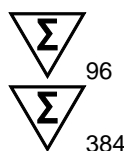


Vznešený 2015

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 13 typů DNA lidského papillomaviru (HPV) s vysokým rizikem v cervikálních a vaginálních vzorcích.

Pro použití s:

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



REF

5197-1330 (sada 1 desky)

618111 (sada 4 desky)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
NĚMECKO

1058538CS Rev. 02

Klíčové změny vůči předchozí revizi návodu k použití

- Přidán postup přípravy vzorku z klinických vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony® DSP HPV Media doplněný o příslušná data hodnocení účinnosti.
- Aktualizováno v souladu s globálním harmonizovaným systémem klasifikace a označování chemických látek a směsí (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS).

Contents

Zamýšlené použití.....	8
Souhrn a vysvětlení	9
Informace o patogenu	10
Princip metody	10
Příprava vzorků pomocí QIASymphony SP.....	12
Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	12
Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA	12
Testování systémem Rapid Capture.....	13
Dodávané materiály	15
1desková sada.....	15
4desková sada.....	15
Obsah sady	16
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	18
Diagnostické zařízení a materiály in vitro	18
Běžné vybavení a materiály pro použití v laboratoři.....	19
Další vybavení a materiály pro přípravu vzorku PreservCyt	20
Další vybavení a materiály pro přípravu vzorku SurePath	20
Varování a bezpečnostní opatření	21
Varování.....	21
Vzorky.....	21
Azid sodný.....	22
Pufr N2.....	22
Automatické testování RCS.....	23
Prohlášení ohledně bezpečnosti a rizik komponent.....	23
Bezpečnostní opatření	24
Uchovávání a nakládání s reagensy.....	26
Komponenty sady.....	26

Přípravené reagensie.....	26
Odběr a příprava vzorků.....	26
Cervikální a vaginální vzorky v STM.....	27
Cervikální biopsie.....	27
Cervikální vzorky v roztoku PreservCyt.....	28
Cervikální vzorky v konzervační kapalině SurePath Preservative Fluid.....	29
Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath.....	30
Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet.....	30
Ruční příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet....	30
Postup.....	32
Příprava reagensie.....	32
Denaturační reagensie.....	34
Denaturation Reagent 2 (denaturační reagensie 2).....	35
Směs sond.....	36
Promývací pufr.....	37
Vytvořte rozvržení desky.....	38
Příprava vzorku.....	40
Příprava vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media.....	40
Příprava vzorku ze vzorků SurePath a SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media.....	41
Příprava vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA.....	41
Ruční příprava vzorků PreservCyt.....	42
Ruční příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet....	42
Denaturace a hybridizace vzorků připravených pomocí QIASymphony SP.....	44
Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a eluátů DNA pro ruční testování.....	44
Volitelný body zastavení eluátů DNA.....	45
Hybridizace eluátů DNA.....	46
Denaturace a hybridizace vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet.....	46

Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a vzorky STM	47
Volitelný bod pro zastavení připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet	49
Hybridizace připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet	49
Hybridizace pomocí mikroadestičky a ohříváče Microplate Heater I	50
Hybridizace pomocí mikrozkmavek a vodní lázně	51
Záchyt hybridu	53
Detekce hybridu	55
Promývání	56
Metoda promývačky Automated Plate Washer	56
Metoda ručního promývání	57
Amplifikace signálu	58
Měření záchytové mikroadestičky a generování výsledků	59
Interpretation of Results	Error! Bookmark not defined.
Výsledky testování vzorků STM	60
Výsledky testování vzorků SurePath	60
Výsledky testování vzorků PreservCyt	60
Hodnota RLU/CO blízká 1,0	61
Jiné typy HPV	61
Ověření kalibrace analýzy	61
Negativní kalibrátor	61
Pozitivní kalibrátor	62
Průměr pozitivního kalibrátoru/průměr negativního kalibrátoru	62
Výpočet hraniční hodnoty	62
Kontroly kvality	62
Omezení	64
Charakteristiky chování	65
Klinické chování při screeningu pacientek s normálními výsledky stěru z děložního čípku jakožto pomůcka při hodnocení rizika při léčbě pacientek	65
Klinické chování při screeningu pacientek s výsledky stěru z děložního čípku ASC-US pro stanovení potřeby doporučení ke kolposkopii	69

Klinická citlivost a specificita při stanovení rizika onemocnění vysokého stupně u žen se stěry z děložního čípku LSIL nebo HSIL	72
Chování testu při vaginálním nebo samostatnému odběru pacientkou	75
Analytická citlivost	76
Ekvivalence mezi typy vzorků	77
Ekvivalence mezi vzorky STM a PreservCyt.....	77
Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku v případě vzorků PreservCyt a přípravou vzorků v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	77
Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku v případě vzorků PreservCyt a přípravou vzorků v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA	78
Ekvivalence mezi STM a ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet	78
Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet a přípravou vzorků ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	79
Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet a přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	80
Shoda testovacích metod	81
Reprodukovatelnost.....	83
Celková reprodukovatelnost ručního testování	83
Reprodukovatelnost u klinických testů STM	84
Reprodukovatelnost klinických vzorků PreservCyt	87
Reprodukovatelnost klinických vzorků SurePath.....	97
Zkřížená reaktivita	102
Zkřížená hybridizace.....	104
Účinek krve a jiných látek na vzorky STM	105
Účinek krve a jiných látek na vzorky PreservCyt	105
Ruční příprava vzorků.....	105
Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	105
Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA	106
Účinek krve a jiných látek na vzorky SurePath.....	107

Příprava vzorku ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	107
Příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media	108
Přenos	108
Stabilita reagensů ponechaných v přístroji	110
Literatura	113
Symboly	118
Řešení problémů	119
Kontrola kontaminace DR2	127
Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody	127
Kontrola kontaminace Automated Plated Washer (automatická promývačka desky) ..	128
Kontaktní informace	129

Zamýšlené použití

Pro použití v diagnostice in vitro (IVD).

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA využívající technologii Hybrid Capture[®] 2 (HC2) je hybridizační analýza nukleové kyseliny s amplifikací signálu používající chemiluminiscence mikrodestičky ke kvalitativní detekci 13 vysoce rizikových typů DNA lidského papillomaviru HPV v cervikálních a vaginálních vzorcích.

Cervikální a vaginální vzorky, které lze zkusit testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, obsahují následující:

- Cervikální vzorky odebírané lékařem pomocí odběrové sady *digene* HC2 DNA
- Vaginální vzorky odebírané pacientkou pomocí odběrové sady *digene* HC2 DNA
- Bioptické vzorky uložené v transportním médiu *digene* Specimen Transport Medium (STM) (Médium pro přepravu vzorků)
- Vzorky se odeberou kartáčkovým zařízením pro odběr vzorků nebo zařízením pro odběr vzorků kombinujícím kartáček a špachtli a pak se umístí do roztoku PreservCyt Solution nebo kapaliny SurePath Preservative Fluid

Použití tohoto testu je indikováno:

- 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 High-Risk

HPV DNA pomůže lékařům s léčbou pacientky tím, že usnadní hodnocení rizika u žen, při rozhodování o absenci onemocnění vysokého stupně.

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 karcinom (1–3). 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 čípku (4–8).

V současnosti nelze HPV kultivovat in vitro a ke stanovení cervikální infekce HPV jsou imunologické testy inadekvátní. 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 spojované s karcinomem (8–10). U typů HPV 31, 33 a 35 byla prokázána bezprostřední spojitost s nádorovým onemocněním (2, 11–14). Tato bezprostřední spojitost je způsobena tím, že se uvedené typy častěji detekují ve skvamózních intraepiteliálních lézích vysokého stupně než u nádorů. Proto je indukce nádorů způsobená přítomností těchto typů méně pravděpodobná než za přítomnosti vysoce rizikových typů DNA HPV (15). Těchto 5 typů HPV společně představuje přibližně 73 % infekcí HPV (16, 17). Další typy HPV, včetně 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68, byly identifikovány jako hlavní typy HPV, jež bylo možné detekovat ve zbývajících lézích (17–27). Tyto typy HPV lze rovněž na základě jejich relativní distribuce v různých histopatologických diagnostických kategoriích charakterizovat jako středně až vysoce rizikové skupiny (16, 17, 24–28).

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, 16, 29). 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 (30, 31). Zvláště bylo větší riziko progresu u typů HPV 16 a 18 (přibližně 40 %) než u jiných typů HPV (30).

Informace o patogenu

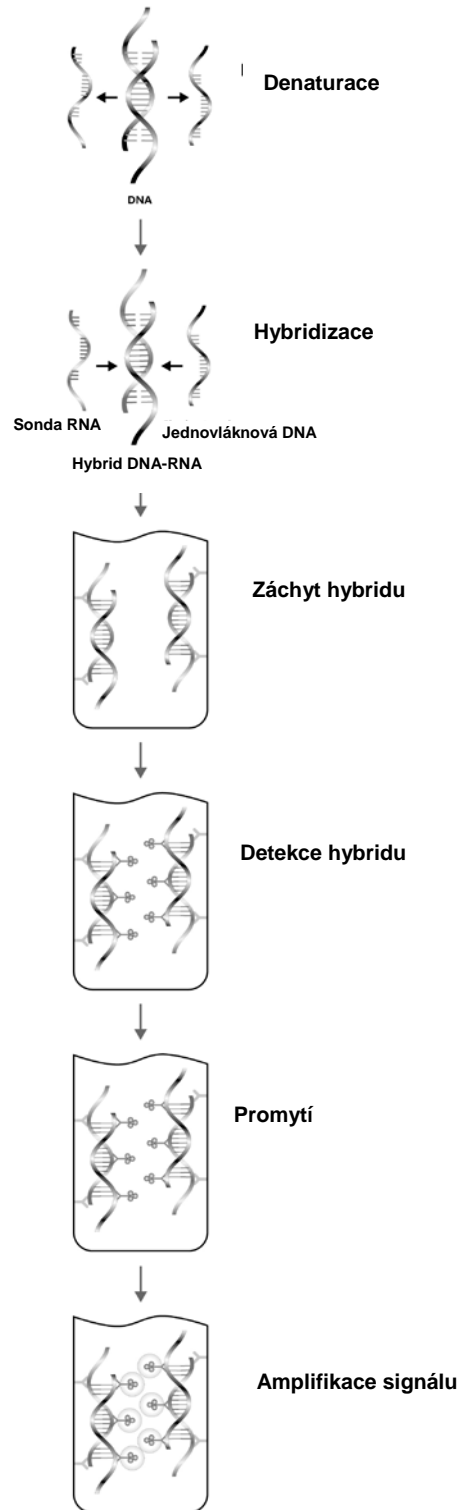
Lidské papilomaviry je skládají z ikosahedrání virové částice (virion) obsahujících molekulu dvouvláknové, cirkulární DNA, s 8.000 základními páry, obklopené proteinovou kapsidou. Po infekci epitelálních buněk se virová DNA vytvoří v celé tloušťce epitelu, ale intaktní viriony se nachází pouze v horních vrstvách tkáně. Proto lze virovou DNA nalézt buď ve virionech nebo jako epizomální či integrované HPV sekvence v závislosti na typu a stupni léze.

Princip metody

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, využívající technologii HC2, je analýza hybridizace nukleové kyseliny pomocí amplifikace signálu, která využívá detekci chemiluminiscence mikrodestičky. Vzorky obsahující cílovou DNA hybridizují se specifickou sondou RNA HPV. Výsledné hybridy RNA–DNA se imobilizují na povrchu jamky mikrodestičky pokryté protilátkami specifickými pro hybridy RNA–DNA. Imobilizované hybridy poté reagují s protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou, specifickými pro hybridy RNA–DNA, a detekovanými chemiluminiscenčním substrátem. Na každou protilátku se konjugují některé molekuly alkalické fosfatázy. Více konjugovaných protilátek navázaných na každý zachycený hybrid způsobuje značnou amplifikaci signálu. Při štěpení substrátu vázanou alkalickou fosfatázou se emituje světlo, které měří přístroj *digene* Microplate Luminometer (DML) jako relativní světelné jednotky (RLU). Intenzita emitovaného světla odpovídá přítomnosti nebo absenci cílové DNA ve vzorku.

Naměřená hodnota RLU rovna nebo větší než hraniční hodnota analýzy (CO) indikuje přítomnost vysoce rizikových sekvencí DNA HPV ve vzorku. Naměřená hodnota RLU menší než CO analýzy indikuje absenci testovaných specifických, vysoce rizikových sekvencí DNA HPV nebo hladiny HPV DNA pod mezí detekce testu.

Pracovní proces Hybrid Capture



Příprava vzorků pomocí QIASymphony SP

Automatickou přípravu vzorku u vzorků PreservCyt lze provádět pomocí QIASymphony SP se sadou QIASymphony DSP HPV Media a sadou QIASymphony DSP AXpH DNA.

Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Sada QIASymphony DSP HPV Media poskytuje extrakty vzorků na mikrodesce hybridizace, která je připravena pro automatické testování pomocí systému Rapid Capture® (RCS) testem digene HC2 High-Risk HPV DNA. QIASymphony SP provádí všechny kroky postupu při přípravě vzorku až pro 88 vzorků v šaržích po 24 v jediném běhu.

QIASymphony SP zpracovává 88 vzorků PreservCyt ve 2 hodinách a 15 minutách bez zásahu uživatele požadovaného v případě, kdy je přístroj zaplněn vzorky.

QIASymphony SP zpracovává 88 vzorků SurePath ve 1 hodinách a 45 minutách bez zásahu uživatele požadovaného v případě, kdy je přístroj zaplněn vzorky. Po přípravě vzorku pomocí QIASymphony SP bezprostředně následuje 90 minut inkubace extraktů vzorku v hybridizační mikrodestičce na topení mikrodestičky. Během inkubace extraktu vzorku se kalibrátory a kontroly kvality denaturují odděleně ve vodní lázni a po dokončení inkubace se ručně pipetují do první kolonky hybridizační mikrodestičky. Příprava vzorku z klinických vzorků SurePath s využitím přístroje QIASymphony SP a sady QIASymphony DSP HPV Media může proběhnout před zpracováním cytologických vzorků, nebo až po dokončení tohoto procesu.

Důležité upozornění: Extrakty vzorků vyprodukované díky přípravě vzorku u vzorků PreservCyt a SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media mohou být testovány pouze s využitím RCS. Ruční provádění testu s extrakty vzorků není validováno.

Při provádění automatizované přípravy vzorku pomocí QIASymphony odkazujeme na příslušné příručky uživatele QIASymphony a Návod k použití (příručka) k sadě QIASymphony DSP HPV Media (QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)) navíc k těmto pokynům pro použití pro nezbytné procedurální a popisné informace.

Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA

Sada QIASymphony DSP AXpH DNA přináší eluáty DNA na hybridizační mikrodestičku, která je již připravena pro ruční nebo RCS-automatické testování testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. QIASymphony SP provádí všechny kroky postupu při přípravě vzorku až pro 88 vzorků v šaržích po 24 v jediném běhu. QIASymphony SP zpracovává 88 vzorků ve 4 hodinách a 30 minutách bez zásahu uživatele požadovaného v případě, kdy je přístroj zaplněn vzorky.

Při provádění automatizované přípravy vzorku pomocí QIASymphony odkazujeme na příslušné příručky uživatele QIASymphony a Příručky k soupravě QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) navíc k těmto pokynům pro použití pro nezbytné procedurální a popisné informace.

Testování systémem Rapid Capture

Testování s vysokoobjemovou propustností vzorků testem digene HC2 High-Risk HPV DNA lze provádět pomocí RCS. 4desková sada (katalogové číslo 618111) může být použita pouze s RCS a nemůže být použit pro ruční testování.

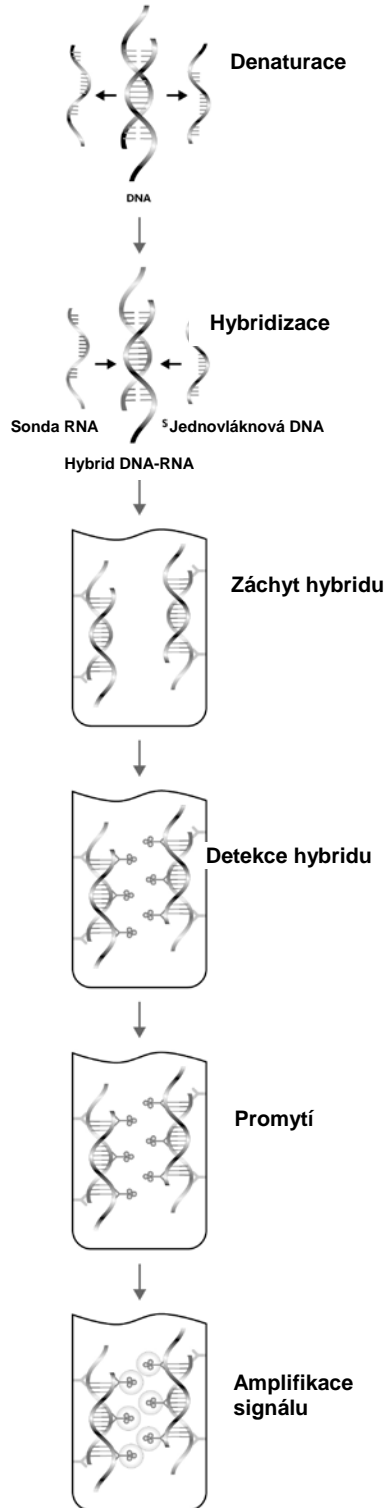
RCS je automatický systém pro pipetování a ředění k všeobecnému použití, který lze použít s testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro testování s vysokoobjemovou propustností vzorků. Tento systém zpracovává až 352 vzorků za 8 hodin včetně 3,5hodinové lhůty během níž není vyžadována intervence uživatele; během 13 hodin lze vyprodukovat až 704 výsledků vzorků.

Příprava vzorku se provádí nezávisle na RCS před umístěním na platformu RCS. Navíc se provádí detekce chemiluminiscenčního signálu a vykazování výsledků pomocí offline DML přístroje společného jako pro ruční, tak RCS automatické testování.

Každý z kroků testu digene HC2 High-Risk HPV DNA se provádí v přesné sekvenci jako při ručním testování. RCS umožňuje rozčleněné zpracování až na 4 mikrodestičky, kdy každá mikrodestička obsahuje vzorky a požadované kalibrátory a kontroly kvality testu.

Při provádění automatického RCS testování viz Příručka uživatele systému Rapid Capture (Rapid Capture System User Manual) a Příručka uživatele systému Rapid Capture — Provádění testů digene HC2 DNA pomocí zpracovaných vzorků QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual and Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) navíc k těmto návodům k použití pro nezbytné procedurální a popisné informace.

Pracovní proces Hybrid Capture



Ruční příprava vzorků

Automatizováno na systému Rapid Capture

Dodávané materiály

1desková sada

1desková sada testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (katalogové číslo 5197-1330) obsahuje 96 testů.

Při provádění ručního testování pomocí sady 1 desky je nejmenší počet doporučených testů pro každé použití 24. Jestliže se požaduje méně než 24 testů na jedno použití, celkový počet testů na sadu je možné snížit díky omezeným objemům reagensů. Počet výsledků pacientů se bude měnit v závislosti na počtu použití na sadu, jak je dále uvedeno:

Počet použití	Počet výsledků pacientů
1	88
2	80
3	72
4	64

Při provádění automatického RCS testování se sadou 1 desky použití plné sady požaduje testování celé mikrodestičky (88 vzorků) na jeden chod RCS. Testování dílčí mikrodestičky je přijatelné, ovšem celá sada se používá díky prázdnému objemu požadovanému pro provoz přístroje.

4desková sada

4desková sada testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (katalogové číslo 618111) obsahuje 384 testů.

4deskovou sadu lze použít pouze pro automatické testování se systémem RCS. Chcete-li u 4deskové sady provést 384 testů, je nutné ji použít v 1 nebo 2 bězích RCS. Jestliže požadujete více než 2 běhy, celkový počet testů na sadu může být nižší v důsledku omezeného objemu reagensů.

Obsah sady

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Catalog number	5197-1330	618111
Katalogové č.	96	384
Indicator Dye (Barva indikátoru) Obsahuje 0,05 % (objemových) azidu sodného	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (denaturační reagentie) Naředěný roztok hydroxidu sodného (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* (rozpuštědlo sondy) Pufrovaný roztok 0,05 % (objemových) azidu sodného	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (sonda pro vysoce rizikový HPV) Sonda HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68 RNA v pufrovaném roztoku (červený uzávěr)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (kontrola kvality pro nízko rizikový HPV) 5 pg/ml (500.000 kopií/ml) klonované HPV 6 DNA a nosičové DNA v STM s 0,05 % (objemových) azidu sodného.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (kontrola kvality pro vysoce rizikový HPV) 5 pg/ml (500.000 kopií/ml) klonované HPV 16 DNA a nosičové DNA v STM s 0,05 % (objemových) azidu sodného.	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negativní kalibrátor) Nosičové DNA v STM s 0,05 % (objemových) azidu sodného	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (kalibrátor pro vysoce rizikový HPV) 1 pg/ml klonované HPV 16 DNA a nosičové DNA v STM s 0,05 % (objemových) azidu sodného	1 ml	2 ml
Capture Microplate (záchytová mikrodoska) Pokrytá kozími polyklonálními hybridními protilátkami anti-RNA-DNA	1	4
Detection Reagent 1 (Detekční reagentie) Alkalická fosfatáza–konjugované protilátky proti hybridům RNA–DNA v pufrovaném roztoku s 0,05 % (objemových) azidu sodného	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Detekční reagentie) CDP-Star® s Emerald II (chemiluminiscenční substrát)	12 ml	40 ml

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Catalog number	5197-1330	618111
Katalogové č.	96	384
Wash Buffer Concentrate* (koncentrát promývacího pufru)	100 ml	2 x 100 ml
Obsahuje 1,5% (objemových) azidu sodného		

*Viz „Varování a bezpečnostní opatření,“ strana 21, kde jsou informace o bezpečnosti.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Důležité upozornění: Ujistěte se, že přístroje používané při této proceduře prošly kontrolou a kalibrací podle doporučení výrobce.

Diagnostické zařízení a materiály in vitro

Společnost QIAGEN nabízí pouze zařízení a materiály validované testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

- 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 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)*
- Konverzní stojan a víko (volitelné)†
- Konverzní stojan a víko *digene* (volitelné)†
- Pipeta a stojan EXPAND-4 (volitelné)†
- Dávkovač zařízení pro utěsnění zkumavek a řezací zařízení (volitelné, používá se s třepačkou MST Vortexer 2)
- System Rapid Capture (požadovaný pro použití s 4deskovou sadou, volitelný pro 1deskovou sadu).
- Mycí přístroj
- Hybridizační mikroděsky
- Víka mikroděsky
- Proužky s jamkami mikrodestičky RCS*

* Jsou nutné k provedení automatického testování RCS.

† Vlastní položka použitá k přenosu vzorků STM na hybridizační mikrodestičku. Lze použít jiné vlastní, rozšířitelné, multikanálové pipety, pokud při vysunutí lze dosáhnout rozteče hrotů 3,2 cm.

