami RLU.</p>	<p>Kontaminace imobilizačních jamek na mikrodestičce během manipulace při stanovení.</p> <p>Kontaminace detekčního činidla 2.</p> <p>Vadná funkce promývačky Automated Plate Washer.</p>	<p>Zakryjte imobilizační mikrodestičku během všech inkubací. Zabraňte expozici zkumavek aerosolové kontaminaci během provádění analýzy. Během manipulace použijte rukavice bez prášku.</p> <p>Buďte opatrní, abyste nekontaminovali zásobní roztok, když pipetujete detekční činidlo 2 do imobilizačních jamek na mikrodestičce. Zabraňte kontaminaci detekčního činidla 2 aerosoly z detekčního činidla 1 nebo z laboratorního prachu atd.</p> <p>Viz Kontrola kontaminace v tomto oddílu Odstraňování potíží nebo viz <i>Automated Plate Washer Uživatelská příručka</i>, kde naleznete další pokyny ohledně kontaminace nebo vadných funkcí.</p>
<p>Široké rozmezí % CV mezi replikáty.</p>	<p>Nepřesné pipetování.</p> <p>Nedostatečné třepání.</p> <p>Neúplný přenos kapaliny z hybridizačních mikrozkušavek do imobilizačních jamek na mikrodestičce.</p> <p>Nevhodné podmínky promývání.</p> <p>Kontaminace jamek mikrodestičky detekční reagentií 1.</p>	<p>Zkontrolujte pipetovač, aby bylo zajištěno, že se dávkují reprodukovatelné objemy. Provádějte kalibraci pipetovacího zařízení jako standardní postup.</p> <p>Ve všech krocích důkladně míchejte. Míchejte do víru před denaturační inkubací a po přidávku směsné sondy. Zajistěte, aby byl vytvořen viditelný vír.</p> <p>Zajistěte, že během přenosu z jamek hybridizační mikrodestičky nebo mikrozkušavek do jamek imobilizační mikrodestičky, budou převedeny reprodukovatelné objemy.</p> <p>Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát promývacím pufrům, pokaždé přepněte plnicí jamky nebo použijte automatickou promývačku destiček a příslušné protokoly automatické promývačky destiček.</p> <p>Zajistěte, aby všechny pracovní povrchy zůstaly čisté a suché. Při použití detekčního činidla 1 postupujte opatrně. Chraňte aerosoly.</p>