- Žlábký reagent RCS*
- Víka žlábků reagentů RCS*
- Jednorázové hroty RCS*
- Nárazové krytky RCS*
- Pufr N2[†]
- Pufr D2[†]
- Modrá promývací lodička RCS[‡]
- Velmi dlouhé hroty pipet
- Zkumavky na odběr vzorků
- Stojan zkumavek na odběr vzorků
- Šroubovací krytky zkumavek na odběr vzorků
- Nádoby na jednorázové reagenty
- Těsnicí fólie zkumavek DuraSeal™
- Hybridizační mikrozukumavky[§]
- Stojan na mikrozukumavky[§]
- Těsnění desek[§]

Běžné vybavení a materiály pro použití v laboratoři

- Vodní lázeň 65 ± 2 °C o dostatečné velikosti, která pojme stojan na zkumavky (21 cm široký x 32 cm hluboký x 18 cm vysoký)
- Mikrocentrifuga
- Třepačka s upevněním misky
- Jednokanálová pipeta: proměnlivé nastavení pro objemy 20–200 µl a 200–1.000 µl
- Opakovací pipeta s pozitivním výtlačkem, například Eppendorf® Repeater®
- 8kanálová pipeta: proměnlivá nastavení pro objemy 25–200 µl
- Časový spínač
- Roztok chlornanu sodného, 0,5 % objemových
- Parafilm® nebo ekvivalent
- Pipetové hroty s aerosolovou bariérou pro jednorázové použití pro jednokanálovou pipetu (20–200 µl a 200–1.000 µl)

* Jsou nutné k provedení automatického testování RCS.


† Požaduje se k testování vzorků připravených pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA.


‡ Požaduje se k automatickému testování vzorků RCS připravených pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media.

§ Požadováno k provádění hybridizace pomocí mikrozukumavek a vodní lázně.

- Hroty k jednorázovému použití pro opakovací pipetu s pozitivním výtlakem (12,5, 5, 2,5, a 1,25 ml)
- Jednorázové hroty pro 8kánalovou pipetu (25–200 µl)
- Tampóny Kimtowels® nebo odpovídající papírové ručníky, které neuvolňují vlákno
- Kryt laboratorního stolu k jednorázovému použití
- Rukavice na jednorázové použití bez prášku
- 5 ml a/nebo 15 ml polypropylénové zkumavky s nasazovacím uzávěrem a kulatým dnem
- Stojan na zkumavky, který pojme 10ml nebo 15ml zkumavky
- 50 ml polypropylénové kónické zkumavky


Další vybavení a materiály pro přípravu vzorku PreservCyt

 Viz též Návod k použití (příručka) sady QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) pro automatickou přípravu vzorku pomocí sady médií QIASymphony DSP HPV

 Viz též Příručka sady QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) pro automatickou přípravu vzorku pomocí sady médií QIASymphony DSP AXpH DNA..

 Viz návod k použití sady *digene* HC2 Sample Conversion pro ruční přípravu vzorků

Další vybavení a materiály pro přípravu vzorku SurePath

 Viz též Návod k použití (příručka) sady médií QIASymphony DSP HPV (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) pro automatickou přípravu vzorku pomocí sady médií QIASymphony DSP HPV.

Ruční přípravy vzorků SurePath vyžaduje následující vybavení a materiály:

- Výkyvná korečková odstředivka, která může dosáhnout $800 \pm 15 \times g$ a pojme 15ml kónické polypropylénové odstředivací zkumavky
- Zkumavky *digene* HC2 Sample Conversion* nebo 15ml polypropylénové zkumavky VWR® nebo Corning®
Důležité upozornění: Zkumavky pro konverzi vzorků *digene* HC2, které společnost QIAGEN nabízí, se musí používat s třepačkou MST Vortexer 2 nebo systémem RCS.
- 7ml přenosové pipety se standardním hrotem nebo ekvivalent
- *digene* Specimen Transport Medium

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro.

Před použitím testu si pečlivě přečtěte všechny pokyny.

Varování

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN a pro každou komponentu těchto sad.

Vzorky

UPOZORNĚNÍ



Nebezpečí spojené s infekčními látkami

Vzorky mohou obsahovat infekční látky a je zapotřebí s nimi podle toho nakládat. Všechny vzorky považujte za potenciálně infekční.

Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplnou jistotu, že vzorky nebudou přenášet infekci. Doporučujeme, aby se s humánními vzorky zacházelo v souladu s vhodnými národními a místními postupy pro biologickou bezpečnost. 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:

- Nepipetujte ústy.
- V místech, kde se pracuje s reagensy nebo vzorky nekuřte, nejezte ani nepijte.
- Při nakládání s reagensy nebo vzorky používejte jednorázové rukavice neobsahující prášek. Po provedení testu si důkladně omyjte ruce.
- Vyčistěte a dezinfikujte veškeré úniky vzorků pomocí tuberkulocidního dezinfekčního činidla, jako je na příklad 0,5 % (objemových) chlornan sodný nebo jiné vhodné dezinfekční činidlo (32).

- Dekontaminujte nebo zlikvidujte všechny vzorky, reagentie nebo jiné potenciálně kontaminované materiály v souladu s národními nebo místními předpisy.

Po denuraci a inkubaci se vzorky již dále za infekční nepovažují (34); nicméně laboratorní personál musí i nadále dodržovat národní a místní bezpečnostní opatření.

Azid sodný

Některé reagentie 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. Při odstraňování kontaminace ze starých odpadních potrubí při podezření na nahromadění azidu doporučuje U.S. Occupational Safety and Health Administration (Úřad pro ochranu zdraví a bezpečnost práce USA) následující postup:

1. Vypusťte kapalinu z lapače gumovou nebo plastovou hadicí.
2. Naplňte roztokem 10% (objemových) hydroxidu sodného.
3. Nechte ustát 16 hodin.
4. Důkladně propláchněte vodou.

Pufř N2

UPOZORNĚNÍ Nebezpečí vzniku vysoce reaktivních sloučenin



Nepřidávejte bělicí ani kyselé roztoky přímo do roztoku či odpadu obsahujícího pufř N2.

Pufř N2 obsahuje guanidin hydrochlorid, který může vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny při smíšení s bělicím činidlem.

V případě rozlití tekutin obsahujících tyto pufry vyčistěte kontaminované místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlita tekutina obsahuje potenciálně infekční látku, vyčistěte zasaženou oblast nejprve laboratorním detergentem a vodou a poté 1% (obj.) roztokem chlornanu sodného.

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 (*Rapid Capture System User Manual*).

Prohlášení ohledně bezpečnosti a rizik komponent

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

Wash Buffer Concentrate (koncentrát promývacího pufru)



Obsahuje: Sodium azide. Varování! Zdraví škodlivý při požití. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Odstraňte obsahu/ obalu v zařízení schváleném pro likvidaci odpadů

Denaturation Reagent (denaturační reagent)



Obsahuje: sodium hydroxide. Nebezpečí! Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může být korozivní pro kovy. Odstraňte obsahu/ obalu v zařízení schváleném pro likvidaci odpadů. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. 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..

Probe Diluent (rozpuštědlo sondy)



Obsahuje: acetic acid; Polyacrylic acid. Nebezpečí! Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Odstraňte obsahu/ obalu v zařízení schváleném pro likvidaci odpadů. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. 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..

High-Risk HPV Calibrator (kalibrátor pro vysoce rizikové typy HPV)

Varování! Způsobuje mírné podráždění kůže. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc a ošetření

High-Risk HPV Quality Control (kontrola kvality pro vysoce rizikový HPV)

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření.

Low-Risk HPV Quality Control (kontrola kvality pro nízko rizikový HPV)


Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření.

Negative Calibrator (negativní kalibrátor)

Varování! Vyvolává mírné podráždění kůže. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ ošetření..

Bezpečnostní opatření

Uživatel musí vždy při provádění testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dodržovat následující bezpečnostní opatření:

- Nepoužívejte reagentie po době použitelnosti vyznačené u symbolu  na štítku na vnějším obalu nebo po době použitelnosti připravených reagentií.

- Provádění testu mimo stanovené časové a teplotní rozsahy může vést k neplatným výsledkům. Testy mimo stanovené časové a teplotní rozsahy jsou neplatné a musí se opakovat.
- Pro zajištění spolehlivých výsledků testu se musí přísně dodržovat postup testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, kalibrace analýzy, kontrola kvality a interpretace výsledků vzorků.
- Je důležité pipetovat přesně vyznačený objem reagentie a po každém přidání reagentie dobře promíchat. Nesplnění tohoto požadavku by mohlo vést chybným výsledkům testu. Zjištění, že došlo k popsáním barevným změnám, potvrzuje, že tyto podmínky byly splněny.
- S výjimkou Wash Buffer Concentrate (koncentrát promývacího pufru) byly komponenty sady testovány jako celek. Nezaměňujte komponenty z jiných zdrojů nebo z jiných šarží. Je však přijatelné kombinovat komponenty ze sad se stejným číslem šarže, aby byly získány požadované objemy reagentií pro testování více mikrodětiček v jediném běhu RCS.
- 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 testu noste rukavice neobsahující prášek.
- Chraňte během provádění testu před kontaminací exogenní alkalickou fosfatázou záchytovou mikrodětičku a Detection Reagent 2 (DR2) (detekční reagentie 2). Mezi látky, které mohou obsahovat alkalickou fosfatázu, patří Detection Reagent 1 (DR1) (detekční reagentie 1), bakterie, sliny, ochlupení a oleje pocházející z kůže. Zakrytí záchytové mikrodětičky po promývacím kroku a během inkubace DR2 je mimořádně důležité, protože exogenní alkalická fosfatáza může reagovat s DR2 a vyprodukovat falešně pozitivní výsledky.
- Chraňte DR2 před dlouhodobou expozicí slunečnímu záření. DR2 použijte ihned po alikvotním dávkování a chraňte před přímým slunečním světlem.
- Opakovací pipetu naplňte před dávkováním reagentie a pravidelně kontrolujte, zda se neobjevují velké vzduchové bubliny. Nadměrná množství velkých vzduchových bublin v hrotu opakovací pipety mohou způsobit nepřesné dávkování a musí se odstranit naplněním pipety, vytlačení veškeré tekutiny a opakovaným naplněním. Konkrétní pokyny pro použití viz příručka uživatele pipety.
- Dávkování DR1 a DR2 proveďte vícekanálové pipetování reverzní pipetovací technikou (viz „Detekce hybridu,“ strana 55). Zkontrolujte, zda je správně nasazen každý hrot pipety na vícekanálové pipetě.
- Zajistěte, aby každá záchytová jamka mikrodětičky byla důkladně propláchnutá (viz „Promývání,“ strana 56). Nedostatečné promytí bude mít za následek zvýšenou hodnotu pozadí a může způsobit falešně pozitivní výsledky. Zbytkový promývací pufr v záchytových jamkách mikrodětičky může vést ke sníženému signálu nebo špatné reprodukovatelnosti.

Uchovávání a nakládání s reagensy

Komponenty sady

Po doručení sady 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. Všechny reagensy se dodávají jako připravené k použití s výjimkou Denaturation Reagent (DNR) (denaturační reagencie), Probe Mix (směs sond) a Wash Buffer (promývací pufr).

Připravené reagensy

Po přípravě je DNR stabilní 3 měsíce při 2–8°C.

Po přípravě je Wash Buffer (promývací pufr) stabilní 3 měsíce při 2–30°C.

Při testování vzorků PreservCyt zpracovávaných pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media nebo sady QIASymphony DSP AXpH DNA jsou otevřené, nedenaurované kalibrátory a kontroly kvality stabilní po 3 měsíce při 2–8°C.

Při zpracování vzorků zpracovaných pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA je připravená denaturační reagencie 2 (DNR2) stabilní po dobu 8 hodin při 15–30°C.

Odběr a příprava vzorků

Cervikální a vaginální vzorky odeberte a přepravte k testování testem digene HC2 High-Risk HPV DNA s využitím jednoho z následujících zařízení pro odběr vzorků:

- digene HC2 DNA Collection Device (obsahující cervikální kartáček a STM)
- Biopsie odebrané v digene STM
- Kartáčkové zařízení pro odběr vzorků nebo zařízením pro odběr vzorků kombinujícím kartáček a špachtli a pak se umístí do roztoku PreservCyt Solution nebo kapaliny SurePath Preservative Fluid

Vzorky odebrané jinými zařízeními pro odběr vzorku nebo přepravované v jiných transportních médiích nebyly kvalifikovány pro použití s tímto testem. Charakteristiky chování tohoto testu byly určeny pouze pro vyznačené odběrové sady.

U těhotných žen se zařízení k odběru vzorků *digene* HC2 DNA Collection Device nesmí používat. Cervikální vzorky se musí odebrat před aplikací kyseliny octové nebo jódu, pokud se

provádí kolposkopické vyšetření. Viz návod k použití zařízení *digene* HC2 DNA Collection Device, kde naleznete další postupy pro odběr vzorků a nakládání s nimi.

Cervikální a vaginální vzorky odebrané v STM nevyžadují konverzi vzorku před testováním testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Vzorky PreservCyt a SurePath vyžadují konverzi vzorku před testováním testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Cervikální a vaginální vzorky v STM

Důležité upozornění: Neodebírejte cervikální ani vaginální vzorek STM, pokud je ve vysoké koncentraci přítomen antifungální krém, antikoncepční gel nebo vaginální roztok.

Vzorky STM je možné přechovávat až po dobu 2 týdnů při pokojové teplotě a přepravovat je bez zmrazení do zkušební laboratoře. Přepravujte vzorky v izolovaném kontejneru buď jako kurýrní zásilku dopravovanou přes noc, nebo s 2denním dodáním.

Ve zkušební laboratoři uchovávejte vzorky při teplotě 2–8°C, pokud bude test proveden během 1 týdne. Pokud bude test proveden později než za 1 týden, zakryjte uzávěry zkumavek se vzorky fólií Parafilm a vzorky uchovávejte při –20°C až po 3 měsíce. Při vyjímání vzorků z mrazničky pro testování neprodleně nahradte uzávěry šroubovacími krytkami zkumavek pro odběr vzorků.

Do STM bylo přidáno konzervační činidlo ke zpomalení bakteriálního růstu a k zachování neporušenosti DNA. Není určeno k zachování životaschopnosti organismů nebo buněk.

Cervikální biopsie

Čerstvě odebrané cervikální biopsie o průměru 2–5 mm lze testovat testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Nepoužívejte biopsie o průměru menším než 2 mm. Okamžitě umístěte bioptické vzorky do 1,0 ml STM, zakryjte uzávěr zkumavky na vzorky fólií Parafilm, aby se předešlo uniknutí uzávěru ze zkumavky a uchovávejte zmrazené při –20°C. Bioptické vzorky dopravujte při 2–30°C jako dodávku přes noc do zkušební laboratoře.

Ve zkušební laboratoři uchovávejte při –20°C až do zpracování. Při vyjímání vzorků z mrazničky pro testování neprodleně nahradte uzávěry šroubovacími krytkami zkumavek pro odběr vzorků.

Cervikální vzorky v roztoku PreservCyt

Důležité upozornění:

- Neodebírejte cervikální vzorky PreservCyt pro přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media, pokud je přítomno antikoncepční želé nebo antifungální krém ve vysokých koncentracích.
- Neodebírejte cervikální vzorky PreservCyt pro přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA, pokud je přítomno antikoncepční želé nebo antifungální krém ve vysokých koncentracích.

Odeberte vzorky rutinním způsobem a připravte sklíčka ThinPrep® Pap Test podle pokynů z návodu k použití dodaného výrobcem

Following collection, store PreservCyt specimens for up to 3 months at 2–30°C prior to sample preparation for the *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. PreservCyt specimens cannot be frozen.

Po odběru uchovávejte vzorky PreservCyt až po dobu 3 měsíců při teplotě 2–30 °C před přípravou vzorku pro test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Vzorky PreservCyt nelze zmrazit.

K přípravě vzorku jsou dostupné následující metody:

- Automatická příprava vzorku pomocí přístroje QIASymphony SP a sady QIASymphony DSP HPV Media.
Výsledkem je extrakt vzorku (obsahující magnetické částice, STM a DNR), který je připraven k denaturační fázi testu.
- Automatická příprava vzorku pomocí přístroje QIASymphony SP se sadou QIASymphony DSP AXpH DNA.
Výsledkem je eluát DNA připravený ke zpracování v rámci denaturačního kroku testu.
- Ruční příprava vzorku pomocí sady *digene* HC2 Sample Conversion. Výsledkem ruční přípravy vzorku je denaturovaný vzorky připravený ke zpracování v rámci hybridizačního kroku testu.

Požadavky na objem vzorků jsou založeny na metodě přípravy vzorku následujícím způsobem:

- Automatická příprava vzorků sadou QIASymphony DSP HPV Media vyžaduje 3 ml vzorku
- Automatická příprava vzorků sadou médií QIASymphony DSP AXpH DNA vyžaduje 4 ml vzorku

- Ruční příprava vzorku používající sadu *digene* HC2 Sample Conversion vyžaduje nejméně 4 ml vzorku

Vzorky s méně než požadovaným objemem vzorku po přípravě Pap testu neobsahují dostatečný materiál a mohly by vést k falešně negativnímu výsledku testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Cervikální vzorky v konzervační kapalině SurePath Preservative Fluid

Důležité upozornění: Neodebírejte cervikální vzorky SurePath pro přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media, pokud je zde přítomno antikoncepční želé nebo antifungální či protizánětlivý krém.

Vzorky odebírejte do konzervační kapaliny SurePath podle příslušného návodu k použití.

Příprava vzorku za vzorků SurePath může proběhnout před zpracováním cytologických vzorků, nebo až po dokončení tohoto procesu.

Pokud přípravu provádíte před zpracováním cytologických vzorků, použijte vzorek z původního vzorku SurePath, který nebyl zpracován žádnou jinou diagnostickou metodou včetně systému BD PrepMate® a procesoru sklíčků BD PrepStain®. V tomto návodu k použití se tyto vzorky označují jako „vzorky SurePath“, abychom předešli nedorozumění.

Pokud přípravu provádíte po zpracování cytologických vzorků, použijte vzorek ze zbývající post-gradientní buněčné pelety poté, co připravíte klinický vzorek SurePath podle příslušných pokynů k systému BD PrepMate a procesoru sklíčků BD PrepStain. V tomto návodu k použití se tyto vzorky označují jako „vzorky SurePath z post-gradientních buněčných pelet“, abychom předešli nedorozumění.

K přípravě vzorku jsou dostupné následující metody:

- Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath pomocí přístroje QIASymphony SP a sady QIASymphony DSP HPV Media.
Výsledkem je extrakt denaturovaného vzorku (obsahující magnetické částice, STM a DNR), který je připraven k hybridizační fázi testu.
- Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientní buněčné pelety s využitím přístroje QIASymphony SP a sady QIASymphony DSP HPV Media.
Výsledkem je extrakt denaturovaného vzorku (obsahující magnetické částice, STM a DNR), který je připraven k hybridizační fázi testu.

- Ruční příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet.

Výsledkem ruční přípravy vzorku je denaturovaný vzorek připravený k hybridizační fázi testu.

Následující požadavky na objem vzorků jsou založeny na metodě přípravy vzorku:

- Automatická příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media vyžaduje 950 µl.
- Ruční příprava vzorku vyžaduje 2,8 ml vzorku SurePath z post-gradientních buněčných pelet.

Použijete-li menší než doporučené množství, výsledek testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA může vyjít falešně negativní.

Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath

Po odběru uchovávejte vzorky SurePath až po dobu 4 týdnů při teplotě 5–25 °C před přípravou vzorku pomocí přístroje QIASymphony SP a sady QIASymphony DSP HPV Media. Použitý vzorek SurePath nesmí být zpracován žádnou jinou diagnostickou metodou včetně systému BD PrepMate a procesoru sklíček BD PrepStain. Automatizovaná příprava vyžaduje 950 µl vzorku SurePath.

Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet

Důležité upozornění: Bezprostředně po přípravě sklíčka SurePath Pap přeneste pipetou do odstředivací zkumavky obsahující post-gradientní buněčnou peletu 2,0 ml konzervační kapaliny SurePath. Tím se zachová neporušenost post-gradientní buněčné pelety pro provedení testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Post-gradientní buněčná peleta s konzervační kapalinou SurePath může být uchovávána až 4 týdny při teplotě 5–25 °C před přípravou vzorku pro test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Automatizovaná příprava vzorku vyžaduje 950 µl vzorku SurePath z post-gradientních buněčných pelet.

Ruční příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet

Důležité upozornění: Bezprostředně po přípravě sklíčka SurePath Pap přeneste pipetou do odstředivací zkumavky obsahující zbývající buněčnou peletu 2,0 ml konzervační kapaliny SurePath. Tím se zachová neporušenost post-gradientní buněčné pelety pro provedení testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Post-gradientní buněčná peleta s konzervační kapalinou SurePath může být uchovávána až 4 týdny při teplotě 2–30 °C před přípravou vzorku pro test *digene* HC2 High-Risk 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

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Při ručním testování nechte ohřívač Microplate Heater I nejméně 60 minut temperovat na $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ při ohřevu ze studeného stavu. Nedostatečný čas určený pro toto zahřívací období by mohl vést k roztavení hybridizační mikrodestičky. Viz Uživatelská příručka Microplate Heater I (Microplate Heater I User Manual), kde naleznete další pokyny.
- Jestliže používáte vodní lázeň během denaturace a hybridizačních kroků, zajistěte, aby vodní lázeň měla teplotu 65°C a vodní hladina byla adekvátní pro ponoření celého objemu vzorků do zkumavky.

Příprava reagensie

- Vyjměte vzorky a všechny požadované reagensie z mrazničky před zahájením testu. Nechte je 15–30 minut vytažené, aby dosáhly teploty $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$. Připravte vzorky PreservCyt a SurePath předtím, než všechny předtím denaturované vzorky a reagensie dosáhly rovnováhu s pokojovou teplotou.
- Pokud kombinujete reagensie připravené k okamžitému použití pro běh RCS s více destičkami, důkladně promíchejte jednotlivé lahvičky a pak smíchejte příslušný objem reagensie v čisté jednorázové polypropylénové kónické zkumavce.
- Pro ruční testování se reagensie Wash Buffer (promývací pufr) a Probe Mix (směs sond) připravují během konkrétních kroků testování. Pro automatické testování RCS se všechny reagensie připraví před zahájením běhu RCS a umístí se na plošinu RCS.
- Připravte DNR a DNR2, podle situace, před přípravou jiných reagensí.
- Na konci testu zlikvidujte všechny připravené reagensie (pokud nebudou specifikovány odlišně) a alikvotní podíly reagensí.
- Použijte tabulky 1–5 níže pro stanovení požadovaného objemu každé reagensie na základě počtu testů/mikrodestiček a zkušební metody. Objemy pro automatické testování RCS zahrnují prázdný objem reagensie požadovaný přístrojem.

Tabulka 1. Požadované objemy připravovaných reagensů a reagensů připravených k okamžitému použití pro ruční testování vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet

Počet testů/proužků	Směs sond	Promývací pufr	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 litrů	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 litrů	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 litrů	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 litrů	12 ml	12 ml

Tabulka 2. Požadované objemy připravených reagensů a reagensů připravených k okamžitému použití pro automatické testování RCS vzorků STM, ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet a vzorků SurePath a SurePath z post-gradientních buněčných pelet připravených pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Počet mikrodisek	Směs sond	Promývací pufr	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 litrů	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 litrů	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 litrů	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 litrů	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 litrů	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 litrů	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 litrů	34 ml	34 ml

Tabulka 3. Požadované objemy připravených reagensů a snadno použitelných reagensů pro automatické testování RCS vzorků PreservCyt připravených pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Počet mikrodisek	DNR	Směs sond	Promývací pufr	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 litrů	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 litrů	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 litrů	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 litrů	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 litrů	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 litrů	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 litrů	34 ml	34 ml

Tabulka 4. Požadované objemy připravených reagensů a snadno použitelných reagensů pro ruční testování vzorků PreservCyt připravených pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA

Počet testů/proužků	DNR	DNR2	Směs sond	Promývací pufr	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 litrů	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 litrů	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 litrů	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 litrů	12 ml	12 ml

Tabulka 5. Požadované objemy připravených reagensů a snadno použitelných reagensů pro automatické testování RCS vzorků PreservCyt připravených pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA

Počet mikrodisek	DNR	DNR2	Směs sond	Promývací pufr	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 litrů	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 litrů	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 litrů	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 litrů	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 litrů	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 litrů	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 litrů	34 ml	34 ml

Denaturační reagentie

1desková sada je dodávána s denaturační reagentií (DNR) o objemu 50 ml a 4desková sada s denaturační reagentií o objemu 2 x 100 ml. Přípravu DNR musíte provést podle objemu obsaženého v příslušné sadě.

Poznámky:

- Po přípravě je DNR stabilní 3 měsíce při 2–8°C.
- Pokud barva zmizí, přidejte 3 další kapky Indicator Dye (barva indikátoru) a před použitím důkladně promíchejte.

50ml lahvička

1. Přidejte 5 kapek barviva indikátoru (Indicator Dye) do 50ml lahvičky s denaturační reagentií.
2. Důkladně promíchejte.

DNR by měla mít jednotnou, tmavě fialovou barvu.

3. Na lahvičce s DNR vyznačte novou dobu použitelnosti.

100 ml lahvička

1. Přidejte 10 kapek barviva indikátoru (Indicator Dye) do 100 ml lahvičky s denaturační reagensy.
2. Důkladně promíchejte.

DNR by měla mít jednotnou, tmavě fialovou barvu.

3. Na lahvičce s DNR vyznačte novou dobu použitelnosti.

Denaturation Reagent 2 (denaturační reagensie 2)

Poznámka: DNR2 se pouze vyžaduje k testování vzorků PreservCyt připravených pomocí sady QIASymphony DSP AXPH DNA.

1. Označte čistou jednorázovou polypropylénovou kónickou zkumavku jako „DNR2“.
2. Přidejte požadovaný objem Buffer N2 (pufr N2) (viz tabulka 6 níže) do označené nádoby.

Tabulka 6. Příprava DNR2

Požadovaný objem DNR2	Objem pufru N2	Objem pufru D2	Indicator Dye (Barva indikátoru)
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 kapky
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	2. 1–2 kapky
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 kapky
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	4. 1–2 kapky
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 kapky
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	6. 1–2 kapky
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 kapky
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	8. 1–2 kapky
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 kapky
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	10. 1–2 kapky

3. Přidejte požadovaný objem Buffer D2 (pufr D2) (viz tabulka 6 níže) do označené nádoby.

4. Přidejte požadovaný objem Indicator Dye (barva indikátoru) (viz tabulka 6 níže) do označené nádoby.

Poznámka: Použijte Indicator Dye (barva indikátoru) dodávanou se sadou testu digene HC2 High-Risk HPV DNA.

5. Protřepávejte nejméně 10 sekund.

Poznámka: Po přípravě je DNR2 stabilní 8 měsíců při 15–30°C.

Směs sond

- Pro ruční testování připravte směs sond během inkubace denaturace vzorků (jak je to vhodné, viz „Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a vzorky STM,“ strana 47 nebo „Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a eluátů DNA pro ruční testování,“ strana 44).
 - Postupujte mimořádně opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci RNázy. Při pipetování sondy používejte pipetové hroty s aerosolovou bariérou.
 - Probe Diluent (rozpuštědlo sondy) je viskózní. Zajistěte, aby bylo dosaženo viditelného protřepání při přípravě Probe Mix (směs sond); neúplné promíchání může vést ke snížení signálu.
 - Pokud budete kombinovat více injekčních lahviček sondy pro automatické testování RCS, slijte sondu do jedné injekční lahvičky a promíchejte pipetováním.
1. Aby se zabránilo zachycení sondy ve víku injekční lahvičky, krátce odstředujte každou injekční lahvičku sondy, aby se kapalina dostala na dno injekční lahvičky.
 2. Poklepte jemně na injekční lahvičku, aby se promíchala.
 3. Určete požadované množství Probe Mix (směs sond):

Doporučení: Vytvořte Probe Mix (směs sond) navíc, aby vzal v úvahu objem, který se může ztratit v hrotech pipety nebo na straně injekční lahvičky. Objemy uvedené v tabulkách 1–5 shora zahrnují doporučený objem navíc.

Ruční testování: Stanovte objemy požadované pro ředění sondy 1:25 v Probe Diluent (rozpuštědlo sondy) na přípravu Probe Mix (směs sond) (25 µl/test). Objemy jsou uvedeny na **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, strana **Error! Bookmark not defined.** a Tabulka 4 strana 34, podle toho, jak je to vhodné.

Automatické testování RCS: Použijte objemy specifikované v Tabulka 2, strana 33, Tabulka 3, strana 33, nebo Tabulka 5, strana 34 podle toho, co se hodí.

4. Označte novou, jednorázovou nádobu jako „High-Risk HPV Probe Mix“ (směs sond vysoce rizikového HPV).

V závislosti na počtu testů se doporučuje buď 5 ml, nebo 15 ml polypropylénovou zkumavkou s kulatým dnem a nasazovací krytkou.

5. Přidejte požadovaný objem Probe Diluent (rozpuštědlo sondy) (viz tabulka 7 níže) do označené nádoby.
6. Napipetujte požadované množství High-Risk HPV Probe (sonda vysoce rizikového HPV) do Probe Diluent (rozpuštědlo sondy) (viz tabulka 7 níže), kdy přiložíte hrot pipety k vnitřní stěně zkumavky těsně nad meniskus a vypudíte obsah.

Důležité upozornění: Hrot nesmíte ponořit do Probe Diluent (rozpuštědlo sondy).

Tabulka 7. Příprava Probe Mix (směs sond)

Požadovaný objem Probe Mix (směs sond)	Objem Probe Diluent (rozpuštědlo sondy)	Objem High-Risk HPV Probe (sonda vysoce rizikového HPV)
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Protřepávejte nejméně 5 sekund při maximální rychlosti pro důkladné promíchání.
Musí dojít k viditelnému protřepání.

Promývací pufr

- Pro ruční testování připravte Wash Buffer (promývací pufr) během stupně hybridního záchytu (viz „Záchyt hybridu,“ strana 53).
- Pro minimalizaci expozice přidejte vodu při přípravě do Wash Buffer Concentrate (koncentrát promývacího pufru).
- Pro metodu ručního promývání mikroděstičky připravte 3 litry Wash Buffer (promývací pufr) ve Wash Apparatus (mycí přístroj).

Doporučení: Každé 3 měsíce očistěte mycí přístroj a hadičky roztokem 0,5% chlornanu sodného a důkladně propláchněte destilovanou nebo deionizovanou vodou, aby se zabránilo případné kontaminaci alkalickou fosfatázou přítomnou v bakteriích a plísních.

- Připravte promývací pufr pro Automated Plate Washer (automatická promývačka destiček) a uložte jej do zakryté nádoby, případně připravte 1 litr a umístěte jej do promývací nádržky automatické promývačky destiček.

- Pro automatické testování RCS připravte stanovené množství (jak to bude vhodné, viz Tabulka 2, strana 33, Tabulka 3, strana 33, nebo Tabulka 5, strana 34) v RCS Wash Bottle (promývací nádobě RCS).
1. Koncentrát promývacího roztoku dobře promíchejte a přidejte požadovaný objem koncentráту promývacího roztoku (viz tabulka 8 níže) do stanovené nádoby.
 2. Přidejte požadovaný objem destilované nebo deionizované vody (viz tabulka 8 níže) do určené nádoby.

Tabulka 8. Přípravy promývacího pufru

Požadovaný objem promývacího pufru	Objem koncentráту promývacího pufru	Objem deionizované nebo destilované vody
1 litr	33.3 ml	966.7 ml
2 litrů	66.6 ml	1933.4 ml
3 litrů	100.0 ml	2900.0 ml
6 litrů	200.0 ml	5800.0 ml

3. Jakékoliv otvory nádoby zakryjte čistým papírovým ručníkem, který neuvolňuje vlákna a dobře promíchejte.
4. Nádobu těsně uzavřete, aby nedošlo ke kontaminaci nebo odpařování, případně ji umístěte na příslušný přístroj podle toho, co je vhodné.
5. Na promývacím pufru vyznačte novou dobu použitelnosti.

Poznámka: Po přípravě je Wash Buffer (promývací pufr) stabilní 3 měsíce při 2–30°C.

Vytvořte rozvržení desky

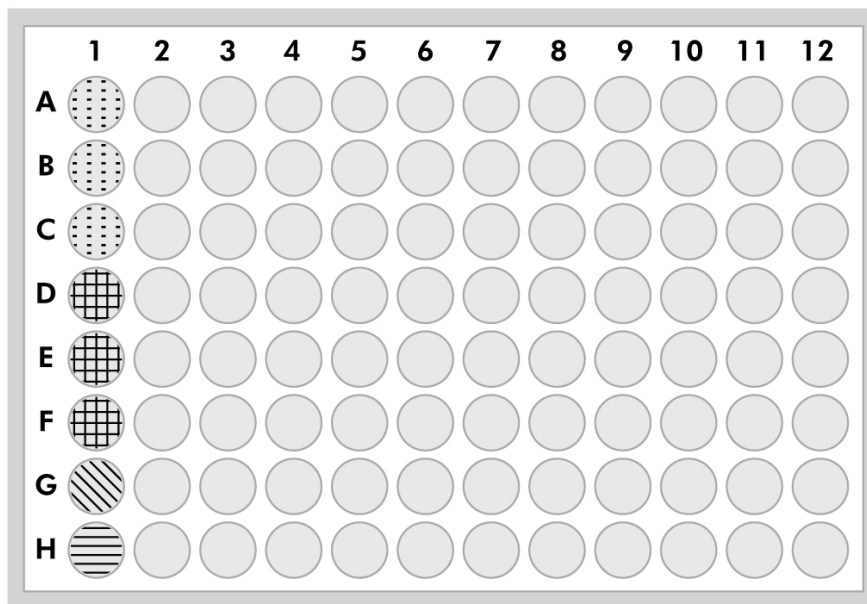
1. Vytvořte rozvržení desky pomocí softwaru pro analýzu rozborů *digene* pomocí protokolů rozborů *digene* pro HPV.

Viz příslušná příručka pro uživatele softwaru, kde jsou pokyny pro vytvoření uspořádání desky se správnými polohami pro kalibrátory, kontroly kvality a vzorky.

Poznámky:

- Kalibrátory, kontroly kvality a vzorky se zpracovávají v konfiguraci kolonek po 8 jamkách.
- Testujte kalibrátory a kontroly kvality v následujících polohách na mikrodestičce (viz Obrázek 1, strana 39):
 - Replikáty Negative Calibrator (NC) (negativní kalibrátor) v jamkách mikrodestičky A1, B1, C1
 - Replikáty High-Risk HPV Calibrator (HRC) (kalibrátor vysoce rizikového HPV) v jamkách mikrodestičky D1, E1, F1

- Kontrola kvality Low-Risk HPV Quality Control (QC1-LR) (nízko rizikový HPV) v jamce mikrodestičky G1
- Kontrola kvality High-Risk HPV Quality Control (QC2-HR) (vysoce rizikový HPV) v jamce mikrodestičky H1



Obrázek 1. Poloha kalibrátorů, kontrol kvality a vzorků na mikrodestičce.

Důležité upozornění: Při provádění automatického testování RCS použijte k vytvoření rozvržení desky a generování výsledků protokoly rozborů specifické pro RCS. Definované parametry protokolů rozborů specifických pro RCS se odlišují od parametrů pro protokoly rozborů ručního testování (viz „Výpočet hraniční hodnoty,“ strana 62).

2. S stojanu zkumavek pro odběr vzorků nebo stojanu vzorků umístěte kalibrátory, kontroly kvality a vzorky, jež se mají testovat, v pořadí, v němž budou testovány.

Důležité upozornění: Při automatickém testování RCS je zásadně důležité, aby rozvržení desky odpovídalo správným testovaným vzorkům a aby nedošlo k hlášení nepřesných výsledků testů. Potvrďte pro každý stojan vzorků a použité víko, že odpovídají sériová čísla a, jak to bude vhodné, označte každý stojan vzorků a víko podle pořadí, v němž mají být

testovány na RCS. Použijte značkovač a štítek, který se nesmyje při teplotě 65°C ve vodní lázni.


Příprava vzorku

Vzorky PreservCyt a SurePath vyžadují přípravu vzorku před testováním testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. V závislosti na typu provedené přípravy vzorku jsou připravené vzorky připraveny k různým krokům testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

K dispozici jsou následující metody přípravy vzorků:


- Automatická příprava vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media.
- Automatická příprava vzorku ze vzorků SurePath a post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media
- Automatická příprava vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA.
- Ruční příprava vzorků PreservCyt
- Ruční příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet

Příprava vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media


 Viz též Návod k použití (příručka) sady QIASymphony DSP HPV Media (QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)) s pokyny pro přípravu vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media.

Důležité upozornění: Extrakty vzorků vyprodukované díky přípravě vzorku u vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media mohou být testovány pouze s využitím RCS. Ruční provádění testu s extrakty vzorků není validováno.

Výsledkem přípravy vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media jsou extrakty vzorků v hybridizační mikrodesece s prázdným prvním sloupcem. Extrakty vzorků obsahují magnetické částice, STM a DNR a jsou připraveny k automatickému testování RCS v denaturačním kroku. Kalibrátory, kontroly kvality a extrakty vzorků se denaturují současně v hybridizační mikrodesece během automatického testování RCS (viz „Denaturace a hybridizace vzorků připravených pomocí QIASymphony SP“, strana 44).


 Při provádění automatického testování RCS eluátů vzorků připravených pomocí QIASymphony SP naleznete pokyny pro úplné testování v Příručce uživatele systému Rapid Capture — Provádění testů digene HC2 DNA pomocí

Příprava vzorku ze vzorků SurePath a SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media


 Pokyny k přípravě vzorků SurePath a SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media najdete v příručce pro tuto sadu *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*.

Důležité upozornění: Extrakty vzorků vyprodukované díky přípravě vzorku u vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media mohou být testovány pouze s využitím RCS. Ruční provádění testu s extrakty vzorků není validováno.

Výsledkem přípravy vzorku z klinických vzorků SurePath a vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet s využitím sady QIASymphony DSP HPV Media jsou kalibrátory, kontroly kvality a extrakty vzorku na hybridizační mikroadesce připravené pro automatizovanou analýzu systémem RCS v rámci hybridizačního kroku celého testu.


 Při provádění automatického testování RCS eluátů vzorků připravených pomocí QIASymphony SP naleznete pokyny pro úplné testování v Příručce uživatele systému Rapid Capture — Provádění testů digene HC2 DNA pomocí zpracovaných vzorků QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*).

Příprava vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA

 Viz Příručka k soupravě QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AxpH DNA Kit Handbook*), kde jsou pokyny pro přípravu vzorku u vzorků PreservCyt.

Výsledkem přípravy vzorku v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA jsou eluáty DNA v hybridizační mikroadesce s prázdným prvním sloupcem. Eluáty DNA jsou připraveny pro denaturační krok testu. Kalibrátory, kontroly kvality a eluáty DNA se denaturují ve stejné době na hybridizační mikroadesce (viz „Denaturace a hybridizace vzorků připravených pomocí QIASymphony SP,“ strana 44).

Ruční příprava vzorků PreservCyt

 Pro vzorky PreservCyt viz návod k použití sady *digene* HC2 Sample Conversion pro ruční přípravu vzorků.

Ruční příprava vzorků v případě vzorků PreservCyt pomocí sady *digene* HC2 Sample Conversion zajistí jejich připravenost na hybridizační krok testu. Odděleně připravte kalibrátory a kontroly kvality (viz „Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a vzorky STM“ strana 47).

Ruční příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet

Na základě ruční přípravy vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet vzniknou vzorky připravené na hybridizační fázi testu. Odděleně připravte kalibrátory a kontroly kvality.

Důležité upozornění: Pokud se ukáže, že objem post-gradientní buněčné pelety vzorku SurePath je menší než 1 ml, post-gradientní buněčná peleta není vhodná pro analýzu testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, protože po cytologii nebyla k vzorku přidána konzervační kapalina SurePath.

1. Vytemperujte vzorky SurePath z post-gradientních buněčných pelet na teplotu místnosti a ujistěte se, že se pozorovaný objem kapaliny rovná přibližně 2,8 ml.
2. Odstřeďte vzorky SurePath z post-gradientních buněčných pelet ve výkvném korečkovém rotoru při $800 \pm 15 \times g$ po dobu 10 minut (± 1 minuta).
3. Vyměňte zkumavky z odstředivky.
4. Bezprostředně po odstředování opatrně dekantujte supernatant a jemně odsajte každou zkumavku přibližně 3krát na tampónech Kimtowels nebo ekvivalentních papírových ručnicích, které neuvolňují vlákno, abyste odstranili přebytečnou kapalinu. Peletu sledujte v každé zkumavce.

Důležité upozornění: Během osušování nenechte sklouznout buněčné pelety dolů do zkumavky.

5. Zkumavky dejte do stojanu.
6. Přidejte 200 μ l STM do každé pelety opakovací nebo jednokanálovou pipetou.
7. Znovu suspendujte každou peletu protřepáváním každé zkumavky individuálně po 15 sekund při vysoké rychlosti.

Pokud se bude peleta obtížně resuspendovat, protřepávejte dalších 5–30 sekund nebo dokud se plovoucí vrstva pelety neuvolně ode dna zkumavky a nezačne se rozpouštět.

Poznámka: Zkumavky lze míchat bez uzavření.

8. Přidejte 100 µl DNR do každého vzorku SurePath opakovací nebo jednonálovou pipetou.
Důležité upozornění: Dbejte na to, abyste se nedotkli boků zkumavky, protože by molo dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků.

9. Každou zkumavku jednotlivě důkladně promíchejte v třepačce při vysoké rychlosti po 5 sekund.

Poznámka: Zkumavky lze míchat bez uzavření.

10. Označte zkumavky digene HC2 Sample Conversion nebo 15ml kónické zkumavky odpovídajícím označením vzorku a typem (například "SP" pro vzorky SurePath) a umístěte zkumavky do stojanu zkumavek.

Poznámka: Zkumavky digene HC2 Sample Conversion se musí používat pro automatické testování RCS.

11. Převeďte celý objem do odpovídající 15ml kónické zkumavky pomocí jednorázové 7ml přenosové pipety se standardním hrotem nebo ekvivalentní pipetou.

12. Uzavřete kónické zkumavky a vložte je do stojanu zkumavek.

13. Inkubujte zkumavky ve vodní lázni při $65 \pm 2^\circ\text{C}$ po 90 ± 5 minut.

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

Pokud se ve stejný den dokončí testování, denaturujte kalibrátory a kontroly kvality (viz „Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a vzorky STM,“ strana 47).

14. Vyjměte stojan zkumavek z vodní lázně po inkubaci.

Pokud používáte stojan vzorků, nenechte je ochladnout předtím, než odstraníte víko stojanu. Ihned pokračujte testováním nebo odstraňte víko stojanu a těsnicí fólii zkumavky DuraSeal.

Poznámka: Pokud stojan zkumavek chladne, zkumavky se mohou přilepit k víku stojanu a následně se rozlít.

Připravené vzorky SurePath mohou být:

neprodleně testovány (viz „Hybridizace připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath“ strana 49)

uchovávány (viz „Volitelný zastavovací bod připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath“ strana 49)


Denaturace a hybridizace vzorků připravených pomocí QIASymphony SP

Výsledkem přípravy vzorků na QIASymphony SP je hybridizační mikrodestička obsahující minimálně připravené vzorky.

Pokud byly vzorky PreservCyt připraveny pomocí QIASymphony SP, první sloupec hybridizační mikrodestičky bude prázdný. Obsah mikrodestičky je připraven pro denaturační krok testu. Kalibrátory a kontroly kvality se přidávají k hybridizační mikrodosce buď ručně, nebo během automatického testu RCS, pak se provede denaturační krok.

Pokud byly vzorky SurePath nebo SurePath z post-gradientních buněčných pelet připraveny pomocí přístroje QIASymphony SP, destička obsahuje připravené vzorky s denaturovanými kalibrátory a kontrolami kvality napipetovanými do první kolonky hybridizační mikrodestičky.

Důležité upozornění: Extrakty vzorků, které jsou výsledkem přípravy vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media, mohou být testovány pouze s využitím systému RCS. Ruční provádění testu s extrakty vzorků není validováno.

 Při provádění automatického testování RCS eluátů vzorků připravených pomocí QIASymphony SP naleznete pokyny pro úplné testování v Příručce uživatele systému Rapid Capture — Provádění testů *digene* HC2 DNA pomocí zpracovaných vzorků QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*).

Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a eluátů DNA pro ruční testování.

- Tento postup slouží k ručnímu testování vzorků PreservCyt připravených pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA. Pokud provádíte automatického testování RCS, naleznete pokyny pro úplné testování v Příručce uživatele systému Rapid Capture — Provádění testů *digene* HC2 DNA pomocí zpracovaných vzorků QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*).
- Denaturace kalibrátorů a kontrol kvality se provádí pomocí DNR, zatímco denaturace eluátů DNA se provádí pomocí DNR2.
 1. Protřepejte každý kalibrátor a kontrolu kvality po dobu 10 sekund při maximálním nastavení.
 2. Otočte každou zkumavku dnem vzhůru, aby se odsunul materiál od krytky zkumavky.

Odstraňte krytky ze zkumavek kalibrátoru a kontroly kvality a zlikvidujte je.

3. Jednokanálovou pipetou přidejte 50 µl příslušného kalibrátoru nebo kontroly kvality na dno prázdné jamky hybridizační mikrodestičky podle vytvořeného rozvržení desky.
4. Pokud se pro dodatečné testování bude používat kalibrátor a kontroly kvality, uzavřete zkumavky novými šroubovacími krytkami pro zkumavky na odběr vzorků, vyznačte novou dobu použitelnosti a uchovávejte při 2–8°C.

Poznámka: Po otevření jsou nedenaurované kalibrátory a kontroly kvality stabilní po dobu 3 měsíců při teplotě 2–8°C.

5. Důkladně protřepejte připravené DNR a DNR2 a přidejte alikvotní množství každého z nich do vhodné označené jednorázové nádoby na reagenty.

Důležité upozornění: Zajistěte přidání správné reagenty do správného sloupce mikrodestičky eluátu.

6. 8kanálovou pipetou přidejte 25 µl DNR do prvního sloupce hybridizační mikrodestičky obsahující kalibrátory a kontroly kvality.
7. 8kanálovou pipetou přidejte 25 µl DNR2 do každé jamky hybridizační mikrodestičky obsahující eluát DNA.
8. Zakryjte hybridizační mikrodestičku víkem mikrodestičky a protřepávejte 30 sekund na rotační třepače Rotary Shaker I nastavené na 1,100 ± 100 ot/min.
9. Umístěte mikrodestičku do ohříváče Microplate Heater I vytemperovaného na teplotu 65 ± 2°C, dbejte na to, aby nedocházelo k rozstříkání. Inkubujte hybridizační mikrodestičku 45 ± 5 minut.

Připravte Probe Mix (směs sond) během této inkubace (viz „Směs sond,“ strana 36).

10. Vyjměte hybridizační mikrodestičku z ohříváče Microplate Heater I.

Denaturované kalibrátory, kontroly kvality a eluáty DNA mohou být:

- uchovávány (viz „Volitelný body zastavení eluátů DNA“ strana 45)
- neprodleně testovány (viz „Hybridizace eluátů DNA“ strana 46)

Volitelný body zastavení eluátů DNA

Denaturované eluáty, včetně kalibrátorů a kontrol kvality, zakryté víkem mikrodestičky lze po 2 týdny uchovávat při 2–8°C.