Pozorování	Pravděpodobné příčiny	Roztoky
Falešně pozitivní výsledky získané ze známých negativních vzorků.	<p>Kontaminované detekční činidlo 2.</p> <p>Kontaminace jamek mikrodestičky detekční reagensí 1.</p> <p>Vysušení (blotování) na stejném místě tampónů Kimtowels Wipers (či ekvivalentních papírových ubrouscích bez vláken) pro několik řad.</p> <p>Neadékvátní příprava vzorku</p> <p>Nevhodné podmínky promývání.</p> <p>Kontaminace špičky pipety nedenaturovaným materiálem během přenosu denaturovaného vzorku do zkumavky nebo jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy HPV.</p>	<p>Postupujte opatrně při dávkování alikvotního podílu detekčního činidla 2 mezi vzorky, abyste se vyhnuli zkřížené kontaminaci vzorků. Jestliže používáte pouze část soupravy, nadávkujte potřebný objem pro dané stanovení do čistého zásobníku činidel na jedno použití předtím, než naplníte pipetovací zařízení.</p> <p>Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát promývacím puřem, pokaždé přepřte nebo použijte automatickou promývačku destiček. V jamkách mikrodestičky by po promývání neměla zůstat žádná zbytková růžová kapalina.</p> <p>Nebloťujte na stejném místě, které už bylo předtím použito z důvodu možného výskytu kontaminace.</p> <p>Přidejte vhodný objem denaturační reagensie a důkladně promíchejte protřepáváním. Aby nedošlo k falešně pozitivním výsledkům dbejte na to, aby kapalina promývala celý vnitřní povrch zkumavky buď ruční metodou, nebo metodou využívající MST Vortexer 2 (při použití metody ruční třepačky obraťte zkumavku jednou dnem vzhůru). U vzorků roztoku PreservCyt zajistěte, že správně míchání a opakovaná suspenze buněčných pelet je dokončena před inkubací denaturace. Prostudujte návod k použití sady <i>digene</i> HC2 Sample Conversion, kde naleznete všechny podrobnosti. Má být vidět zřetelná barevná změna na tmavě fialovou. Inkubujte 45 ± 5 minut při 65 ± 2 °C. U vzorků SurePath dbejte na to, aby vzorky byly inkubovány po 90 ± 5 minut při 65 ± 2 °C.</p> <p>Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát promývacím puřem, pokaždé napřte jamky, až budou přetékat, nebo použijte automatickou promývačku destiček a příslušné protokoly automatické promývačky destiček.</p> <p>Denaturační krok v rámci zpracování vzorku se musí provádět podle pokynů v tomto návodu k použití. Nesprávné vortexování vzorku, obrácení zkumavky a míchání mohou mít za následek neúplnou denaturaci nespecifikovaných hybridů RNA:DNA endogenních k cervikálním vzorkům. Zvláště při použití vzorků PreservCyt Solution nebo SurePath Preservative Fluid, tyto hybridy se mohou nacházet na vnitřních stěnách zkumavky s denaturovaným vzorkem. Aby se zabránilo možnému přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, špička pipety se nesmí dotknout stěn zkumavky během přenosu denaturovaného vzorku do mikrozskumavky nebo jamky mikrodestičky použité pro hybridizaci sondy HPV.</p>
Zvýšené hodnoty RLU negativního kalibrátoru (>200 RLU). Zbytek stanovení probíhá očekávaným způsobem.	<p>Detekční reagensie 2 byla inkubována při teplotě větší než 20-25 °C.</p> <p>Inkubace detekčního činidla 2 byla provedena po dobu delší než 30 minut.</p> <p>Detekční činidlo 2 nebo promývací puř byly kontaminovány alkalickou fosfatázou či detekčním činidlem 1.</p>	<p>Znovu proveďte test a zajistěte, že kroky imobilizace a detekce probíhají při teplotě 20–25°C.</p> <p>Odečtete údaj pro destičku po 15 minutách inkubace (a ne později než 30 minutách inkubace) při 20-25 °C.</p> <p>Další informace o testování na kontaminaci naleznete v části Chyby a jejich odstranění.</p>
Analýza nespĺňuje validační kritéria. Zvýšený poměr PC/NC	Obrácené umístění HRC a QC2-HR nebo LRC a QC1-LR	Vzorky znovu otestujte. Pečlivě přečist štítky na ampulkách s kontrolou kalibrátoru a kvality, aby se zamezilo obrácenému umístění těchto reagensí.

TESTOVÁNÍ NA KONTAMINACI

Zvýšená hodnota činidla	Postup testování na kontaminaci	Interpretace výsledků
Poznámka: Aby se zamezilo kontaminaci, postupujte opatrně při pipetování detekčního činidla 2. Použít rukavice a zamezit dotyku špičky pipety s pracovní plochou.		
Detekční reagensie 2	<ul style="list-style-type: none"> Napipetujte 75 µl alikvotní, zbývající část nebo z originální ampulky detekční reagensie 2 do prázdné jamky v imobilizační mikrodestičce. Inkubujte při 20-25°C po 15 minut. Chraňte před přímým slunečním světlem. Odečíst výsledky jamky mikrodestičky pomocí 	<ul style="list-style-type: none"> Kontrola detekčního činidla 2 musí být < 50 RLU. Jestliže jsou hodnoty detekčního činidla 2 < 50 RLU, lze detekční činidlo 2 použít k opakování testu. Pokud je kontaminováno (>50 RLU),