Hybridizace eluátů DNA

Pokud hybridizační mikrodestička obsahující denaturované kalibrátory, kontroly kvality a eluáty DNA byla uložena, odstraňte víko mikrodestičky a nechte mikrodestičku eluátu vytemperovat na 20–25°C.

1. Probe Mix (směs sond) důkladně protřepejte a v alikvotním množství převedte do nádoby reagensie na jedno použití.
2. Opatrně pipetujte 25 µl Probe Mix (směs sond) do každé jamky hybridizační mikrodestičky pomocí 8kanálové pipety a nových hrotů pro každý přídavek Probe Mix.
3. Zabraňte zpětnému rozstříkávání a kontaktu s bočními stěnami jamek hybridizační mikrodestičky.
4. Zakryjte hybridizační mikrodestičku víkem mikrodestičky a protřepávejte 3 ± 2 minuty na rotační třepače Rotary Shaker I nastavené na 1.100 ± 100 ot/min.

Po protřepání by kalibrátory, kontroly kvality a eluáty DNA měly zežloutnout.

Vzorky, které zůstanou fialové, možná neobdržely správné množství Probe Mix (směs sond). Přidejte dalších 25 µl Probe Mix (směs sond) ke vzorkům, které zůstanou fialové a znovu je protřepte. Pokud vzorek zůstane fialový po provedení tohoto postupu, vzorek otestujte znovu.

5. Umístěte mikrodestičku do ohříváče Microplate Heater I vytemperovaného na teplotu 65 ± 2°C, dbejte na to, aby nedocházelo k rozstříkávání. Inkubujte hybridizační mikrodestičku 60 ± 5 minut.
6. Pro pokračující testování přistupte k „Záchyt hybridu,“ strana 53.

Denaturace a hybridizace vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet

- Při testování ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet se pro vzorky nevyžaduje denaturační fáze. Ovšem kalibrátory a kontroly kvality požadované v rámci testu se denaturují podle následujících pokynů.
- Některé vzorky STM mohou obsahovat krev a jiný biologický materiál, které mohou maskovat změny barvy po přidání DNR. Vzorky, které se vyznačují tmavou barvou před přidáním DNR, nemohou přinést správnou barevnou změnu v tomto kroku. V těchto případech, kdy se neprojeví správná změna barvy, nebudou nepříznivě ovlivněny výsledky testu. Správné smíchání může být ověřeno sledováním změny barvy kalibrátorů a kontrol kvality.

Denaturace kalibrátorů, kontrol kvality a vzorky STM

- Nikdy neodstraňujte zařízení pro odběr vzorků ze zkumavky vzorků.
- Aby nedošlo k falešně pozitivním výsledkům, je zásadně důležité, aby veškerý materiál vzorků přišel do kontaktu s DNR. Smíchání po přidavku DNR je zásadně důležitý krok.
- Vzorky STM denaturované v třepačce MST Vortexer 2 musí používat metodu „Hybridizace pomocí mikrodestičky a ohříváče Microplate Heater I“ popsanou na straně 50. Metoda „Hybridizace pomocí mikrozkuvek a vodní lázně“ (strana 51) nebyla validována se vzorky STM denaturovanými v třepačce MST Vortexer 2.

1. Odeberte a zlikvidujte uzávěry zkumavek.

Důležité upozornění: Uzávěry odebrané ze zkumavek vzorků STM považujte za potenciálně infekční (viz „Varování a bezpečnostní opatření,“ strana 21, kde jsou dodatečné informace).

2. Odpipetujte stanovený objem (viz tabulka 9 níže) DNR do zkumavek pomocí opakovací nebo nastavitelné pipety.

Dbejte na to, abyste se nedotkli boků zkumavek, protože by mohlo dojít ke zkřížené kontaminaci vzorků.

Důležité upozornění: Sady s 1 deskou a 4 deskami mají odlišné objemy pro kalibrátor High-Risk HPV. Zajistěte přidání správného objemu DNR.

Poznámka: Objem přidané DNR je roven polovině objemu kapaliny ve zkumavce.

Tabulka 9. Přídavek DNR

Kalibrátor, kontrola kvality nebo vzorek STM	Požadovaný objem DNR
Negativní kalibrátor, 2 ml	1000 µl
Kalibrátor High-Risk HPV, 1 ml	500 µl
Kalibrátor High-Risk HPV, 2 ml	1000 µl
Kontrola kvality Low-Risk HPV nebo High-Risk HPV, 1 ml	500 µl
Vzorky STM, 1 ml	500 µl

3. Promíchejte zkumavky buď v třepačce MST Vortexer 2 nebo využijte ruční metodu protřepávání jednotlivých zkumavek.

Metoda MST Vortexer 2

- a. Zakryjte zkumavky těsnicí fólií zkumavek DuraSeal přetažením fólie přes zkumavky ve stojanu vzorků.
- b. Umístěte víko stojanu nad zkumavky zakryté fólií a zajistěte na místě 2 bočními svorkami. Řezacím zařízením odřízněte fólii.
- c. Dejte páku s červenou rukojetí do polohy UP tak, aby byla ve vodorovné poloze.

- d. Umístěte stojan vzorků bezpečně ve vodicích kolejnicích na třepačce MST Vortexer 2 a roh s největším zářezem stojanu umístěte do pravého předního rohu. Stojánek na vzorky zajistěte přesunutím páky s červenou rukojetí do polohy „dole“, aby byla ve svislé poloze.
- e. Dbejte na nastavení rychlosti na 100 (maximální rychlost) a napájení na ON na třepačce MST Vortexer 2.
- f. Zkumavky protřepávejte 10 sekund.
- g. VYPNĚTE třepačku MST Vortexer 2.
- h. Vyjměte stojan vzorků ze třepačky MST Vortexer 2 přesunutím páky s červenou rukojetí do polohy nahoru.

Ruční metoda protřepávání jednotlivých zkumavek.

- a. Znovu uzavřete zkumavky snovými vzorky šroubovacími krytkami odběrových zkumavek.
- b. Každou zkumavku jednotlivě důkladně promíchejte v třepačce při vysoké rychlosti po 5 sekund.

Důležité upozornění: Během míchání musíte pozorovat viditelný vír kapaliny, který obmývá celý vnitřní povrch zkumavky.

- c. Jednou obraťte zkumavku dnem vzhůru, aby se omyl vnitřek zkumavky, krytka a okrajový lem.
- d. Vraťte zkumavku do stojanu.

Kapalina ve zkumavce by měla získat fialovou barvu.

4. Inkubujte zkumavky ve stojanu ve vodní lázni při $65 \pm 2^\circ\text{C}$ po 45 ± 5 minut.

Pro ruční testování připravte Probe Mix (směs sond) během této inkubace (viz „Směs sond“, strana 36).

5. Vyjměte zkumavky z vodní lázně po inkubaci.

Pokud používáte stojan vzorků, nenechte je ochladnout předtím, než odstraníte víko stojanu. Ihned pokračujte testováním nebo odstraňte víko stojanu a těsnicí fólii zkumavky DuraSeal.

Poznámka: Pokud stojan zkumavek chladne, zkumavky se mohou přilepit k víku stojanu a následně se rozlít:

- uchovávány (viz „Volitelný zastavovací bod připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath“ strana 49)
- neprodleně testovány (viz „Hybridizace připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath“ strana 49)

Volitelný bod pro zastavení připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet


Důležité upozornění: Denaturované vzorky neuchovávejte na suchém ledu

Všechny připravené vzorky včetně kalibrátorů a kontrol kvality lze uchovávat při 2–8°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.

Při uchovávání přes noc při 2–8°C ve stojanu vzorků zakryjte vzorky těsnicí fólií zkumavek DuraSeal a vraťte zpět víko stojanu.

Pro uchovávání při –20°C ve stojanu vzorků odeberte víko stojanu a těsnicí fólii zkumavek DuraSeal a na zkumavky dejte vhodné krytky.

Hybridizace připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet

 Při provádění automatického testování RCS vzorků STM nebo ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet dokončete testy podle pokynů v příručce k systému RCS (*Rapid Capture System User Manual*).

Pokud byly denaturované kalibrátory, kontroly kvality nebo vzorky uloženy, nechte je vytemperovat na teplotu 20–25 °C, a pokud byly uloženy ve stojanu vzorků, vyjměte a zlikvidujte uzávěry zkumavek.

- Hybridizace připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath z post-Pro vzorky STM a ručně připravené vzorky PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet jsou k dispozici dvě hybridizační metody: „Hybridizace pomocí mikrodestičky a ohřívače Microplate Heater I“ a „Hybridizace pomocí mikrozkušavek a vodní lázně“.
- Vzorky STM denaturované v třepačce MST Vortexer 2 musí používat metodu „Hybridizace pomocí mikrodestičky a ohřívače Microplate Heater I“ popsanou na straně 50. Metoda „Hybridizace pomocí mikrozkušavek a vodní lázně“ (strana 51) nebyla validována se vzorky STM denaturovanými v třepačce MST Vortexer 2.

- Probe Mix (směs sond) je viskózní. Dbejte na to, aby byla Probe Mix (směs sond) důkladně promíchána a aby bylo požadované množství zcela dodáno do každé jamky hybridizační mikrodestičky nebo hybridizační mikrozkušavky.
- Při přenosu vzorku do hybridizační mikrodestičky nebo hybridizační mikrozkušavky nesmí dojít ke kontaktu s bohy jamek hybridizační mikrodestičky nebo hybridizačních mikrozkušavek, protože může dojít k falešně pozitivním výsledkům, pokud vzorky nebudou přeneseny opatrně. Zamezte tvorbě vzduchových bublin. Používejte čistý, velmi dlouhý pipetový hrot pro každý přenos, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.

Hybridizace pomocí mikrodestičky a ohříváče Microplate Heater I

1. Opatřete si hybridizační mikrodestičku a označte ji.
2. Protřepávejte jednou z následujících metod:

Kalibrátory, kontroly kvality nebo vzorky STM pomocí třepačky MST Vortexer 2

- a. Bude-li to vhodné, zakryjte zkušavky těsnicí fólií zkušavek DuraSeal a zajistěte víko stojanu na stojanu vzorků.
- b. Protřepávejte stojan vzorků minimálně 5 sekund při nastavené maximální rychlosti.
- c. Neprodleně umístěte stojan vzorků na horní stranu laboratorního stolu a uvolněte západky. Zdvihněte víko stojanu přibližně o 1 cm a jemně jej přesuňte doleva a doprava, aby se uvolnily všechny zkušavky, které se mohly přilepit k těsnicí fólii zkušavek DuraSeal. Odstraňte víko stojanu zdvihnutím přímo nahoru, dokud se zcela neoddělí od stojanu vzorků.
- d. Opatrně odstraňte těsnicí fólii zkušavek DuraSeal z víka stojanu a zlikvidujte ji.

Vzorky PreservCyt nebo SurePath z post-gradientních buněčných pelet s třepačkou MST Vortexer 2

- a. Bude-li to vhodné, zakryjte zkušavky těsnicí fólií zkušavek DuraSeal a zajistěte víko stojanu na stojanu vzorků.
- b. Protřepávejte konverzní stojan Conversion Rack minimálně 10 sekund při nastavené maximální rychlosti.
- c. Neprodleně umístěte stojan vzorků na horní stranu laboratorního stolu a uvolněte západky. Zdvihněte víko stojanu přibližně o 1 cm a jemně jej přesuňte doleva a doprava, aby se uvolnily všechny zkušavky, které se mohly přilepit k těsnicí fólii zkušavek DuraSeal. Odstraňte víko stojanu zdvihnutím přímo nahoru, dokud se zcela neoddělí od stojanu vzorků.
- d. Opatrně odstraňte těsnicí fólii zkušavek DuraSeal z víka stojanu a zlikvidujte ji.

Jakýkoliv typ vzorku třepačkou

- a. Každou zkušavku individuálně protřepávejte nejméně 5 sekund.

3. Pipetou EXPAND-4 nebo jednonálovou pipetou s velmi dlouhým pipetovým hrotem převedte 75 µl kalibrátoru, kontroly kvality nebo vzorku jednotlivě na dno prázdné jamky hybridizační mikrodestičky podle vytvořeného rozvržení desky.

Pokud budou vzorky ukládány, uzavřete denaturované kalibrátory, kontroly kvality a vzorky STM novými šroubovacími krytkami zkumavek pro odběr vzorků a na jednotlivé vzorky PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet umístěte původní krytku.
Poznámka: Vzorky uchovávejte podle omezení podrobně popsanych v „Volitelný zastavovací bod připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath“.
4. Po přenesení posledního vzorku zakryjte hybridizační mikrodestičku víkem mikrodestičky a inkubujte 10 minut při 20–25°C.
5. Probe Mix (směs sond) důkladně protřepejte a v alikvotním množství převedte do nádoby reagentie na jedno použití.
6. Opatrně pipetujte 25 µl Probe Mix (směs sond) do každé jamky hybridizační mikrodestičky pomocí 8kanálové pipety a nových hrotů pro každý přírůvek Probe Mix.

Zabraňte zpětnému rozstřikování a kontaktu s bočními stěnami jamek hybridizační mikrodestičky.
7. Zakryjte hybridizační mikrodestičku víkem mikrodestičky a protřepávejte 3 ± 2 minuty na rotační třepačce Rotary Shaker I nastavené na 1.100 ± 100 ot/min.

Po protřepání by kalibrátory, kontroly kvality, vzorky STM a vzorky SurePath měly zežloutnout a vzorky PreservCyt by měly zruřžovět.

Vzorky, které zůstanou fialové, možná neobdržely správné množství Probe Mix (směs sond). Přidejte dalších 25 µl Probe Mix (směs sond) ke vzorkům, které zůstanou fialové a znovu je protřepte. Pokud vzorek zůstane fialový po provedení tohoto postupu, vzorek otestujte znovu.
8. Umístěte mikrodestičku do ohříváče Microplate Heater I vytemperovaného na teplotu 65 ± 2°C, dbejte na to, aby nedocházelo k rozstřikování. Inkubujte hybridizační mikrodestičku 60 ± 5 minut.
9. Pro pokračující testování přistupte k „Záchyt hybridu,“ strana 53.

Hybridizace pomocí mikrozkuavek a vodní lázně

1. Do stojanu mikrozkuavek umístěte požadovaný počet čistých hybridizačních mikrozkuavek a označte je.
2. Protřepejte jednotlivě každý kalibrátor, kontrolu kvality a zkumavku vzorků nejméně 5 sekund před vyjmutím vzorku.

3. Jednokanálovou pipetou s velmi dlouhým pipetovým hrotem převedte 75 µl kalibrátoru, kontroly kvality nebo vzorku jednotlivě na dno mikrozkušavky příslušné hybridizační mikrodestičky podle vytvořeného rozvržení desky.

Pokud budou vzorky ukládány, uzavřete denaturované kalibrátory, kontroly kvality a vzorky STM novými šroubovacími krytkami zkumavek pro odběr vzorků a na jednotlivé vzorky PreservCyt a SurePath z post-gradientních buněčných pelet umístěte původní krytku.

Poznámka: Vzorky uchovávejte podle omezení podrobně popsanych v „Volitelný zastavovací bod připravených vzorků STM a ručně připravených vzorků PreservCyt a SurePath,“ strana 49.

4. Po převedení posledního vzorku inkubujte hybridizační mikrozkušavky 10 minut při 20–25°C.
5. Probe Mix (směs sond) důkladně protřepejte a v aliquotním množství převedte do nádobky reagentie na jedno použití.
6. Opatrně pipetujte 25 µl Probe Mix (směs sond) do každé hybridizační mikrozkušavky pomocí 8kanálové pipety a nových hrotů pro každou řadu.

Zabraňte zpětnému rozstříkávání a kontaktu s bočními stěnami jamek hybridizačních mikrozkušavek.

Zkontrolujte zespodu stojan, aby bylo zajištěno, že všechny hybridizační mikrozkušavky dostaly správné množství Probe Mix (směs sond).

7. Hybridizační mikrozkušavky zakryjte těsněním desky. Na horní stranu stojanu dejte kryt stojanu. Stojan mikrozkušavek protřepávejte 3 ± 2 minuty na rotační třepačce Rotary Shaker I nastavené na 1.100 ± 100 ot/min.

Po protřepání by kalibrátory, kontroly kvality, vzorky STM a vzorky SurePath z post-gradientních buněčných pelet měly zežloutnout a vzorky PreservCyt by měly zrůžovět.

Vzorky, které zůstanou fialové, možná neobdržely správné množství Probe Mix (směs sond). Přidejte dalších 25 µl Probe Mix (směs sond) ke vzorkům, které zůstanou fialové a znovu je protřepte. Pokud vzorek zůstane fialový po provedení tohoto postupu, vzorek otestujte znovu.

8. Stojan mikrozkušavek inkubujte 60 ± 5 minut ve vodní lázni při 65 ± 2°C.

Zajistěte, aby ve vodní lázni byla dostatečná hladina vody na zakrytí celého objemu hybridizační mikrozkušavky.

Poznámka: Stojan mikrozkušavek bude ve vodní lázni plavat.

9. Pro pokračující testování přistupte k „Záchyt hybridu,“ strana 53.

Záchyt hybridu

1. Kromě požadovaného počtu jamek záchytové mikrodestičky z rámu desky všechny odstraňte.
2. Vraťte nepoužité jamky záchytové mikrodestičky do původního obalu a znovu je uzavřete.
3. Značkovačem popište jeden po druhém každý sloupec a označte vhodným identifikátorem záchytovou mikrodestičku.

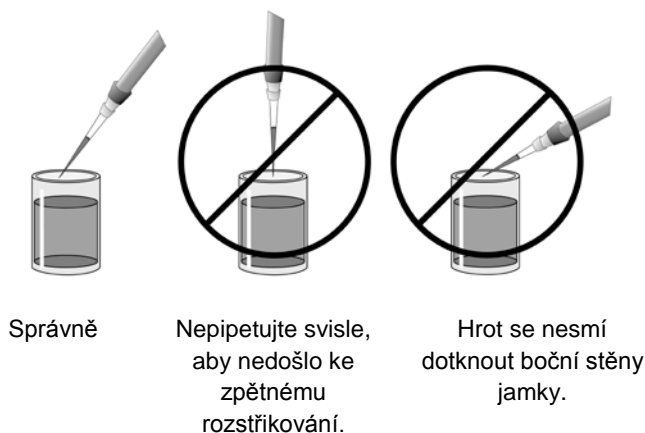
Vzorky budou přidávány do jamek záchytové mikrodestičky podle vytvořeného rozvržení desky.

4. Opatrně vyjměte hybridizační mikrodestičku z ohřívače Microplate Heater I nebo ze stojanu mikrozku mávek ve vodní lázni podle toho, co bude vhodné.

Okamžitě odstraňte víko mikrodestičky a uložte jej na čistý povrch nebo odeberte víko stojanu a pomalu vytáhněte těsnění desky nahoru a přes stojan mikrozku mávek.

5. 8kanálovou pipetou převedte celý obsah (přibližně 100 μ l) jamek hybridizační mikrodestičky nebo hybridizačních zku mávek na dno odpovídajících jamek záchytové mikrodestičky.

Použijte nové pipetové hroty pro každý přenos a nechte každý pipetový hrot vypustit, aby bylo jisté, že došlo k úplnému přenosu vzorku. Pokud to bude žádoucí, pipetu je možné stabilizovat umístěním středu hrotů pipety na horním okraji jamek záchytové mikrodestičky (viz Obrázek 2, níže).



Obrázek 2. Správné pipetování.

6. Zakryjte záchytovou mikrodestičku víkem mikrodestičky nebo novým těsněním desky a protřepávejte 60 \pm 5 minut na rotační třepače Rotary Shaker I při 1.100 \pm 100 ot/min při 20–25°C.

Připravte Wash Buffer (promývací pufr) během této inkubace (viz „Promývací pufr,“ strana 37).

7. Jakmile bude inkubace dokončená, vyjměte záchytovou mikrodestičku z rotační třepačky Rotary Shaker I a opatrně odstraňte víko mikrodestičky nebo těsnění desky.
8. Odstraňte víko z jamek záchytové mikrodestičky tím, že jej dáte do výlevky, zcela obraťte záchytovou mikrodestičku nad výlevkou dnem vzhůru a intenzivně třepejte směrem dolů.

Důležité upozornění: Mikrodestičku neobracejte dnem vzhůru.

Dbejte na to, aby nedocházelo k odstříkování, pokud bude dekantace příliš blízko dna výlevky.

9. 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 záchytové mikrodestičky a horní strana záchytové mikrodestičky byla suchá.

10. Přistupte k „Detekce hybridu,“ strana 55 a pokračujte v testování.

Detekce hybridu

- Přidávky reagensů provádějte napříč záchytovou mikrodestičkou zleva d oprava za použití 8kanálové pipety. Otfete hroty nad jednorázovou nádobkou reagensů, abyste odstranili přebytečnou reagensii před dodávkou do mikrodestičky.
 - Pokud se 8kanálová pipeta nepoužívá, můžete ji nahradit opakovací pipetou. Přidejte alikvotní množství DR1 do polypropylénové zkumavky dostatečné velikosti, která požadovaný objem pojme.
 - Doporučuje se použití techniky reverzní pipetace, aby se zlepšila konzistence dávkování reagensie. Postup je popsán níže.
 - Pokud je to žádoucí, pipetu lze stabilizovat opřením středu hrotů pipet o horní okraj jamek záchytové mikrodestičky. Dbejte na to, abyste se nedotkli boků jamek záchytové mikrodestičky, protože by mohlo dojít ke křížové kontaminaci vzorků (viz Obrázek 2, strana 53).
1. Důkladně promíchejte DR1 a opatrně převádějte příslušný do čisté jednorázové nádoby na reagensie.
 2. Opatrně pipetujte 75 µl DR1 do každé jamky záchytové mikrodestičky technikou reverzního pipetování následujícím způsobem:
 - a. Připojte hroty na 8kanálovou pipetu; dbejte na to, aby byly všechny hroty pevně nasazeny.
 - b. Zatláče píst pipety za první zarážku směrem k druhé zarážce.
 - c. Ponořte hroty do reagensie.
 - d. Pomalu uvolňujte píst a nechte reagensii, aby zaplnila hroty.
 - e. Dávkujte reagensii do jamek mikrodestičky přitlačením pístu k první zarážce. Neuvolňujte píst, dokud nebudou hroty pipety ponořeny do reagensie.
 - f. Znovu naplňte hroty a opakujte, dokud nebudou naplněny všechny jamky mikrodestičky.
- Dbejte na to, aby všechny jamky záchytové mikrodestičky byly naplněny na základě pozorování intenzity růžové barvy. Všechny jamky záchytové mikrodestičky by měly mít podobnou růžovou intenzitu.
3. Záchytovou mikrodestičku zakryjte víkem mikrodestičky, čistou fólií Parafilm nebo ekvivalentní a inkubujte 30–45 minut při 20–25°C.
 4. Přistupte k „Promývání,“ strana 56 a pokračujte v testování.

Promývání

Promývejte záchytnou mikrodestičku pomocí jedné z následujících metod.

Metoda promývačky Automated Plate Washer

Promývačku Automated Plate Washer vždy mějte ZAPNUTÝ. Dbejte na to, aby byla oplachovací nádoba naplněná a odpadní nádoba prázdná. Promývačka Automated Plate Washer bude v rámci čištění rutinně oplachovat systém. Viz Automated Plate Washer Uživatelská příručka (*Automated Plate Washer User Manual*), kde naleznete dodatečné pokyny.

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Dbejte na to, aby promývací nádoba byla naplněna nejméně na značku 1 litru promývacím pufrům. Pokud ne, připravte promývací pufr (viz „Promývací pufr,“ strana 37).
 - 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 oplachováním po každém promývání.
 - Pokud se používá pouze část proužku jamek záchytné mikrodestičky, umístěte prázdné jamky mikrodestičky do záchytné mikrodestičky, aby se před promýváním dokončil sloupec.
1. Odeberte víko mikrodestičky a umístěte záchytnou mikrodestičku na platformu promývačky Automated Plate Washer.
 2. Ujistěte se, že je automatická promývačka desky zapnutá a na displeji se zobrazuje zpráva **Digene Wash Ready** (promývání digene připraveno) nebo **P1**.
 3. Stisknutím tlačítka **Rows** (řady) vyberte počet proužků, které se mají promývat, a poté upravte pomocí **+** nebo **-**.
 4. Stisknutím tlačítka **Rows** se vrátíte ke zprávě **Digene Wash Ready** nebo **P1**.
 5. Stisknutím tlačítka **Start/Stop** začnete.

Promývačka Automated Plate Washer provede 6 cyklů plnění a odsávání, což bude přibližně trvat 10 minut. Během programu nastane krátká přestávka, neodstraňujte mikrodestičku předčasně.

Jakmile promývačka Automated Plate Washer dokončí promývání, na displeji se objeví „Digene Wash Ready“ nebo „P1“.

6. Po skončení programu vyjměte záchytovou mikrodestičku z platformy promývačky Automated Plate Washer.
Záchytová mikrodestička by měla být bílá a v jamkách záchytové mikrodestičky by neměla zůstat žádná zbytková růžová kapalina.
7. Přistupte k „Amplifikace signálu,“ strana 58 a pokračujte v testování.

Metoda ručního promývání

1. Odstraňte DR1 z jamek záchytové mikrodestičky tím, že položíte čisté utěrky Kimtowels nebo ekvivalentní papírové ručníky, které neuvolňují vlákna na horní stranu záchytové mikrodestičky.
2. Dbejte na to, aby byly papírové ručníky ve styku s celou plochou povrchu záchytové destičky, a opatrně ji obraťte dnem vzhůru.
3. Nechte záchytovou destičku vysoušet 1–2 minuty.
4. Dobře odsajte vodu čistými utěrkami Kimtowels nebo ekvivalentními papírovými ručníky, které neuvolňují vlákna.
Opatrně zlikvidujte použité papírové ručníky, aby nedošlo ke kontaminaci alkalickou fosfatázou.
5. Použijte promývací přístroj a ručně záchytovou destičku 6krát promyjte.
Pro správné promytí každou jamku záchytové mikrodestičky důkladně opláchněte promývacím puřem. Tím se odstraní DR1 z horních stran jamek záchytové mikrodestičky. Promývání začíná v jamce A1 záchytové mikrodestičky a pokračuje klikatě doprava a dolů. Po naplnění všech záchytových mikrodestiček dekantujte kapalinu do výlevky silným pohybem směrem dolů. Druhé promývání začíná v jamce H12 záchytové mikrodestičky klikatě doleva a nahoru. Tato sekvence 2 promývání se opakuje 2krát, až na jednu jamku záchytové mikrodestičky připadá 6 promývání.
6. Po promytí vysušte záchytovou mikrodestičku otočením dnem vzhůru a položením na čisté utěrky Kimtowels nebo ekvivalentní papírové ručníky, které neuvolňují vlákna, a důrazně na ni 3–4krát poklepejte. Papírové ručníky vyměňte a znovu vysoušejte.
7. Nechte záchytovou destičku otočenou dnem vzhůru a nechte ji schnout 5 minut.
Záchytovou mikrodestičku osušte ještě jednou.
Záchytová mikrodestička by měla být bílá a v jamkách záchytové mikrodestičky by neměla zůstat žádná zbytková růžová kapalina.
8. Přistupte k „Amplifikace signálu,“ strana 58 a pokračujte v testování

Amplifikace signálu

- K manipulaci s DR2 použijte nový pár rukavic.
 - Přídavky reagensů provádějte napříč záchytovou mikrodestičkou zleva d oprava za použití 8kanálové pipety.
 - Pokud se 8kanálová pipeta nepoužívá, můžete ji nahradit opakovací pipetou. Přidejte alikvotní množství DR2 do polypropylénové zkumavky dostatečné velikosti, která požadovaný objem pojme.
 - Přidejte DR2 bez přerušení. Inkubační doba všech jamek záchytové mikrodestičky musí být co nejpodobnější.
 - Dbejte na to, abyste se nedotkli boků jamek záchytové mikrodestičky a reagensie nesmí stříkat na hroty, protože by mohlo dojít ke křížové kontaminaci vzorků (viz Obrázek 2, strana 53).
1. Důkladně promíchejte DR2 a převedte příslušný objem (jak je to vhodné, viz Tabulka 1, strana 33, **Error! Bookmark not defined.** nebo Tabulka 4, strana 34) do čisté jednorázové nádoby na reagensie.
 2. Opatrně pipetujte 75 µl DR2 do každé jamky záchytové mikrodestičky technikou reverzního pipetování již dříve popsanou (viz „Detekce hybridu,“ strana 55).
Dbejte na to, aby všechny jamky záchytové mikrodestičky byly naplněny na základě pozorování intenzity žluté barvy; všechny jamky záchytové mikrodestičky by měly mít podobnou žlutou intenzitu.
 3. Záchytovou mikrodestičku zakryjte víkem mikrodestičky a inkubujte 15 minut při 20–25°C (inkubace nemá být delší než 30 minut).
Důležité upozornění: Chraňte před přímým slunečním světlem.
 4. Přistupte k „Měření záchytové mikrodestičky a generování výsledků,“ strana 59 a pokračujte v testování.

Měření záchytové mikrodestičky a generování výsledků

1. Měření záchytové mikrodestičky přístrojem DML.

Viz příslušná příručka uživatele softwaru, kde naleznete podrobnosti o měření záchytové mikrodestičky a generování zpráv s výsledky testu. Software pro analýzu rozborů *digene* umožní zadávat platné informace o testu.

2. Pokud nebyla použita celá záchytová mikrodestička, odstraňte použité jamky záchytové mikrodestičky z rámu mikrodestičky, rám mikrodestičky důkladně opláchněte destilovanou nebo deionizovanou vodou, osušte a rezervujte pro další test.

3. Zlikvidujte všechna alikvotní množství reagentie a připravené reagentie, pokud není uvedeno jinak.

Rozředte zbývající DNR v lahvi před likvidací podle národních a místních laboratorních postupů.

Interpretace výsledků

Hodnota CO 1 pg/ml testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA je ekvivalentní 100 000 kopií/ml viru HPV nebo 5 000 kopií HPV na analýzu.

Výsledky testování vzorků STM

Vzorky STM s hodnotou RLU/CO $\geq 1,0$ se považují za „pozitivní“ („positive“) pro jeden či více typů HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.

Vzorky STM s hodnotou RLU/CO $< 1,0$ se považují za „negativní“ („negative“) nebo „DNA HPV nezjištěna“ („no HPV DNA detected“) pro 13 testovaných typů HPV. Sekvence DNA vysoce rizikového HPV buď nejsou přítomny, nebo jsou hladiny DNA HPV pod mezí detekce testu.

Výsledky testování vzorků SurePath

Vzorky SurePath s hodnotou RLU/CO $\geq 1,0$ se považují za „pozitivní“ („positive“) pro jeden či více typů HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.

Vzorky SurePath s hodnotou RLU/CO $< 1,0$ se považují za „negativní“ („negative“) nebo „DNA HPV nezjištěna“ („no HPV DNA detected“) pro 13 testovaných typů HPV. Sekvence DNA HPV buď nejsou přítomny, nebo jsou hladiny DNA HPV pod mezí detekce testu.

Výsledky testování vzorků PreservCyt

Vzorky PreservCyt s hodnotou RLU/CO $\geq 1,0$ se považují za „pozitivní“ („positive“) pro jeden či více typů HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.

Vzorky PreservCyt s hodnotou RLU/CO $< 1,0$ se považují za „negativní“ („negative“) nebo „DNA HPV nezjištěna“ („no HPV DNA detected“) pro 13 testovaných typů HPV. Sekvence DNA HPV buď nejsou přítomny, nebo jsou hladiny DNA HPV pod mezí detekce testu.

U vzorků PreservCyt s hodnotou RLU/CO $\geq 1,0$ a $< 2,5$ QIAGEN doporučuje provést jejich retest následujícím způsobem:

- Jestliže je první retest RLU/CO $\geq 1,0$, hlase vzorek jako „pozitivní“ („positive“). Žádné další testování není nutné.
- Jestliže je první retest RLU/CO $< 1,0$, je nutný druhý retest (třetí výsledek). Druhý výsledek je konečným výsledkem ($< 1,0$ je negativní, $\geq 1,0$ je pozitivní) a hlásí se.

Hodnota RLU/CO blízka 1,0

Pokud je hodnota RLU/CO vzorku blízka, ale menší než 1,0 a je podezření na infekci vysoce rizikovým HPV, zvažte alternativní metody testování a/nebo opakování vzorku.

Jiné typy HPV

Protože tato analýza detekuje pouze vysoce rizikové typy HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68, nezapomeňte, že ve vzorku mohou být přítomny i jiné typy nízko rizikových HPV. Pokud se provádí testování specificky na přítomnost pohlavně přenášeného nízko rizikového HPV, použijte test digene HC2 HPV DNA, který detekuje DNA nízko rizikových a vysoce rizikových typů HPV

Ověření kalibrace analýzy

Ověření kalibrace analýzy se provádí s cílem zajistit, že reagentie, kalibrátory a kontroly kvality fungují řádně a umožňují přesné stanovení CO analýzy. Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA vyžaduje kalibraci analýzy v rámci každého testu; proto je nezbytné každou analýzu ověřit. Tento ověřovací postup není určen jako náhrada za vnitřní testování kontroly kvality. Přijatelné rozsahy pro kalibraci analýzy a kontroly kvality byly stanoveny pouze pro přístroje DML schválené společností QIAGEN.

Kalibraci analýzy provádí automaticky software pro analýzu rozborů *digene* a tiskne zprávu s analýzou dat. Ovšem uživatelé softwaru *digene* Qualitative Software verze 1.03 nebo starší musí provádět ověření kalibrace analýzy ručně předtím, než bude možné vykazovat výsledky pacienta. Více informací Vám poskytnou technické služby QIAGEN.

Test musí splňovat stanovená kritéria kalibrace analýzy. Pokud bude kterékoliv z následujících kritérií neplatné, software nebude výsledky vzorků interpretovat.

Negativní kalibrátor

NC musí být s každým testem zkoušen třikrát. Průměr NC musí být v rozmezí ≥ 10 až ≤ 250 RLU a variační koeficient (CV) musí být ≤ 25 %. Pokud bude CV > 25 %, software odstraní hodnotu RLU nejdále od průměru jako odlehlou hodnotu a průměr a CV přepočítá pomocí zbývajících hodnot.

Pokud CV zůstane >25 %, kalibrace analýzy bude neplatná a test se musí pro všechny vzorky pacienta zopakovat. V takovém případě výsledky vzorků pacienta nehlaste.

Pozitivní kalibrátor

HRC musí být s každým testem zkoušen třikrát. CV HRC musí být ≤15 %. Pokud bude CV >15%, software odstraní hodnotu RLU nejdále od průměru jako odlehlou hodnotu a průměr a CV přepočítá pomocí zbývajících hodnot.

Pokud CV zůstane >15%, kalibrace analýzy bude neplatná a test se musí pro všechny vzorky pacienta zopakovat. V takovém případě výsledky vzorků pacienta nehlaste.

Průměr pozitivního kalibrátoru/průměr negativního kalibrátoru

Software používá $HRC\bar{X}$ a $NC\bar{X}$ pro výpočet $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Platný $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ je definován jako $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$. Pokud bude $HRC\bar{X}/NC\bar{X} < 2,0$ nebo > 15 , kalibrace analýzy bude neplatná a test se musí pro všechny vzorky pacienta zopakovat. V takovém případě výsledky vzorků pacienta nehlaste.

Výpočet hraniční hodnoty

Software pro analýzu rozborů digene vypočítá a bude hlásit RLU/CO a pozitivní/negativní výsledky pro všechny vzorky. CO pro stanovení pozitivních vzorků je $HRC\bar{X}$. Software pro analýzu rozborů digene používá hodnoty RLU vzorků k vyjádření výsledků jako RLU/CO vzorku.

Pro automatické testování RCS používá protokol analýzy RCS HPV koeficient pro úpravu kalibrace (CAF) 0,8 pro platný $HRC\bar{X}$. Tento CAF je nezbytný, aby charakteristiky chování automatického testování RCS zůstaly ekvivalentní vůči ručnímu testování. CAF se používá pouze pro výsledky automatického testu RCS, proto je zásadně důležité zvolit správný protokol analýzy pro generování přesných výsledků testů

Kontroly kvality

Vzorky kontroly kvality se dodávají s testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a musí se používat pro vnitřní kontrolu kvality. Dodávané kontroly kvality jsou naklonované cíle DNA HPV a nejsou odvozeny z HPV divokého typu. Je to stejný typ materiálu používaný pro dodávané kalibrátory. Dodatečné kontroly kvality lze testovat podle směrnic či požadavků národních či místních předpisů nebo akreditačních organizací. Dodávané kontroly kvality nebudou působit

jako vhodná kontrola kvality pro zpracování roztoku PreservCyt nebo konzervační kapaliny SurePath.

Pokyny pro zadávání čísla šarží a dat použitelnosti kontrol kvality naleznete v příslušné uživatelské příručce softwaru *digene* pro analýzu rozboru. Pokud má být analýza platná, RLU/CO každé kontroly kvality musí spadat do definovaných kritérií, jak jsou uvedena v následující tabulce 10. Pokud kontroly kvality do těchto rozsahů nespádají, analýza je neplatná a test se musí opakovat. V takovém případě výsledky pacienta nehlase.

Tabulka 10. Kritéria validity analýzy kontroly kvality

Kontrola kvality	Minimum (RLU/CO)	Maximum (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Omezení

- Test digene HC2 High-Risk HPV DNA pro typy HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68 se nedoporučuje pro hodnocení podezření na pohlavní zneužívání.
- Prevalence infekce HPV v populaci může nepříznivě ovlivnit výsledky. Pozitivní prediktivní hodnoty klesají při testování populací s nízkou prevalencí nebo jednotlivců bez rizika infekce.
- Negativní výsledek testu nevylučuje infekci HPV, protože velmi nízké hladiny infekce nebo chyba při odběru vzorku mohou způsobit falešně negativní výsledek testu. Tento test rovněž nedetekuje DNA nízkorizikových typů HPV (6, 11, 42, 43 a 44).
- Infekce HPV není definitivním ukazatelem přítomnosti cervikálního onemocnění vysokého stupně ani z ní nepřímo nevyplývá ve všech případech, že dojde ke vzniku cervikálního onemocnění vysokého stupně nebo nádorového onemocnění.
- Mezi sondou vysoce rizikového HPV a typy HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 a MM9 existuje křížová hybridizace v malém množství. Pacienti se vzorky obsahujícími vysoké hladiny těchto typů HPV mohou být nesprávně doporučení na kolposkopii (15, 35).
- Test digene HC2 High-Risk HPV DNA je navržen k detekci typů vysoce rizikového HPV, včetně 39, 58, 59 a 68. Analytické studie provedené společností QIAGEN pomocí plazmidové DNA klonovaného HPV prokázaly, že test detekuje tyto typy v koncentracích od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml. To je ekvivalentní charakteristikám detekce jiných typů HPV, které jsou cílem testu digene HC2 High-Risk HPV DNA. Společnost QIAGEN dokázala validovat detekci těchto typů HPV pouze u omezeného počtu klinických vzorků. Díky nízké prevalenci těchto typů v celkové populaci (28) charakteristiky chování testu digene HC2 High-Risk HPV DNA pro detekci typů HPV 39, 58, 59 a 68 nebyly statisticky potvrzeny.
- Pokud jsou přítomny vysoké koncentrace antifungálního krému, antikoncepčního gelu nebo výplachu v době odběru vzorku STM pro testování, je pravděpodobné, že získání falešně negativního výsledku by měly tyto vzorky obsahovat hladiny DNA HPV, které přináší hodnoty RLU/CO v blízkosti CO analýzy.
- Pokud jsou přítomny vysoké koncentrace vaginálního lubrikačního krému nebo krve v době odběru cervikálního vzorku PreservCyt pro přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media, je pravděpodobné, že získáte falešně negativní výsledek, pokud by tyto vzorky obsahovaly hladiny DNA HPV, které přináší hodnoty RLU/CO v blízkosti CO analýzy.
- Pokud je v době odběru cervikálního vzorku PreservCyt přítomen antikoncepční gel pro přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA, výsledkem může být falešně negativní výsledek testu.

- Pokud je v době odběru cervikálního vzorku SurePath, který bude zpracován pomocí sady QIAasymphony DSP HPV Media, zde přítomen antikoncepční gel nebo antifungální či protizánětlivý krém, výsledkem testu může být falešná negativita.
- Je možná zkřížená reaktivita mezi sondou High-Risk HPV Probe 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.
- Při automatickém testování RCS může nemožnost vizuálně pozorovat hybridizační destičku na zajištění správného přenosu vzorku a nemožnost opravit jakýkoliv neadekvátní přenos vzorku vést k falešně negativním výsledkům.

Charakteristiky chování

Klinické chování při screeningu pacientek s normálními výsledky stěru z děložního čípku jakožto pomůcka při hodnocení rizika při léčbě pacientek

Výsledky 8 nezávislých klinických studií prováděných prominentními lékařskými, akademickými a vládními institucemi na centrech ve Spojených státech a v zahraničí jsou popsány níže. Studie využívaly zavedené metody stěru z děložního čípku při použití v zemích, kde se studie prováděly. Ve všech kromě 2 byl využit systém hodnocení Bethesda Grading System pro výklad výsledků stěru z děložního čípku. Pokud jde o ekvivalentní terminologii screeningu cervikálního nádorového onemocnění v Evropském společenství viz European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (36). 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 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. Dvě studie byly prováděny ve Spojených státech, 2 v Evropě, 2 v Latinské Americe, jedna v Africe a jedna v Asii.

Chování testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pozorované v 6 průřezových studiích je shrnuta (viz tabulky 11 a 12 níže) 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 (CIN) 3 nebo závažnější.

Tabulka 11. Odhady chování — citlivost a specifická

Populace	n	Citlivost (%) (n/N)			Specifická (%) (n/N)		
		95 % interval spolehlivosti (CI)					
		Samotný stěr děložního čípku	Samotný HPV	HPV + stěr děložního čípku	Samotný stěr děložního čípku	Samotný HPV	HPV + stěr děložního čípku
		95 % CI		95 % CI		95 % CI	
Západní Evropa 1	7592	51.6 (14/27) 32.0–71.3	96.3 (26/27) 81.0–99.9	100.0 (27/27) 87.2–100.0	98.5 (7453/7565) 98.2–98.8	96.2 (7275/7565) 95.7–96.6	95.1 (7193/7565) 94.6–95.6
Latinská Amerika 1	6115	58.4 (45/77) 46.68–69.6	94.8 (73/77) 87.2–98.6	97.4 (75/77) 90.9–99.7	98.7 (5962/6038) 98.4–99.0	93.9 (5669/6038) 93.3–94.5	93.4 (5637/6038) 92.7–94.0
Latinská Amerika 2*	6176	77.9 (53/68) 66.2–87.1	89.7 (61/68) 79.9–95.8	94.1 (64/68) 85.6–98.4	94.1 (5745/6108) 93.4–94.6	94.0 (5742/6108) 93.4–94.6	89.9 (5490/6108) 89.1–90.6
Afrika	2925	84.1 (90/107) 75.8–90.5	89.7 (96/107) 82.4–94.8	92.5 (99/107) 85.8–96.7	86.4 (2436/2818) 85.1–87.7	80.0 (2253/2818) 78.4–81.4	76.4 (2152/2818) 74.8–77.9
Asie	1936	97.6 (41/42) 87.4–99.9	100.0 (42/42) 91.6–100.0	100.0 (42/42) 91.6–100.0	76.3 (1445/1894) 74.3–78.2	83.0 (1572/1894) 81.2–85.0	68.0 (1287/1894) 65.8–70.1
USA 1	1040	50.0 (1/2) 1.26–98.7	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	97.6 (1013/1038) 96.5–98.4	96.2 (999/1038) 94.9–97.3	95.5 (991/1038) 94.0–96.7

* Data testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byla k dispozici, data HCS byla použita jinak, spojená data.

Tabulka 12. Odhady výkonnosti — pozitivní a negativní prediktivní hodnota

Populace	n	Prevalence (%) CIN 3	Pozitivní prediktivní hodnota (%)			Negativní prediktivní hodnota (%)		
			(n/N)			(n/N)		
			95 % CI			95 % CI		
			Samotný stěr děložního čípku	HPV + stěr děložního čípku	Samotný stěr děložního čípku	Samotný stěr děložního čípku	HPV + stěr děložního čípku	Samotný stěr děložního čípku
Západní Evropa 1	7592	0.36 (27/7592) 0.23–0.52	11.1 (14/126) 6.2–17.9	8.23 (26/316) 5.5–11.8	6.77 (27/399) 4.5–9.7	99.83 (7453/7466) 99.7–99.9	99.99 (7275/7276) 99.9–100.0	100.0 (7193/7193) 99.9–100.0
Latinská Amerika 1	6115	1.26 (77/6115) 0.99–1.57	37.2 (45/121) 28.6–46.4	16.5 (73/442) 13.2–20.3	15.8 (75/476) 12.6–19.4	99.47 (5962/5994) 99.3–99.6	99.93 (5669/5673) 99.8–100.0	99.96 (5637/5639) 99.9–100.0
Latinská Amerika 2*	6176	1.10 (68/6176) 0.86–1.39	12.7 (53/416) 9.7–16.3	14.3 (61/427) 11.1–18.0	9.4 (64/682) 7.3–11.8	99.74 (5745/5760) 99.6–99.9	99.88 (5742/5749) 99.8–100.0	99.93 (5490/5494) 99.8–100.0
Afrika	2925	3.66 (107/2925) 3.01–4.40	19.1 (90/472) 15.6–22.9	14.5 (96/661) 11.9–17.4	12.9 (99/765) 10.6–15.5	99.31 (2436/2453) 98.9–99.6	99.51 (2253/2264) 99.1–99.8	99.63 (2152/2160) 99.3–99.8
Asie	1936	2.17 (42/1936) 1.57–2.92	8.37 (41/490) 6.1–11.2	11.5 (42/364) 8.4–15.3	6.47 (42/649) 4.7–8.7	99.93 (1445/1446) 99.6–100.0	100.0 (1572/1572) 99.8–100.0	100.0 (1287/1287) 99.7–100.0
USA 1	1040	0.19 (2/1040) 0.02–0.69	3.85 (1/26) 0.1–19.6	4.88 (2/41) 0.6–16.5	4.08 (2/49) 0.5–14.0	99.90 (1013/1014) 99.5–100.0	100.0 (999/999) 99.6–100.0	100.0 (991/991) 99.6–100.0

* Data testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byla k dispozici, data HCS byla použita jinak, spojená data.