	<p>luminometru.</p> <p>Poznámka: Optimální hodnocení účinnosti je dosaženo testováním detekční reagentie 2 na 3 replikacích.</p>	<p>použít novou soupravu a zopakovat test.</p>
<p>Přístroj pro promývací pufr a/nebo zdroj vody</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Napipetovat 75 µl detekčního činidla 2 do 4 zvláštních jamek v imobilizační mikrodestičce. • Označte jamky 1-4. • Jamka 1 slouží jako kontrola detekčního činidla 2. • Napipetovat 10 µl promývacího pufru z promývací láhve do jamky 2. • Počkat, až se promývací pufr dostane do promývacích hadic. • Napipetovat 10 µl promývacího pufru z hadic do jamky 3. • Díl použité vody použít k přípravě promývacího pufru. Napipetovat 10 µl této vody do jamky 4. • Inkubujte při 20-25 °C po 15 minut. Chraňte před přímým slunečním světlem. • Odečíst výsledky jamek mikrodestičky pomocí luminometru. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrola detekčního činidla 2 (jamka 1) musí být < 50 RLU. • Porovnat hodnoty RLU z jamek 2, 3 a 4 s hodnotou RLU kontroly detekčního činidla 2 (jamka 1). Jednotlivé hodnoty RLU jamek 2, 3 a 4 nesmí překročit 50 RLU hodnoty RLU kontroly detekčního činidla 2 (jamka 1). • Hodnoty překračující 50 RLU kontroly detekčního činidla 2 znamenají kontaminaci. Pokyny k vyčištění a údržbě promývacího přístroje naleznete v části Příprava činidel a jejich uskladnění.
<p>Automatická promývačka destiček</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Napipetovat 75 µl detekčního činidla 2 do 5 zvláštních jamek v imobilizační mikrodestičce. • Označte jamky 1-5. • Jamka 1 slouží jako kontrola detekčního činidla 2. • Pipetujte 10 µl promývacího pufru z lahve promývačky destiček označené <i>Wash</i> do jamky 2. • Pipetujte 10 µl oplachovací kapaliny z lahve promývačky destiček označené <i>Rinse</i> do jamky 3. • Stisknout tlačítko „Prime“ na klávesnici promývačky destiček, tím promývací pufr proteče řádky. • Napipetovat 10 µl proteklého promývacího pufru do jamky 4. • Stisknout tlačítko „Rinse“ na klávesnici promývačky destiček, tím se vyplachovací roztok dostane do řádků. • Napipetovat 10 µl proteklého promývacího pufru do jamky 5. • Zakryjte a inkubujte 15 minut při 20–25 °C. Chraňte před přímým slunečním světlem. • Odečíst výsledky jamek mikrodestičky pomocí luminometru. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrola detekčního činidla 2 (jamka 1) musí být < 50 RLU. • Porovnat hodnoty RLU z jamek 2, 3, 4 a 5 s hodnotou RLU kontroly detekčního činidla 2 (jamka 1). Jednotlivé hodnoty RLU jamek 2, 3, 4 a 5 nesmí překročit 50 RLU hodnoty RLU kontroly detekčního činidla 2 (jamka 1). • Hodnoty překračující 50 RLU kontroly detekčního činidla 2 znamenají kontaminaci promývačky destiček. • Viz <i>Automated Plate Washer Uživatelská příručka</i>, Postup dekontaminace.

KONTAKTNÍ INFORMACE QIAGEN

Kontaktní údaje na svého místního zástupce firmy QIAGEN pro tento výrobek najdete na přiloženém listu s kontaktními informacemi.

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

Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za záznamem ochrany.

Tento výrobek a způsob použití je pokryt jedním nebo více následujícími patenty:

Číslo patentů USA pro HPV

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

Číslo patentu USA pro hybridní imobilizaci

6,228,578B1

Souhrn testu digene HC2 HPV DNA

DŮLEŽITÉ: Je důležité, abyste se před použitím tohoto souhrnu důkladně seznámili s podrobnostmi celého postupu.