Napřič všemi studii je tu jednotné a často velmi signifikantní zlepšení citlivosti testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA vůči samotnému stěru z děložního čípku. Stejně jako u citlivosti překračuje negativní prediktivní hodnota HPV hodnotu stěru z děložního čípku samotného ve všech případech, blíží se 100 %. Tato negativní prediktivní hodnota prokazuje vysokou pravděpodobnost nepřítomnosti cervikálního onemocnění vysokého stupně nebo nádorového onemocnění u žen s normální cytologií, které nemají infekci HPV.

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 specifity 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 abnormálního stěru z děložního čípku,

věk při prvním pohlavním styku, počet sexuálních partnerů a souběžné pohlavně přenosné choroby (37, 38).

Přestože se prevalence onemocnění vysokého stupně nemění významně mezi studii, z nichž se výkonnost stanovovala, prevalence HPV infekce v populaci může nepříznivě ovlivnit výkonnost a typicky se v populaci pacientů mění. Kromě toho se ukázalo, že prevalence infekce HPV dramaticky klesala s věkem (17, 24–29, 38–40). Pozitivní prediktivní hodnoty klesají při testování populací s nízkou prevalencí nebo jednotlivců s malým rizikem infekce.

Byla provedena generační analýza pomocí výsledků ze 2 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 generační analýzy byly provedeny s cílem prokázat, že pacientky s negativním stěrem z děložního čípku/HPV negativní mají nižší riziko cervikálního onemocnění v porovnání s tradičně definovanými nízkorizikovými ženami, jejichž statut HPV není znám a v porovnání s pacientkami s negativním stěrem z děložního čípku/HPV negativními (viz tabulky 13 a 14 níže).

Tabulka 13. Generační analýza — relativní riziko onemocnění vysokého stupně

Studijní skupina	Věk	Klasifikace nízkého rizika	n	Případy CIN 3+	Míra výskytu (na 100 pacientko-roků)	Relativní riziko 95 % CI
NCI	30 let a starší	Stěr normální, HPV negativní	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Konzekutivní normální stěry*	9429	19	0.048	1.000
	Všechny	Stěr normální, HPV negativní	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Konzekutivní normální stěry*	13,392	44	0.082	1.000
Francie	30 let a starší	Stěr normální, HPV negativní	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Konzekutivní normální stěry†	2026	4	0.099	1.000
	Všechny	Stěr normální, HPV negativní	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Konzekutivní normální stěry†	2650	7	0.136	1.000

* Tři normální stěry z děložního čípku během přibližně 2 let.

† Dva normální stěry z děložního čípku během přibližně 2 let.

Tabulka 14. Generační analýza — míry výskytu onemocnění stratifikované podle stavu HPV ve výchozím stavu

Studijní skupina	Věk	Výchozí stav	n	Případy CIN 3+	Míra výskytu (na 100 pacientko-roků)	Relativní riziko 95 % CI
NCI	30 let a starší	Stěr normální, HPV pozitivní	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Stěr normální, HPV negativní	12,054	28	0.043	1.00
	Všechny	Stěr normální, HPV pozitivní	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Stěr normální, HPV negativní	17,594	48	0.056	1.00
Francie	30 let a starší	Stěr normální, HPV pozitivní	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Stěr normální, HPV negativní	1696	3	0.084	1.00
	Všechny	Stěr normální, HPV pozitivní	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Stěr normální, HPV negativní	2180	3	0.066	1.00

Klinické využití výsledku testu HPV je dále prokázáno zvýšeným rizikem cervikálního onemocnění u HPV pozitivních žen v porovnání s HPV negativními ženami.

Klinické chování při screeningu pacientek s výsledky stěru z děložního čípku ASC-US pro stanovení potřeby doporučení ke kolposkopii

Studie nazvaná “Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears” (Využití testování HPV DNA pro hodnocení žen s hraničními stěry z děložního čípku) byla provedena v USA v roce 1996 pod vedením Kaiser Foundation Research Institute (Výzkumný ústav Kaiserovy nadace) a Kaiser Permanente Medical Group (Kaiserova stálá lékařská skupina). Cervikální vzorky pro rutinní stěr z děložního čípku a pro test *digene* HC2 High-Risk 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 Screening (42). Ženy (15 let nebo starší) s výsledky stěry z děložního čípku v podobě atypických buněk nestanovené významnosti (ASC-US) se vrátily na kolposkopii a biopsii. Histologické vzorky určené pro kolposkopii byly zkoumány patologi a byla stanovena počáteční diagnóza. Každý histologický vzorek byl rovněž prohlédnut nezávislým patologem a rozdíly mezi výchozí kontrolou a nezávislou kontrolou zdůvodnil třetí patolog.

Výchozí vzorky byly testovány prototypem testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, který obsahoval sondy na 11 typů HPV ze 13 (s výjimkou typů HPV 59 a 68). Neočekávalo se, že by tento rozdíl vedl k významně odlišnému profilu chování testu.

Výsledky testu DNA vysoce rizikového HPV a histologické diagnózy byly k dispozici u 885 žen se stěry z děložního čípku ASC-US. Testování většiny pacientů bylo provedeno se vzorky odebranými jak v STM, tak roztoku PreservCyt. Vzhledem k podobnostem mezi charakteristikami účinnosti testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro STM a roztok PreservCyt je účinnost analýzy prezentována pouze pro roztok PreservCyt.

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 % (viz tabulka 15 níže).

Tabulka 15. Porovnání testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a konsenzuální histologie; populace s arbitrážním stěrem z děložního čípku ASC-US; studie Kaiser, vzorky PreservCyt

		HSIL nebo větší v době kolposkopie		Celkem
		+	–	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	–	5	497	502
Celkem		71	814	885

Citlivost [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 95 % CI = 84,3–97,7
 Specifická [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 95 % CI = 57,7–64,4
 Prevalence onemocnění = 8,0 % (71/885)
 Pozitivní prediktivní hodnota analýzy = 17,2 % (66/383)
 Negativní prediktivní hodnota analýzy = 99,0 % (497/502)

Stanovení teoretické pozitivní a negativní prediktivní hodnoty založené na různých prevalencích pro výchozí ASC-US, u něhož se zjistilo, že se jedná o HSIL nebo vyšší na základě výsledků testu vysoce rizikového HPV (viz tabulka 16 níže).

Tabulka 16. Teoretická pozitivní a negativní prediktivní hodnota testování vysoce rizikového HPV výsledků stěru z děložního čípku ASC-US

Teoretická prevalence pro HSIL	Výsledek výchozího stěru z děložního čípku ASC-US	
	Pozitivní prediktivní hodnota analýzy	Negativní prediktivní hodnota analýzy
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

Stanovení odchylky mezi různými věkovými skupinami obsaženými v této studii (viz tabulka 17 níže).

Tabulka 17. Data z Kaiserovy studie: Chování testu digene HC2 High-Risk HPV DNA v porovnání s konsenzuálními histologickými výsledky (HSIL) — věkově specifické charakteristiky

	Věk <30	Věk 30–39	Věk >39
n	287	233	365
Prevalence onemocnění (%)	12.2	11.2	2.7
Citlivost (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95 % CI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Specificita (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95 % CI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Negativní prediktivní hodnota (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Pozitivní prediktivní hodnota (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Klinická citlivost a specifita při stanovení rizika onemocnění vysokého stupně u žen se stěry z děložního čípku LSIL nebo HSIL

Multicentrická klinická studie používající test *digene* HC2 High-Risk 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 na 3 výzkumných pracovištích, která nebyla ve spojení s klinikami provádějícími kolposkopii, kde byly odebírány vzorky. Populace pro tuto klinickou studii byla tvořena ženami, u nichž byla diagnostikována buď LSIL nebo HSIL na základě nedávného stěru z děložního čípku a byly doporučeny ke kontrolní kolposkopii. Ze 702 zařazených pacientek mělo 327 výsledky stěru z děložního čípku větší než ASC-US a mělo k dispozici adekvátní informace; 96 z nich mělo statut konečného stádia onemocnění HSIL nebo větší.

Vzorky exfoliovaných cervikálních buněk byly získány buď pomocí zařízení k odběru vzorků *digene* HC2 DNA Collection Device 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 High-Risk HPV DNA a výsledky byly porovnány se stavem onemocnění určeným u každé pacientky. Stav onemocnění byl založen na výsledcích histologického hodnocení. Když však byla histologie negativní, nebo histologický výsledek chyběl, stav onemocnění byl stanoven cytologií v době kolposkopického vyšetření (viz tabulka 18 níže).

Test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byl proveden ve 3 velkých městských zdravotnických střediscích nespojených s pracovišti provádějícími odběr vzorků pro kolposkopii. Cytologii prováděla referenční patologická laboratoř a histologie byla provedena v institucích provádějících 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 High-Risk HPV DNA pro STM a roztok PreservCyt je chování analýzy prezentováno pouze pro roztok PreservCyt. Nebyl pozorován žádný rozdíl ve výsledcích testování vysoce rizikového HPV u vzorků STM a vzorků PreservCyt.

Tabulka 18. Algoritmus stavu onemocnění pacientky

Výsledek cytologie	Výsledek histologie	Stav onemocnění
Negativní	Negativní nebo neprovedeno*	Negative
LSIL	Negativní	LSIL
HSIL	Negativní	HSIL
Tumor	Negativní	HSIL+
Negativní	LSIL	LSIL
LSIL	Neprovedeno*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Tumor	LSIL	LSIL
Negativní	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Neprovedeno*	HSIL
Tumor	HSIL	HSIL
Negativní	Tumor	HSIL+
LSIL	Tumor	HSIL+
HSIL	Tumor	HSIL+
Tumor	Neprovedeno*	HSIL+
Tumor	Tumor	HSIL+

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

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 (viz tabulky 19 a 20 níže). Srovnání byla provedena s využitím všech studijních pacientek s abnormálními arbitrážními výsledky stěru z děložního čípku.

Tabulka 19. Výsledky testování vysoce rizikového HPV

		Konečné stádium onemocnění HSIL		Konečné stádium onemocnění LSIL		Konečné stádium onemocnění negativní		Total
		Výsledky vysoce rizikového HPV						
		+	-	+	-	+	-	
Arbitrážní výsledek stěru z děložního čípku	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Celkem	89	7	107	47	33	44	327
	Celkem	96		154		77		327

Test digene HC2 High-Risk HPV DNA 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 (viz tabulka 20 níže). Test rovněž prokázal negativní prediktivní hodnotu téměř 95 % v této populaci.

Tabulka 20. Charakteristiky chování testu DNA vysoce rizikového HPV mezi pacientkami doporučenými ke stěru z děložního čípku LSIL nebo vyšší a v konečném stádiu onemocnění HSIL

		Konečné stádium onemocnění		Celkem
		HSIL	LSIL nebo negativní	
Výsledek testu DNA vysoce rizikového HPV	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Celkem	96	231	327

Citlivost [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
 95 % CI = 85,6–97,0

Specifická [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
 95 % CI = 33,1–46,0

Prevalence onemocnění pro arbitrážní LSIL až konečné LSIL = 21,4 %
 Prevalence onemocnění pro arbitrážní HSIL až 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 High-Risk HPV DNA bude poněkud nízká, neočekává se přísná korelace mezi nepřítomností neoplazie a negativním výsledkem HPV.

DNA HPV může být přítomna u žen, u nichž nedošlo k progresi do onemocnění vyššího 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a jejichž odpovídající stav onemocnění byl nižší než neoplazie nízkého stupně, bylo téměř 75 % pozitivních.

Byly stanoveny teoretické pozitivní a negativní prediktivní hodnoty testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro výchozí výsledky stěru z děložního čípku LSIL, nebo HSIL, které se ukázaly jako HSIL nebo závažnější onemocnění při kolposkopii (viz tabulka 21 níže).

Tabulka 21. teoretické pozitivní a negativní prediktivní hodnoty testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro výchozí výsledky stěru z děložního čípku LSIL, nebo HSIL

Teoretická prevalence pro HSIL	Výchozí výsledky stěru z děložního čípku LSIL nebo HSIL	
	Pozitivní prediktivní hodnota analýzy	Negativní prediktivní hodnota analýzy
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

Chování testu při vaginálním nebo samostatnému odběru pacientkou

V literatuře, která pojednává o účinnosti testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA z vaginálních vzorků odebíraných pacientkou, se zmiňují studie s účastí více než 141 000 žen ve věku 16–54 let. Kohorty studií zahrnovaly ženy z Číny (41, 42), Mexika (43, 44) a Spojeného království (45). Uspořádání studií se mírně lišilo, ale obecně platilo, že ženám s pozitivním výsledkem bylo nabídnuto další vyšetření formou kolposkopie a výsledky byly posuzovány z hlediska senzitivity a specifity ve srovnání s komparativní metodou.

Ve dvou studiích, v nichž byla k dispozici data k porovnání vzorků odebíraných pacientkou a vzorků odebíraných lékařem, výsledky naznačují u obou metod vysokou senzitivitu pro průkaz CIN2+ (42, 45): 81–85 % u vzorků odebíraných pacientkou v porovnání s 96–100 % u vzorků odebíraných lékařem. Výsledky specifity byly u obou metod velmi podobné pro průkaz CIN2+

(42, 45): 81–82 % u vzorků odebíraných pacientkou v porovnání s 83–85 % u vzorků odebíraných lékařem. V dalších studiích, které zahrnují pouze data účinnosti pro vzorky odebírané pacientkou, účinnost testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA z hlediska senzitivity na CIN2+ byla 3,4krát vyšší než cytologie (43), přičemž senzitivita dosahovala 98 % před úpravou zkráslení při verifikaci testu (44).

Analytická citlivost

Byl testován neklinický panel plazmidové DNA klonovaného HPV, aby se stanovilo, zda každý ze 13 typů HPV je detekovatelný testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a určila analytická citlivost analýzy pro každý z typů HPV. Každá cílová koncentrace HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml a 0,2 pg/ml) každého ze 13 typů DNA HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68) byla provedena třikrát. Byla vypočítána průměrná RLU pro každou koncentraci každého typu HPV a porovnána s pozitivním kalibrátorem.

Byla určena mez detekovatelnosti každého typu HPV v STM (viz tabulka 22 níže). Meze detekovatelnosti se pohybovaly od 0,62 pg/ml do 1,39 pg/ml v závislosti na testovaném typu HPV. Průměrná mez detekovatelnosti všech 13 typů DNA HPV byly 1,08 pg/ml se směrodatnou odchylkou 0,05 pg/ml.

Tabulka 22. Souhrn detekovatelných limitů senzitivity pro všechny typy DNA viru HPV v STM

Typ DNA HPV	Detekovatelná koncentrace HPV DNA (pg/ml)	Směrodatná odchylka	95% CI
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
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)	1.08	0.05	0.95–1.25

Ekvivalence mezi typy vzorků

Ekvivalence mezi vzorky STM a PreservCyt

Ekvivalence mezi vzorky STM a PreservCyt byla zkoumána pro rovnocenný výtěžek DNA 18 HPV. Přibližně 10^6 pozitivních buněk HeLa obsahujících integrovaných 18 genomů HPV bylo přimícháno do STM a negativního buněčného souboru PreservCyt. Každý typ vzorku byl zpracován podle své příslušné přípravy vzorku a podle denaturačních postupů popsanych v příslušných pokynech pro používání a testování testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Výsledky prokázaly, že výtěžek DNA 18 HPV z lidských nádorových buněk je ekvivalentní pro tato dvě média a že příprava vzorku roztoku PreservCyt neovlivňuje analytickou citlivost testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku v případě vzorků PreservCyt a přípravou vzorků v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Byly provedeny studie využívající vzorky PreservCyt odebrané dílčí populaci žen s normální cytologií (n=1276) a dílčí populaci žen s cytologií ASC-US (n=402) nebo vyšší. Ruční příprava vzorku a příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media byla provedena pro každý vzorek po automatickém testování RCS pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (viz tabulka 23 níže).

Tabulka 23. Shoda výsledků PreservCyt mezi ruční přípravou vzorku a přípravou vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media (n=1678)

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI		Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	
Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO $\geq 2,5$)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO $< 0,8$)
96.0 (409/426)	97.6 (372/381)	96.2 (1204/1252)	99.1 (1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

Relativní citlivost a specifita analýzy vzorků PreservCyt připravených s použitím sady QIASymphony DSP HPV Media vysoce koreluje s výsledky získanými metodou ruční přípravy vzorku, jak o tom svědčí dolní mez 95% CI jak pro pozitivní, tak negativní shodu.

Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku v případě vzorků PreservCyt a přípravou vzorků v případě vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA

Byly provedeny studie využívající vzorky PreservCyt odebrané dílčí populaci žen ve věku 30 let a více s normální cytologií (n=1.901) a dílčí populaci žen s cytologií ASC-US (n=398). Ruční příprava vzorku a příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA byla provedena pro každý vzorek po automatickém testování RCS pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (viz tabulka 24 níže).

Tabulka 24. Shoda výsledků PreservCyt mezi ruční přípravou vzorku a přípravou vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA (n=2299)

Positive agreement (%) (n/N) 95% CI		Negative agreement (%) (n/N) 95% CI	
All positives	Strong positive region RLU/CO \geq 2.5	All negatives	Strong negative region RLU/CO $<$ 0.8
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

Relativní citlivost a specifita analýzy vzorků PreservCyt připravených s použitím sady QIASymphony DSP AXpH DNA vysoce koreluje s výsledky získanými metodou ruční přípravy vzorku, jak o tom svědčí dolní mez 95% CI jak pro pozitivní, tak negativní shodu.

Ekvivalence mezi STM a ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet

Bylo provedeno dvoufázové klinické hodnocení využívající 6 odběrových center a 3 testovacích pracovišť ve Spojených státech. Pacientky navštěvující oddělení venerických chorob, porodnické/gynekologické oddělení, oddělení kolposkopie, nemocnici nebo centrum plánovaného rodičovství jsou způsobilé k zařazení podle předem stanovených zařazovacích a vylučovacích kritérií. Ve fázi proveditelnosti, určené ke stanovení příslušné hodnoty CO testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro použití vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet, bylo zařazeno přibližně 400 pacientek. Klinická validační fáze, do níž bylo zařazeno přibližně 1 500 pacientek pro vyhodnocení zvolené hodnoty CO, začala po předběžné analýze fáze proveditelnosti a prokázala, že CO 1,0 RLU/CO při použití vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet dosáhla přijatelné shody s výsledky vzorků STM.

V obou vyhodnocovacích fázích byly odebírány párové cervikální vzorky SurePath a STM od každé účastnice studie, která s tím vyslovila souhlas. Vzorek SurePath byl poté odeslán do cytologické laboratoře k přípravě mikroskopického preparátu. Po cytologické přípravě byly zbývající vzorky SurePath z post-gradientních buněčných pelet a odpovídající vzorky STM analyzovány s využitím testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, kde hodnota CO byla 1,0 RLU/CO (viz tabulka 25 níže).

Tabulka 25. Shoda výsledků vzorků SurePath s výsledky vzorků STM (všechny věkové kategorie a cytologická klasifikace) (n=1.490)

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI		Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	
Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO ≥2,5)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO <0,8)
93.5 (401/429) 90.7–95.6	96.4 (378/392) 94.1–98.0	95.3 (1011/1061) 93.8–96.5	96.0 (1002/1044) 94.6–97.1

Relativní senzitivita a specificita analýzy při testování vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet vysoce koreluje s výsledky získanými při testování vzorků STM, jak prokazuje dolní limit 95% intervalu spolehlivosti CI jak pro pozitivní, tak negativní shodu.

Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet a přípravou vzorků ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Byly provedeny studie s využitím vzorků SurePath odebraných z následujících dílčích populací:

- Ženy s normální cytologií (n=1189)
- Ženy s cytologií ASC-US nebo vyšší než ASC-US (n=199)

U každého vzorku SurePath byla provedena příprava vzorku ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media a ruční příprava vzorku ze vzorku z post-gradientních buněčných pelet. U všech připravených vzorků byla provedena automatická analýza RCS s využitím testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (viz tabulka 26 níže).

Tabulka 26. Shoda výsledků mezi ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath a přípravou vzorků ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media (n = 1 388)

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI		Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	
Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO $\geq 2,5$)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO $< 0,8$)
91.7 (222/242)	97.5 (192/197)	99.0 (1134/1146)	99.7 (1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

Relativní citlivost a specifická analýza vzorků SurePath připravených s použitím sady QIASymphony DSP HPV Media vysoce koreluje s výsledky získanými metodou ruční přípravy vzorku, jak o tom svědčí dolní mez 95% CI jak pro pozitivní, tak negativní shodu.

Ekvivalence mezi ruční přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet a přípravou vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Byly provedeny studie s využitím vzorků SurePath odebraných z následujících dílčích populací:

- ženy s normální cytologií (n = 1 200)
- ženy s cytologií ASC-US nebo vyšší než ASC-US (n = 183)

Ruční příprava vzorku a příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media byla provedena pro každý vzorek SurePath z post-gradientních buněčných pelet po automatické analýze RCS pomocí testu digene HC2 High-Risk HPV DNA (viz tabulka 27 níže).

Tabulka 27. Shoda výsledků mezi ruční přípravou vzorku a přípravou vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet (n = 1 383)

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95% CI		Negativní shoda (%) (n/N) 95% CI	
Všechny pozitivní	Oblast výrazné pozitivity RLU/CO $\geq 2,5$	Všechny negativní	Oblast výrazné negativity RLU/CO $< 0,8$
92,6 (188/203)	97,4 (147/151)	94,4 (1 114/1 180)	99,3 (1 078/1 086)
88,2–95,5	93,4–99,0	92,9–95,6	98,6–99,6

Relativní citlivost a specifická analýza vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet připravených s použitím sady QIASymphony DSP HPV Media vysoce koreluje s výsledky získanými metodou ruční přípravy vzorku, jak o tom svědčí dolní limit 95% CI jak pro pozitivní, tak negativní shodu.

Shoda testovacích metod

Byla provedena multicentrická studie (n=2.270) s cílem vyhodnotit výsledky klinických testů s RCS srovnávaných s výsledky testu využívajícími ruční metodu. Testování probíhalo na 3 pracovištích, která nebyla součástí společnosti QIAGEN, se vzorky od pacientek odebranými na 5 odběrových místech. Datová množina obsahovala 1.269 cervikálních vzorků odebraných v roztoku PreservCyt a 1.001 vzorků odebraných v STM.

Byly vypočítány statistické shody mezi spárovanými vzorky testovanými RCS a ručními testem pro tuto populaci pacientů (viz tabulky 2 a 29 níže).

Tabulka 28. Shrnutí shody mezi automatickým testováním RCS a ručním testováním — vzorky STM (n=1.001)

Cytologická Klasifikace	Prevalence HPV (%)	Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI		Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	
		Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO >2,5)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO >0,8)
WNL* <30 let	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL* ≥30 let	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Jiné	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Všechny vzorky STM	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = v normálních mezích.

Tabulka 29. Shrnutí shody mezi automatickým testováním RCS a ručním testováním — vzorky PreservCyt (n=1.269)

Cytologická klasifikace	HPV Prevalence (%)	Pozitivní shoda (%)		Negativní shoda (%)	
		Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO >2,5)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO >0,8)
WNL <30 roků	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL* ≥30 let	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC–US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Další cytologie	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Všechny vzorky PreservCyt*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

*WNL = v normálních mezích..

*Cytologické údaje nejsou k dispozici u 4 pacientek.patients.

Byl provedena doplňková klinická studie využívající archivované reziduální vzorky PreservCyt odebrané v dílčí populaci žen ve věku 30 let a starších s normální cytologií (viz tabulka 30 níže) s prevalencí HPV 4,8 %.

Tabulka 30. Shrnutí shody mezi automatickým RCS testováním a ručním testováním — ženy WNL ve věku 30 let a starší (n=2.077)

Pozitivní shoda (%)		Negativní shoda (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % CI		95 % CI	
Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO >2,5)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO >0,8)
92.0	91.8	99.3	99.7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

Objevilo se 7 nesouhlasných výsledků mezi výsledky ručního a automatického RCS testování v silně pozitivní oblasti. Počáteční výsledky ručního testování pro těchto 7 vzorků byly mimo doporučen algoritmus opakovaného testování PreservCyt; protože však design studie vyžadoval testování všech vzorků trojmo, opakované výsledky byly pro nesouhlasné rozlišení k dispozici.

Data z opakovaného testování pro každý ze 7 nesouhlasných vzorků naznačují, že všechny nesouhlasné vzorky jsou pro DNA HPV negativní (viz následující tabulka 31). Na základě opakovaných negativních výsledků získaných pro oba replikáty byl každý zpočátku pozitivních výsledků ručního testu pravděpodobně falešně pozitivní.

Tabulka 31. Nesouhlasné vzorky PreservCyt pro ženy WNL ve věku 30 let a starší (n=7)

Vzorek	Pracoviště	Ruční testování (RLU/CO)			Automatické testování RCS (RLU/CO)		
		Výchozí	Opakování 1	Opakování 2	Výchozí	Opakování 1	Opakování 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Výsledky z této klinické studie naznačují celkovou shodu mezi automatickým RCS a ručním testováním při použití vzorků STM, nebo PreservCyt.

Reprodukovatelnost

Celková reprodukovatelnost ručního testování

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

Tři externí laboratoře prováděly testování se stejnou šarží sad testů *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ve 3 různých dnech s identickým panelem reprodukovatelnosti. Panel reprodukovatelnosti zahrnoval následující vzorky:

- 12 denaturovaných souborů klinických vzorků STM

- 3 nedenateurované soubory klinických vzorků PreservCyt
- Negativní kalibrátor
- Positive High-Risk HPV Calibrator (pozitivní kalibrátor vysoce rizikového HPV) v koncentracích 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml a 10 pg/ml.

Všichni členové panelu byli testováni každý den trojmo testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Výsledky naznačují, že je reprodukovatelnost testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA s klinickými vzorky velmi dobrá (viz tabulka 31 níže).

Tabulka 32. Celková reprodukovatelnost — multicentrická reprodukovatelnost (všechny běhy na všech pracovištích)

Statistická měření	Výsledek
Očekávaná pozitivita u pozorovaného pozitivního výsledku (95 % CI)	100.0% (99.0–100.0)
Očekávaná negativa u pozorovaného pozitivního výsledku (95 % CI)	99.0% (97.49–99.73)
Shoda (95 % CI)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Reprodukovatelnost u klinických testů STM

Ruční testování

Byla provedena studie pro hodnocení reprodukovatelnosti ručního testování klinických vzorků STM testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Kombinací dříve testovaných vzorků STM byl připraven 20členný panel skládající se z klinických souborů (10 pozitivních a 10 negativních). Vzorky byly testovány v replikátech po 4 v každý z 5 dnů, celkem 20 replikátů na vzorek. Testování probíhalo pomocí kombinované Probe Mix (směs sond) obsahující High-Risk HPV Probe (sonda vysoce rizikového HPV) a Low-Risk HPV Probe (sonda nízko rizikového HPV). Neočekávalo se, že se bude reprodukovatelnost testu odlišovat při použití pouze Probe Mix (směs sond) v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Byl vypočítán průměrný RLU/CO a 95 % CI okolo průměru (viz tabulka 33 níže).

Tabulka 33. Reprodukovatelnost vzorků STM — ruční testování (sestupné pořadí podle průměrného RLU/CO)

ID vzorku	Průměrný RLU/CO	95 % CI	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
10	3.18	3.02–3.35	100 (20/20)
20	1.43	1.36–1.50	100 (20/20)
11	1.25	1.20–1.28	100 (20/20)
12	1.21	1.15–1.27	100 (20/20)
15	1.20	1.14–1.25	100 (20/20)
13	1.07	1.01–1.11	80 (16/20)
16	1.06	1.01–1.09	75 (15/20)
17	1.04	1.00–1.06	80 (16/20)
14	0.98	0.92–1.02	45 (9/20)
18	0.92	0.87–0.96	20 (4/20)
19	0.72	0.68–0.75	0 (0/20)
7	0.40	0.33–0.46	0 (0/20)
4	0.38	0.35–0.39	0 (0/20)
9	0.37	0.32–0.41	0 (0/20)
1	0.35	0.32–0.36	0 (0/20)
2	0.35	0.31–0.37	0 (0/20)
8	0.32	0.29–0.34	0 (0/20)
3	0.30	0.27–0.31	0 (0/20)
6	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
5	0.26	0.23–0.28	0 (0/20)

U 5 vzorků s průměrným RLU/CO 20 % nebo více nad CO bylo pozitivních 100 ze 100 replikátů (100,0 %). U 5 vzorků s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod CO bylo pozitivních 60 ze 100 (60%, 95% CI = 49,7–69,6) replikátů a 40 ze 100 (40%) bylo negativních. 200 ze 200 replikátů (100,00 %) bylo negativních pro 10 vzorků s průměrným RLU/CO 20 % nebo více pod CO.

Výsledky signalizují, že lze u vzorků vzdálených od CO 20 % nebo více očekávat, že budou dávat konzistentní výsledky. Vzorky v blízkosti CO dávaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tato data prokazují, že ruční testování vzorků STM testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dává reprodukovatelné výsledky.

Automatické testování RCS

Byla provedena studie pro hodnocení reprodukovatelnosti v rámci běhu, ze dne na den a mezi laboratořemi u automatického testování RCS vzorků STM testem *digene* HC2 High-Risk HPV

DNA. Panel o 16 prvcích ze sdružených klinických vzorků (viz tabulka 34 níže) byl testován pomocí jediné šarže reagensů dvakrát denně v 3 různých dnech. Každý prvek panelu byl testován čtyřikrát.

Tabulka 34. Reprodukovatelnost vzorků STM — složení panelu automatického testování RCS

Prvek panelu	Přibližný RLU/CO	Očekávaný výsledek testu
1N	<0.4	Negativní
2N	0.4–0.8	Negativní
3P	0.8–1.2	Vysoký negativní/nízký pozitivní
4P	0.8–1.2	Vysoký negativní/nízký pozitivní
5P	0.8–1.2	Vysoký negativní/nízký pozitivní
6P	1.2–2.0	Nízký pozitivní
7P	1.2–2.0	Nízký pozitivní
8P	1.2–2.0	Nízký pozitivní
9P	2.0–5.0	Nízký pozitivní
10P	5.0–10.0	Střední pozitivní
11N	<0.4	Negativní
12N	<0.4	Negativní
13N	<0.4	Negativní
14XR	Pozitivní klinický materiál DNA nízkorizikového HPV v klinicky negativním souhrnu STM	Vysoký negativní/nízký pozitivní
15XR	Plazmid DNA nízkorizikového HPV v klinicky negativním souhrnu STM	Vysoký negativní/nízký pozitivní
16XR	Kontrola DNA plazmidového vektoru v klinicky negativním souhrnu STM	Vysoký negativní/nízký pozitivní

Pro hodnocení potenciálu zkřížené hybridizace Probe Mix (směsi sond) testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se vzorky obsahujícími pouze typy DNA nízkorizikového HPV 6, 11, 42, 43 a 44 byly zahrnuty pouze dva členové panelu (14XR a 15XR). Prvek panelu 16XR se skládal z DNA pGEM® v koncentraci 1,49 ng/ml a sloužil jako kontrola vektoru pro člena panelu 15XR. Výsledky tohoto testování neindikovaly žádné výsledky falešně pozitivního testu díky přítomnosti typů DNA nízkorizikového HPV v klinických vzorcích. Tyto výsledky jsou ve shodě s ručním testováním.

Reprodukovatelnost byla vypočítána podle metody popsané NCCLS E5-A* (viz tabulka 35 níže). Tato metoda vyžaduje výpočet komponent variance pro každý zdroj variability: laboratoř, den, běh a chyba (definované jako variace v rámci analýzy a mezi analýzami).

Tabulka 34. Reprodukovatelnost vzorků STM — automatické testování RCS, kvantitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka				Celkový CV (%)	
			V rámci běhu	Mezi běhy	Mezi dny	Mezi laboratořemi		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P [†]	70	1.95	N/A [‡]	N/A [‡]	N/A [‡]	N/A [‡]	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Komponenty negativní variance jsou nastaveny na rovné nule.

[†] Dva neplatné replikáty pro člena panelu 8P brání provedení analýzy komponent variance kvůli nerovnocenné velikosti srovnávaných skupin.

[‡] NEUVEDENO: analýza variance není možná kvůli menšímu počtu replikátů než ostatních členů panelu.

Reprodukovatelnost klinických vzorků PreservCyt

Ruční testování

Reprodukovatelnost ručního testování vzorků PreservCyt testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byla stanovena ve studii využívající 24 simulovaných vzorků s různými koncentracemi DNA HPV. Vzorky obsahovaly roztok PreservCyt a bílé krvinky s a bez bakterií obsahujících 16 plazmidů HPV.

Vzorky byly testovány jako replikáty po 4 každý z 5 dnů, celkem 20 replikátů na vzorek. Každý den z 5 ve studii byl připraven 8ml vzorek z každého vzorku podle návodu k použití sady *digene* HC2 Sample Conversion a otestován. Byl spočítán průměr 95 % CI (viz následující tabulka 36).

Tabulka 36. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — ruční testování s ruční přípravou vzorků; kvalitativní reprodukovatelnosti (sestupné pořadí podle průměrného RLU/CO)

ID vzorku	Průměrný RLU/CO	95 % CI	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
21	3.51	3.19–3.83	100 (20/20)
12	1.58	1.48–1.69	100 (20/20)
13	1.42	1.32–1.52	100 (20/20)
17	1.38	1.23–1.53	90 (18/20)
18	1.36	1.23–1.48	95 (19/20)
15	1.32	1.16–1.49	85 (17/20)
23	1.17	1.06–1.27	75 (15/20)
16	1.14	1.07–1.20	75 (15/20)
20	1.10	0.96–1.21	85 (17/20)
19	1.06	0.95–1.17	45 (9/19)
22	1.05	0.99–1.10	70 (14/20)
11	1.04	0.96–1.11	65 (13/20)
14	0.94	0.86–1.01	25 (5/20)
24	0.77	0.73–0.81	0 (0/20)
3	0.28	0.25–0.30	0 (0/20)
1	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
7	0.27	0.25–0.30	0 (0/20)
2	0.27	0.25–0.28	0 (0/20)
5	0.26	0.24–0.28	0 (0/20)
4	0.24	0.22–0.25	0 (0/20)
9	0.23	0.21–0.25	0 (0/20)
8	0.22	0.18–0.27	0 (0/20)
10	0.22	0.20–0.25	0 (0/20)
6	0.19	0.17–0.21	0 (0/20)

U 6 vzorků s průměrným RLU/CO 20 % nebo více nad CO bylo pozitivních 114 ze 120 replikátů (95,0 %). U 7 vzorků s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod CO bylo pozitivních 88 ze 139 (63,3 %, 95% CI = 54,3–70,9) replikátů a 51 ze 139 (36,7 %) bylo negativních. U 4 vzorků v rozmezí 10 % nad nebo pod CO bylo pozitivních 41 ze 79 (51,9 %) replikátů a 38 ze 79 (48,1 %) bylo negativních. U 11 vzorků s průměrným RLU/CO 20 % nebo více pod CO bylo negativních 220 ze 220 replikátů (100%).

Výsledky signalizují, že lze u vzorků vzdálených od CO 20 % nebo více očekávat, že budou dávat konzistentní výsledky. Vzorky v blízkosti CO dávaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že ruční testování vzorků PreservCyt testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dává reprodukovatelné výsledky.

Automatické testování RCS s ruční přípravou vzorku

Byla provedena vnitřní studie automatizovaného testování RCS pomocí klinických vzorků PreservCyt získaných hlavně od žen s výsledkem cytologie ASC-US nebo vyšším než ASC-US (prevalence HPV 57 %). Vzorky byly rozděleny na 2 alikvotní díly, každý alikvotní díl byl poté individuálně zpracován pomocí sady *digene* HC2 Sample Conversion a testován dvojmo testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Stejně jako u jiných kvalitativních testů IVD je variabilita výsledků testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA získaných z klinických vzorků spojována primárně s jedním či kombinací následujících faktorů: odběr vzorků, příprava vzorku a testovací postup. Protože byly srovnávané výsledky testu získány ze stejného klinického vzorku, experimentální design kontroloval variabilitu kvůli odběru vzorku. Opakovatelnost výsledků získaných ze 2 individuálně připravených alikvotních množství vzorku ze stejných klinických vzorků (uváděné dále jako „mezi připravenými alikvotními množstvími“) odráží variaci způsobenou kombinací příprava vzorku a testovací postup. Opakovatelnost výsledků získaných z téhož alikvotního množství vzorku (uváděné dále jako „v rámci připraveného alikvotního množství“) odráží variaci pouze z testovacího postupu (viz tabulka 37 níže).

Tabulka 37. Reprodukovatelnost vzorků — automatické testování RCS s ruční přípravkou vzorků; kvalitativní reprodukovatelnost

Analýza	Pozitivní shoda (%)	Negativní shoda (%)	Celková shoda (%)	
	(n/N) 95 % CI	(n/N) 95 % CI	(n/N) 95 % CI	
V rámci připraveného alikvotního množství	Všechny údaje	99.62 (261/262) 97.9–100.0	94.7 (160/169) 90.1–97.5	97.7 (421/431) 95.8–98.9
	Silně pozitivní a silně negativní oblasti	100.0 (249/249) 98.5–100.0	98.2 (160/163) 94.7–99.6	99.3 (409/412) 97.9–99.9
	Všechny údaje	99.6 (264/265) 97.9–100.0	98.2 (163/166) 94.8–99.6	99.1 (427/431) 97.6–99.8
	Silně pozitivní a silně negativní oblasti	100.0 (249/249) 98.5–100.0	99.4 (161/162) 96.6–100.0	99.8 (410/411) 98.7–100.0

Byla provedena další studie pro hodnocení kvantitativní reprodukovatelnosti výsledků získaných automatickým testováním RCS simulovaných vzorků PreservCyt. Studie se účastnila tři testovací pracoviště včetně společnosti QIAGEN.

Každá testovací laboratoř provedla jak automatické testování RCS, tak ruční testování testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dvakrát denně v 5 různých dnech pomocí dodaného panelu reprodukovatelnosti o 6 prvcích. Každý prvek panelu se skládala s kultivovaných buněk reprodukovatelnosti o 6 prvcích. Každý prvek panelu se skládala s kultivovaných buněk přidanych do roztoku PreservCyt určeného a získání přibližné hodnoty RLU/CO (viz tabulka 38 níže).

HPV DNA pozitivní prvky panelu byly připraveny přidáním různých množství SiHa buněk HPV DNA pozitivních (z laboratorní buněčné linie). Negativní prvky panelu byly tvořeny HPV negativními buňkami Jurkat (z buněčné linie jiné laboratoře). Konečná buněčná koncentrace všech 6 prvků panelu byla přibližně 5×10^4 buněk/ml.

Tabulka 38. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — automatické testování RCS s ruční přípravou vzorků; kvalitativní reprodukovatelnost prvků panelu

Prvek panelu	Buněčný typ	Přibližný RLU/CO	Očekávaný výsledek
1N	Jurkat	<1,0	Negativní
2N	Jurkat	<1,0	Negativní
3P	SiHa a Jurkat	5,0–8,0	Nízký pozitivní
4P	SiHa a Jurkat	5,0–8,0	Nízký pozitivní
5P	SiHa	30,0–50,0	Střední pozitivní
6P	SiHa	200,0	Vysoký pozitivní

Reprodukovatelnost byla vypočítána podle metody popsané NCCLS E5-A* (viz tabulka 38 níže). Tato metoda vyžaduje výpočet komponent variance pro každý zdroj variability: laboratoř, den, běh a chyba (definované jako variace v rámci analýzy a mezi analýzami). Každý ze členů panelu o 6 prvcích byl testován čtyřikrát v každém z 10 běhů (2 běhy na den během 5 dnů testování) v každé ze 3 testovacích laboratoří.

.

Tabulka 39. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — automatické testování RCS s ruční přípravou vzorků; kvalitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka				Celkový CV (%)	
			V rámci běhu	Mezi běhy	Mezi dny	Mezi laboratořemi		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

† Komponenty negativní variance jsou nastaveny na rovné nule.

Pro doplnění této výchozí studie reprodukovatelnosti údajů ze vzorků velmi blízkých hraniční hodnotě analýzy byla provedena dodatečná studie přesnosti na externím pracovišti vzhledem ke společnosti QIAGEN s využitím RCS.

Panel se skládal z 1 negativního, 2 negativních nebo nízko pozitivních a 2 nízko pozitivních prvků. Každý panel byl připraven přidáním kultivovaných buněk Jurkat a SiHa do roztoku PreservCyt, aby byly získány cílové hodnoty RLU/CO (viz tabulka 39 níže).

Toto externí pracoviště provedlo automatické testování RCS pomocí jediné šarže reagensů testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pro každý běh testu, provádělo test 2krát denně v 3 různých dnech s dodaným 5prvkovým panelem simulovaných vzorků PreservCyt. Každý prvek panelu byl rozdělen do 4 vzorků a všechny 4 vzorky byly testovány na téže mikroděstičce (viz tabulka 41 dále).

Tabulka 40. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — automatické testování RCS s ruční přípravou vzorků; kvantitativní reprodukovatelnost prvků panelu ležících v blízkosti hodnoty CO analýzy

Prvek panelu	Přibližná hodnota RLU/CO	Očekávaný výsledek
1N	0.2	Negativní
2N	0.8–1.2	Vysoký negativní/nízký pozitivní
3P	0.8–1.2	Vysoký negativní/nízký pozitivní
4P	1.2–2.0	Nízký pozitivní
5P	1.2–2.0	Nízký pozitivní

Tabulka 41. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — automatické testování RCS s ruční přípravou vzorku; kvantitativní reprodukovatelnost v blízkosti hodnoty CO analýzy

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka			Celkem	Total CV (%)
			V rámci běhu	Mezi běhy	Mezi dny		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Komponenty negativní variance jsou nastaveny na rovné nule

Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Vnitřní studie přípravy vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media byla provedena s využitím klinických vzorků PreservCyt získaných od žen s jedním ze dvou následujících cytologických výsledků:

- ASC-US nebo vyšší než ASC-US
- negativní na intraepiteliální lézi či malignitu (NILM)

Z každého klinického vzorku byly odebrány dva vzorky. Každý vzorek byl individuálně připraven pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media a výsledky byly stanoveny automatickým testováním RCS testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Stejně jako u jiných kvalitativních testů IVD je variabilita výsledků testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA získaných z klinických vzorků spojována primárně s jedním či kombinací následujících faktorů: odběr vzorků, příprava vzorku a testovací postup. Protože byly srovnávané výsledky testu získány ze stejného klinického vzorku (uváděné jako „mezi vzorky“), experimentální design kontroloval variabilitu kvůli odběru vzorku. Reprodukovatelnost výsledků (viz tabulka 42 dále) vytvořená ze 2 individuálně připravených vzorků ze stejného klinického vzorku odráží variaci způsobenou přípravou vzorku a testovacím postupem.

Tabulka 42. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvalitativní reprodukovatelnost mezi vzorky

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI	Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	Celková shoda (%) (n/N) 95 % CI
99.0 (95/96) 94.3–99.8	96.4 (161/167) 92.4–98.3	97.3 (256/263) 94.6–98.7

Byla provedena další studie pro hodnocení reprodukovatelnosti výsledků získaných pomocí simulovaných vzorků PreservCyt. Po přípravě vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media následovalo automatické testování RCS testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. 8 pozitivních členů panelu bylo připraveno přidavkem HPV DNA pozitivních buněk SiHa, nebo HeLa k HPV DNA negativním buňkám C-33 A v roztoku PreservCyt, zatímco 2 členové HPV DNA negativního panelu obsahovaly pouze HPV DNA negativní buňky C-33 A.

Testování v jediném dnu prováděli tři různí členové obsluhy pomocí tří různých přístrojů QIASymphony SP a tří různých sad QIASymphony DSP HPV Media s členy panelu 2N, 3E, 5P, 7P a 9P. Členové panelu 2N, 3E, 5P a 7P byli testováni s 18 replikáty v 3 různých běžích, kdy pro každého člena panelu bylo získáno 54 datových bodů. Člen panelu 9P byl testován s 16 replikáty v 3 různých běžích, což přineslo 48 datových bodů.

Jeden člen obsluhy provedl test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA během tří různých dnů pomocí tří různých přístrojů QIASymphony SP a jednou sadou QIASymphony DSP HPV Media se členy panelu 1N, 4E, 6P, 8P a 10P. Členové panelu 1N, 4E, 6P a 8P byli testováni s 18 replikáty v 8 různých běžích, kdy pro každého člena panelu bylo získáno 144 datových bodů. Člen panelu 10P byl testován s 16 replikáty v 8 různých běžích, což přineslo 128 datových bodů.

U prvků panelu s průměrným RLU/CO 20 % nebo více nad CO bylo pozitivních 572 ze 572 (100,0 %). U prvků panelu s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod CO bylo pozitivních 98 ze 198 (49,5 %) a 100 ze 198 (50,5 %) bylo negativních. U prvků panelu s průměrným RLU/CO o 20 % nebo více pod CO bylo negativních 198 ze 198 (100,0 %) (viz tabulka 43 níže).

Tabulka 43. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvalitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	Buněčný typ	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa a C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa a C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa a C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa a C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa a C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa a C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa a C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa a C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Výsledky signalizují, že lze u vzorků vzdálených od CO 20 % nebo více očekávat, že budou dávat konzistentní výsledky. Vzorky v blízkosti CO dávaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že příprava vzorků u vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media a následovaná testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dává reprodukovatelné výsledky.

Byly rovněž použity výsledky vnitřní studie pro vyhodnocení kvantitativní reprodukovatelnosti výsledků získaných přípravou vzorku u klinických vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media (viz tabulka 44 a 45 níže)..

Tabulka 44. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvantitativní reprodukovatelnost u stejného příslušníka obsluhy

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka			Odhadovaná celková směrodatná odchylka	Odhadovaný celkový CV (%)
			V rámci běhů	Mezi běhy	Mezi kombinacemi*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Mezi kombinacemi přístrojů QIASymphony SP a různými dny.

Tabulka 45. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvantitativní reprodukovatelnost ve stejný den

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka		Odhadovaná celková směrodatná odchylka	Odhadovaný celkový CV (%)
			V rámci běhů	Mezi běhy [†]		
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†] Běh se skládá z kombinace sady QIASymphony DSP HPV Media, přístroje QIASymphony SP a člena obsluhy

Kvantitativní reprodukovatelnost je velmi vysoká, jak o tom svědčí všechny hodnoty CV zůstávající pod 25 %. Směrodatné odchylky mezi běhy jsou srovnatelné s odpovídající hodnotou v rámci běhů, což signalizuje konzistentní výsledky bez ohledu na použitý přístroj nebo šarži sady.

Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA.

Vnitřní studie přípravy vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA byla provedena s využitím klinických vzorků PreservCyt získaných od žen buď s cytologií ASC-US, nebo NILM. Z každého klinického vzorku byly odebrány dva vzorky. Každý vzorek byl individuálně připraven pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA a výsledky byly stanoveny automatickým testováním RCS testem digene HC2 High-Risk HPV DNA.