	Postup	
	Metoda manuálního třepání do víru (Vortex)	Metoda s třepačkou Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
DENATURACE (V případě vzorků v roztoku PreservCyt viz návod k použití sady digene HC2 Sample Conversion)	<p>Označte hybridizační mikrozkušavky. Připravte denaturační činidlo.</p> <p>↓</p> <p>Napipetujte denaturační činidlo (objem je ekvivalentní polovině objemu vzorku) do kalibrátorů, kontrol kvality a vzorků. Protřepejte každý vzorek, kalibrátor a kontrolu kvality jednotlivě po dobu 5 sekund při vysokých otáčkách (podrobnosti viz tento návod k použití). Zkontrolujte, že všechny zkumavky vykazují fialové zbarvení.</p> <p>↓</p> <p>Inkubujte při 65 ± 2 °C 45 ± 5 minut.</p> <p>↓</p> <p>Připravte směs sondy HPV .</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Označte hybridizační destičku. Připravte denaturační činidlo.</p> <p>↓</p> <p>Napipetujte denaturační činidlo (objem je ekvivalentní polovině objemu vzorku) do kalibrátorů, kontrol kvality a vzorků. Zkontrolujte, že všechny zkumavky vykazují fialové zbarvení.</p> <p>↓</p> <p>Zakryjte stojan fólií a víkem.</p> <p>↓</p> <p>Použijte Vortex po 10 vteřin.</p> <p>↓</p> <p>Inkubujte při 65 ± 2 °C 45 ± 5 minut.</p> <p>↓</p> <p>Připravte směs sondy HPV .</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
HYBRIDIZACE Metoda kombinované směsné sondy Metoda duální sondy	<p>Metoda vodní lázně</p> <p>Dobře promíchejte denaturované vzorky a napipetujte 75 µl do zkumavek.</p> <p>↓</p> <p>Provedte inkubaci po 10 minut při 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Napipetujte 25 µl kombinované směsné sondy do hybridizačních mikrozkušavek.</p> <p>NEBO</p> <p>Dobře promíchejte denaturované vzorky a napipetujte 75 µl do zkumavek „LR“.</p> <p>Dobře promíchejte denaturované vzorky a napipetujte 75 µl do zkumavek „HR“.</p> <p>↓</p> <p>Provedte inkubaci po 10 minut při 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Napipetujte 25 µl směsi sondy HPV pro nízké riziko do zkumavek „LR“. Napipetujte 25 µl směsi sondy HPV pro vysoké riziko do zkumavek „HR“.</p> <p>↓</p> <p>Pokryjte mikrozkušavky fólií pro destičku a třepejte na rotační třepačce I při 1100 ±100 ot/min po 3 ±2 minut.</p> <p>Zkontrolujte, zda mají všechny destičky žlutou barvu.</p> <p>↓</p> <p>Inkubujte při 65 ± 2 °C 60 ± 5 minut. Připravte imobilizační mikrodestičku.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Metoda mikrodestičkového inkubátoru I</p> <p>Dobře promíchejte denaturované vzorky a pipetujte 75 µl do jamek mikrodestičky.</p> <p>↓</p> <p>Provedte inkubaci po 10 minut při 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Napipetujte 25 µl kombinované směsné sondy do hybridizačních jamek mikrodestičky.</p> <p>NEBO</p> <p>Dobře promíchejte denaturované vzorky a napipetujte 75 µl do jamek mikrodestičky „LR“ a 75 µl do jamek mikrodestičky „HR“.</p> <p>↓</p> <p>Provedte inkubaci po 10 minut při 20 - 25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Napipetujte 25 µl směsi sondy HPV pro nízké riziko do jamek mikrodestičky „LR“. Napipetujte 25 µl směsi sondy HPV pro vysoké riziko do jamek mikrodestičky „HR“.</p> <p>↓</p> <p>Zakryjte mikrodestičku víkem a třepejte na rotační třepačce I při 1100 ±100 ot/min po 3 ±2 minut.</p> <p>Zkontrolujte, zda mají všechny destičky žlutou barvu.</p> <p>↓</p> <p>Inkubujte při 65 ± 2 °C 60 ± 5 minut. Připravte imobilizační mikrodestičku.</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
IMOBILIZACE HYBRIDU	<p>Převedte obsah každé jamky hybridizační destičky nebo mikrozkušavky do odpovídající jamky v imobilizační mikrodestičce za použití 8-kanálové pipety. Zakryjte víkem destičky nebo fólií.</p> <p>Třepejte při 1100 ±100 ot/min a 20 - 25 °C po 60 ±5 minut. Připravte promývací pufr.</p> <p>↓</p> <p>Dekantujte a osušte imobilizační mikrodestičku (podrobnosti viz návod k použití).</p> <p>↓</p>	
DETEKCE HYBRIDU	<p>Pipetujte 75 µl detekční reagentie 1 do každé jamky imobilizační mikrodestičky. Zakryjte imobilizační mikrodestičku víčkem destičky, fólií Parafilm či ekvivalentní fólií.</p> <p>Provedte inkubaci při 20 - 25 °C po 30 - 45 minut. Promyjte destičku za použití požadované metody.</p> <p>↓</p>	
PROMÝVÁNÍ	<p>Metoda ručního promývání</p> <p>Dekantujte a osušte imobilizační mikrodestičku (podrobnosti viz návod k použití).</p> <p>↓</p> <p>Šestkrát promyjte.</p> <p>↓</p> <p>Nechte oschnout na papírových ručnicích, které neuvolňují vlákna.</p> <p>↓</p>	<p>Metoda promývačky Automated Plate Washer</p> <p>Umístěte destičku na promývačku a zmáčkněte "START/STOP".</p> <p>↓</p> <p>Pokračujte k dalšímu kroku.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
AMPLIFIKACE SIGNÁLU ODEČTENÍ	<p>Pipetujte 75 µl detekční reagentie 2 do každé jamky imobilizační mikrodestičky. Provedte inkubaci při 20-25 °C po 15-30 minut.</p> <p>↓</p> <p>Odečtěte imobilizační mikrodestičku v přístroji DML.</p>	

VYSLEDKŮ



Potvrďte platnost stanovení a proveďte interpretaci výsledků pro vzorky.