Stejně jako u jiných kvalitativních testů IVD je variabilita výsledků testu digene HC2 High-Risk HPV DNA získaných z klinických vzorků spojována primárně s jedním či kombinací následujících faktorů: odběr vzorků, příprava vzorku a testovací postup. Protože byly srovnávané výsledky testu získány ze stejného klinického vzorku (uváděné jako „mezi vzorky“), experimentální design kontroloval variabilitu kvůli odběru vzorku. Reprodukovatelnost výsledků (viz tabulka 46 dále) vytvořená ze 2 individuálně připravených vzorků ze stejného klinického vzorku odráží variaci způsobenou přípravou vzorku a testovacím postupem

Tabulka 46. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA; kvalitativní reprodukovatelnost mezi vzorky

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI	Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	Celková shoda (%) (n/N) 95 % CI
95.3 (101/106) 89.4–98.0	96.7 (176/182) 92.3–98.5	96.2 (277/288) 93.3–97.9

Byla provedena další studie pro hodnocení reprodukovatelnosti výsledků získaných pomocí simulovaných vzorků PreservCyt. Po přípravě vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA následovalo automatické testování RCS testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Tři různí operátoři prováděli test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA v různé dny pomocí různých přístrojů a různých šarží reagensů s panelem o 9 prvcích. Každý prvek panelu byl testován dvojmo v 24 různých běžích, což poskytlo 48 datových bodů pro každý prvek panelu. 8 pozitivních členů panelu bylo připraveno přidavkem HPV DNA pozitivních buněk SiHa, nebo HeLa k HPV DNA negativním buňkám H9 v roztoku PreservCyt, zatímco člen HPV DNA negativního panelu obsahoval pouze HPV DNA negativní buňky H9.

U prvků panelu s průměrným RLU/CO 20 % nebo více nad CO bylo pozitivních 237 ze 240 (98,8 %). U prvků panelu s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod CO bylo pozitivních 95 ze 144 (66,0 %) a 49 ze 144 (34,0 %) bylo negativních. U prvků panelu s průměrným RLU/CO o 20 %

Tabulka 47. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA; kvalitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	Buněčný typ	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 a HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 a HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 a SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 a SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 a HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 a SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 a HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 a SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Výsledky signalizují, že lze u vzorků vzdálených od CO 20 % nebo více očekávat, že budou dávat konzistentní výsledky. Vzorky v blízkosti CO dávaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že příprava vzorků u vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA a následovaná testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dává reprodukovatelné výsledky.

Byly rovněž použity výsledky vnitřní studie pro vyhodnocení kvantitativní reprodukovatelnosti výsledků získaných přípravou vzorku u klinických vzorků PreservCyt pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA (viz tabulka 48 níže).

Tabulka 48. Reprodukovatelnost vzorků PreservCyt — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA; kvantitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka			Odhadovaná celková směrodatná odchylka	Odhadovaný celkový CV (%)
			V rámci běhů	Mezi běhy	Mezi kombinacemi*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

* Mezi kombinacemi sad testů *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, sad QIASymphony DSP AXpH DNA, použitého RCS, použitého QIASymphony SP a obsluhy.

Reprodukovatelnost klinických vzorků SurePath

Ruční testování

Reprodukovatelnost ručního testování vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byla stanovena ve studii využívající 3 různých laboratoří. Prvky panelu byly testovány s hodnotou CO 1,0 RLU/CO v různých dnech s různými běhy využívajícími identickou množinu prvků panelu s prokázanou pozitivitou nebo negativitou na HPV. Panel se skládal z 5 pozitivních, 2 vysoce negativních / nízko pozitivních a 5 negativních prvků.

Každý prvek panelu byl připraven kombinací jedinečných klinických vzorků odebraných v SurePath Preservative Fluid (konzervační kapaliny SurePath) o známém negativním a pozitivním stavu HPV pro získání požadovaných cílových hodnot RLU/CO. Každý prvek panelu byl testován dvojmo dvakrát denně po dobu 5 dnů v každé ze 3 účastnických laboratoří (viz tabulka 49 níže).

Tabulka 49. Reprodukovatelnost vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet – ruční testování, kvalitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	Průměrný RLU/CO	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

Automatické testování RCS

Reprodukovatelnost výsledků vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet s využitím automatického testování RCS byla porovnána s výsledky získanými pomocí ručního testování. Byly testovány dva samostatné alikvotní podíly z téhož zpracovaného vzorku SurePath z post-gradientních buněčných pelet (ze stejného klinického vzorku) (viz tabulka 50 níže).

Tabulka 50. Reprodukovatelnost vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet – automatické testování RCS; shoda výsledků mezi automatickým testováním RCS a ručním testováním

Pozitivní shoda (%) (n/N) 95 % CI		Negativní shoda (%) (n/N) 95 % CI	
Všechny pozitivní	Silně pozitivní oblast (RLU/CO $\geq 2,5$)	Všechny negativní	Silně negativní oblast (RLU/CO $< 0,80$)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

Příprava vzorku ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Byla provedena studie pro hodnocení reprodukovatelnosti výsledků získaných pomocí simulovaných vzorků SurePath. Po přípravě vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media následovalo automatické testování RCS testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. 4 pozitivní členové panelu byli připraveni přidavkem HPV DNA pozitivních buněk SiHa k HPV DNA negativním buňkám H9 v kapalině SurePath Preservative Fluid, zatímco člen HPV DNA negativního panelu obsahoval pouze HPV DNA negativní buňky H9 v kapalině SurePath Preservative Fluid.

Testování v 6 různých dnech prováděli tři různí členové obsluhy pomocí 3 různých přístrojů QIASymphony SP a 3 různých šarží sad QIASymphony DSP HPV Media s členy panelu 1N, 2E, 3P, 4P a 5P. Členové panelu 1N, 2E, 3P a 4P byli testováni s 18 replikáty v 37 odlišných běžích, což přineslo 666 datových bodů pro členy panelu 2E a 3P a 665 datových bodů pro členy panelu 1N a 4P. Člen panelu 5P byl testován s 16 replikáty v 37 různých běžích, což přineslo 590 datových bodů. Čtyři datové body byly vyloučeny kvůli nedostatečnému objemu, což signalizoval přístroj QIASymphony SP během přípravy vzorku.

U prvků panelu s průměrným RLU/CO 20 % nebo více nad CO bylo pozitivních 1921 ze 1921 (100,0 %). U prvků panelu s průměrným RLU/CO v rozmezí 20 % nad nebo pod CO bylo pozitivních 410 ze 666 (61,6%) a 256 ze 666 (38,4%) bylo negativních. U prvků panelu s průměrným RLU/CO o 20 % nebo více pod CO bylo negativních 664 ze 665 (99,8%) (viz tabulka 51 níže).

Tabulka 51. Reprodukovatelnost vzorků SurePath — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvalitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	Buněčný typ	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa a H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa a H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa a H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa a H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Výsledky hodnocení signalizují, že u vzorků SurePath, které se liší od hodnoty CO o 20 % a více, lze očekávat, že budou vykazovat konzistentní výsledky. Vzorky SurePath v blízkosti hodnoty CO vykazovaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že příprava vzorků u vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media a následovaná testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dává reprodukovatelné výsledky.

Byly rovněž použity výsledky vnitřní studie pro vyhodnocení kvantitativní reprodukovatelnosti výsledků získaný přípravou vzorku u klinických vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media (viz tabulka 51 níže).

Testování v 6 různých dnech prováděli tři různí členové obsluhy pomocí 3 různých přístrojů QIASymphony SP a 3 různých šarží sad QIASymphony DSP HPV Media s členy panelu 1N, 2E, 3P, 4P a 5P. Členové panelu 1N, 2E, 3P a 4P byli testováni s 18 replikáty v 8 různých bězích, kdy pro každého člena panelu bylo získáno 162 datových bodů. Člen panelu 5P byl testován 16 replikáty, které poskytly 144 datových bodů (viz tabulka 52 níže).

Tabulka 52. Reprodukovatelnost vzorků SurePath — příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvantitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	n	Průměrný RLU/CO	Směrodatná odchylka			Odhadovaná celková směrodatná odchylka	Odhadovaný celkový CV (%)
			V rámci běhů	Mezi dny	Mezi kombinacemi*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

*Běh se skládá z kombinace sady QIASymphony DSP HPV Media, přístroje QIASymphony SP a člena obsluhy v konkrétní den.

Kvantitativní reprodukovatelnost je velmi vysoká, jak o tom svědčí všechny hodnoty CV zůstávající pod 26 %. Směrodatné odchylky mezi běhy jsou srovnatelné s odpovídající hodnotou v rámci běhů, což signalizuje konzistentní výsledky bez ohledu na použitý přístroj nebo šarži sady

Příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientní buněčné pelety pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Byla provedena studie hodnotící reprodukovatelnost výsledků získaných pomocí simulovaných vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet. Po přípravě vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media následovalo automatické testování RCS pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. K napodobení vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet byl použit materiál určený pro buněčnou kultivaci vložený do 70% konzervační kapaliny SurePath. 4 pozitivní prvky panelu byly připraveny tak, že k buňkám H-9 negativním na DNA HPV- v konzervační kapalině SurePath byly přidány buňky SiHa pozitivní na DNA HPV, zatímco

negativní prvek panelu obsahoval buňky H-9 negativní na DNA HPV v konzervační kapalině SurePath.

Testování v 6 různých dnech prováděli čtyři různí členové obsluhy pomocí 3 různých přístrojů QIASymphony SP a 3 různých šarží sady QIASymphony DSP HPV Media s prvky panelu 1, 2, 3, 4 a 5. Prvky panelu 1, 2, 3 a 4 byly testovány s 18 replikáty v 37 různých běžích, což přineslo 666 datových bodů pro prvky panelu 1 a 3 a 665 datových bodů pro prvky panelu 2 a 4. Dva datové body byly vyloučeny kvůli nedostatečnému objemu, což signalizoval přístroj QIASymphony SP během přípravy vzorku. Prvek panelu 5 byl testován s 16 replikáty v 37 různých běžích, což přineslo 592 datových bodů.

U prvků panelu s průměrem RLU/CO 20 % nebo více nad hodnotou CO bylo pozitivních 1923 z 1923 (100,0 %). U prvků panelu s průměrem RLU/CO v rozmezí nad 20 % hodnoty CO nebo pod ní bylo pozitivních 416 ze 665 (62,6 %) a 249 ze 665 (37,4 %) bylo negativních. U prvků panelu s průměrem RLU/CO o 20 % a více pod hodnotou CO bylo negativních 666 ze 666 (100 %; viz tabulka 53 níže).

Tabulka 53. Reprodukovatelnost vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet – příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvalitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	Buněčný typ	Průměr RLU/CO	Směrodatná odchylka	CV (%)	Pozitivní výsledek testu (%) (n/N)
1	H-9	0,12	0,02	18,77	0,0 (0/666)
2	SiHa a H-9	0,96	0,11	11,15	62,6 (416/665)
3	SiHa a H-9	4,72	0,56	11,89	100,0 (666/666)
4	SiHa a H-9	9,34	0,98	10,46	100,0 (665/665)
5	SiHa a H-9	24,9	3,37	13,55	100,0 (592/592)

Výsledky hodnocení signalizují, že u vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet, které se liší od hodnoty CO o 20 % a více, lze očekávat, že budou vykazovat konzistentní výsledky. Vzorky SurePath z post-gradientních buněčných pelet v blízkosti hodnoty CO vykazovaly přibližně stejný počet pozitivních a negativních výsledků. Tyto údaje ukazují, že příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media následovaná testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dává reprodukovatelné výsledky.

Byly rovněž použity výsledky interní studie pro vyhodnocení kvantitativní reprodukovatelnosti výsledků získaných přípravou vzorku z klinických vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media.

Testování v 6 různých dnech prováděli čtyři různí členové obsluhy pomocí 3 různých přístrojů QIASymphony SP a 3 různých šarží sady QIASymphony DSP HPV Media s prvky panelu 1, 2, 3, 4 a 5. Prvky panelu 1, 2, 3 a 4 byly testovány s 18 replikáty, kdy každý prvek panelu získal 162 datových bodů. Prvek panelu 5 byl testován s 16 replikáty, které poskytly 144 datových bodů (viz tabulka 54 níže).

Tabulka 54. Reprodukovatelnost vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet – příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media; kvantitativní reprodukovatelnost

Prvek panelu	n	Průměr RLU/CO	Směrodatná odchylka			Odhadovaná celková směrodatná odchylka	Odhadovaný celkový CV (%)
			V rámci běhů	Mezi dny	Mezi kombinacemi*		
1	162	0,12	0,02	0,00	0,01	0,02	19,80
2	162	1,00	0,08	0,02	0,06	0,10	10,27
3	162	4,99	0,37	0,13	0,38	0,55	11,00
4	162	9,78	0,61	0,23	0,54	0,85	8,72
5	144	26,40	2,19	0,70	1,51	2,75	10,41

* Mezi kombinacemi různých dnů, pracovníků obsluhy, šarží sady QIASymphony DSP HPV Media a přístrojů QIASymphony SP.

Kvantitativní reprodukovatelnost je velmi vysoká, jak o tom svědčí všechny hodnoty CV, které zůstávají pod 20 %. Směrodatné odchylky mezi běhy jsou srovnatelné s odpovídající hodnotou v rámci běhů, což signalizuje konzistentní výsledky bez ohledu na použitý přístroj nebo šarží sady.

Zkřížená reaktivita

Testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA 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. Čištěná DNA virů a plazmidů byla analyzována v koncentracích 4 ng/ml.

Byly testovány následující bakterie a všechny byly v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA negativní:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)

- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 nebo 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)
- *Neisseria sicca* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (kmen Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*

Byla testována následující virová nebo plazmidová DNA, případně lidské sérum, a všechny byly v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA negativní:

- Adenovirus 2

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

- Cytomegalovirus
- Virus Epstein-Barr
- Sérum pozitivní na povrchový antigen hepatitidy B
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Virus lidské imunodeficiency (HIV, RT, DNA)
- Typy HPV 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 a 30

Jediný plazmid, který vykazoval zkříženou reaktivitu v testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byl pBR322. Křížová reaktivita mezi pBR322 a Probe Mix (směs sond) 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 298 klinických vzorků testovaných jako pozitivní testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA nemělo pozitivní výsledky kvůli pBR322, když byly testovány sondou pBR322. Pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA kvůli homologovým sekvencím pBR322 v klinických vzorcích se zdá být nízká.

Zkřížená hybridizace

Testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA bylo testováno osmnáct různých typů HPV (vysoce rizikové a nízko rizikové) v koncentracích 4 ng/ml HPV DNA. Všechny cíle vysoce rizikového HPV byly pozitivní. Tato studie rovněž ukázala, že je tu malé množství zkřížené hybridizace mezi typy HPV 6 a 42 a testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Vzorky pacientů s vysokými hladinami (4 ng/ml nebo vyšší) typů HPV 6 nebo 42 mohou mít falešně pozitivní výsledky testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Klinická významnost spočívá v tom, že pacientky s typy HPV 6 nebo 42 s 4 ng/ml nebo vyšší mohou být zbytečně doporučeny na kolposkopii.

Rovněž se ukázalo, že test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA 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 stupně (15). 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 (35). 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.

Účinek krve a jiných látek na vzorky STM

V testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byl vyhodnocen účinek krve a jiných, potenciálně rušících, definovaných či nedefinovaných látek. K STM negativním a STM 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 těchto vzorcích nalézt.

U žádné ze čtyřech látek nebyly v žádné koncentraci pozorovány žádné falešně pozitivní výsledky. Falešně negativní výsledek však může být hlášen v klinických vzorcích s úrovní DNA HPV v blízkosti CO v případě testu (1 pg/ml), pokud jsou přítomny vysoké koncentrace antifungálního krému nebo antikoncepčního gelu. Je však velmi nepravděpodobné, že se klinické vzorky budou skládat téměř výlučně z jedné z těchto látek, protože se děložní čípek pravidelně čistí před získáním vzorků pro stěry z děložního čípku a testování HPV.

Účinek krve a jiných látek na vzorky PreservCyt

Ruční příprava vzorků

V testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA byl vyhodnocen účinek krve a jiných, potenciálně rušících, definovaných či nedefinovaných látek přítomných ve vzorcích PreservCyt. K PreservCyt 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 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 High-Risk HPV DNA.

Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Účinky krve a jiných potenciálně rušivých látek ve vzorcích PreservCyt byly vyhodnoceny pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media pro přípravu vzorku a automatické testování RCS pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Byly testovány účinky následujících potenciálně rušivých látek: Anti-fungal cream

- Antifungální krém
- Protizánětlivý krém
- Krev
- Antikoncepční gel

- Vaginální roztok
- Ženské deodorační čípky
- Lubrikační gel
- Spermicid

Každá látka byla přidána ke klinickému souboru negativních a pozitivních vzorků. U žádné látky nebyly pozorovány falešně pozitivní ani falešně negativní výsledky v koncentracích, které je možné nalézt u cervikálních vzorků. Falešně negativní výsledek však může být hlášen v klinických vzorcích s úrovní DNA HPV v blízkosti CO v případě testu, pokud jsou přítomny vysoké koncentrace antifungálního krému vaginálního lubrikačního gelu nebo krve. Je však velmi nepravděpodobné, že se klinické vzorky budou skládat téměř výlučně z jedné z těchto látek, protože se děložní čípek pravidelně čistí před získáním vzorků pro stěry z děložního čípku a testování HPV.

Příprava vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA

Účinek celé krve ve vzorcích PreservCyt byl hodnocen pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA pro přípravu vzorku a poté testován testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Byly vybrány a testovány klinické vzorky s viditelnými stopami krve jak pomocí ruční metody přípravy vzorku, tak automatické metody přípravy vzorku s využitím sady QIASymphony DSP AXpH. Výsledky byly porovnány pro 238 vzorků a dosáhly celkové shody 94,12%, přičemž McNemarova hodnota $p = 0,2850$ neukazovala na statisticky významný rozdíl v klinickém chování mezi ruční metodou přípravy vzorku a automatickou metodou přípravy vzorku s využitím sady QIASymphony DSP AXpH.

Byly testovány účinky následujících potenciálně rušivých látek:

- Vaginální roztok
- Antifungální krém
- Antikoncepční gel
- Mononukleární buňky periferní krve (PBMC)
- Lubrikační gel
- Dámský intimní sprej
- Spermicid
- Magnetické částice
- Kapalina TopElute

Každá látka byla přidána do negativních a pozitivních buněčných souborů v koncentracích, které lze nalézt v cervikálních vzorcích nebo které mohou být přidány během přípravy vzorku. U žádné z látek nebyla v žádné koncentraci pozorována žádná z uvedených látek. Nebyly zjištěny

žádné falešně negativní výsledky s výjimkou antikoncepčního gelu. Neodebírejte cervikální vzorky PreservCyt pro automatickou přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP AXpH DNA, pokud je přítomno antikoncepční želé.

Účinek krve a jiných látek na vzorky SurePath

Příprava vzorku ze vzorků SurePath pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Účinky krve a jiných potenciálně rušivých látek ve vzorcích SurePath byly vyhodnoceny pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media pro přípravu vzorku a automatickou analýzou RCS- pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Byly testovány účinky následujících potenciálně rušivých látek:

- Antifungální krém
- Protizánětlivý krém
- Krev
- Antikoncepční gel
- Vaginální roztok
- Ženské deodorační čípky
- Lubrikační gel
- Spermicid

Každá látka byla přidána ke klinickému souboru negativních a pozitivních vzorků. U žádné látky nebyly pozorovány falešně pozitivní výsledky v koncentracích, které je možné nalézt u cervikálních vzorků.

Nebyly zjištěny žádné falešně negativní výsledky s výjimkou následujících látek.

- Antikoncepční želé způsobovalo falešně negativní výsledky ve velmi nízkých koncentracích.
- Pokud bude přítomna vysoká koncentrace antifungálního krému ve vzorcích, může být u klinických vzorků s hladinami HPV DNA blízkých CO hlášen falešně negativní výsledek testu. Je však velmi nepravděpodobné, že se klinický vzorek bude téměř výlučně skládat z antifungálního krému, protože se děložní čípek pravidelně čistí před získáním vzorků pro stěry z děložního čípku a testování HPV.

Neodebírejte cervikální vzorky SurePath pro automatickou přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media, pokud je zde přítomno antikoncepční želé nebo antifungální krém.

Příprava vzorku ze vzorků SurePath z post-gradientních buněčných pelet pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media

Účinky krve a jiných potenciálně rušivých látek ve vzorcích SurePath z post-gradientních buněčných pelet byly vyhodnoceny pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media pro přípravu vzorku a automatickou analýzou RCS pomocí testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Byly testovány účinky následujících potenciálně rušivých látek:

- Antifungální krém
- Protizánětlivý krém
- Krev
- Antikoncepční gel
- Vaginální roztok
- Ženské deodorační čípky
- Lubrikační gel
- Spermicid

Každá látka byla přidána do negativních a pozitivních klinických souborů, které byly následně zpracovány systémem BD PrepMate s cílem napodobit vzorek SurePath z post-gradientních buněčných pelet. Jak u krve, tak u antifungálního krému byl zaznamenán jeden falešně pozitivní výsledek; avšak statistická analýza neprokázala významné interference. U žádné jiné látky v koncentraci, kterou je možné zjistit v cervikálních vzorcích, nebyly pozorovány žádné falešně pozitivní výsledky.

U antifungálního a protizánětlivého krému a antikoncepčního žele nebyly zaznamenány žádné falešně negativní výsledky. Neodebírejte cervikální vzorky SurePath pro automatickou přípravu vzorku pomocí sady QIASymphony DSP HPV Media, pokud je zde přítomno antikoncepční žele nebo antifungální či protizánětlivý krém.

Přenos

RCS byl navržen k minimalizaci kontaminace vzorků či přenosu zbytkové alkalické fosfatázy používáním jednorázových pipetových hrotů pro nasávání reagentie a vzorku. Pro potvrzení této charakteristiky designu společnost QIAGEN provedla několik studií s cílem vyhodnotit, zda používání RCS zvýšilo potenciál pro přenos nebo zkříženou kontaminaci vzorků v porovnání s ruční metodou. K hodnocení potenciálního přenosu ze systému na systém bylo použito více přístrojů RCS.

V jedné studii byly přidány 2 ng a 20 ng plazmidu DNA HPV do materiálu negativní kontroly pro přípravu vysoce pozitivních vzorků STM. Koncentrace 20 ng/ml dává hodnoty RLU přibližně 3–5 vyšší než hodnoty nejvyšších pozitivních klinických vzorků, které by se měly podle očekávání pozorovat během rutinního klinického testování. Tyto simulované vysoce pozitivní vzorky byly šachovnicově umístěny na mikrodestičku, kdy se střídaly s jamkami obsahujícími pouze negativní kontrolu (zkušební jamky). Tento design zvažuje potenciální přídatné účinky sekvenčních vysoce pozitivních vzorků. Mikrodestičky pak byly testovány pomocí jak ručních, tak automatických testovacích metod RCS. Po zpracování byla porovnána čísla jamek falešně pozitivních testů. Automatické testování RCS neprodukovalo více jamek s falešně pozitivními testy než ruční testování s těmito stimulovanými vzorky STM, a to i v případě, kdy byly na mikrodestičce přítomna extrémně vysoká sekvence pozitivních vzorků.

V druhém hodnocení přenosu byly kombinovány vzorky PreservCyt HPV pozitivní pacientky s cílem vytvořit panel vzorků s různými hladinami chemiluminiscence pro získání hodnot RLU/CO představujících očekávaný rozsah během rutinního klinického automatického testování RCS. Pozitivní vzorky se pohybovaly přibližně v rozsahu 200–1800 RLU/CO. Pro hodnocení potenciálu pro přenos včetně potenciálních přídatných účinků sekvenčních vysoce pozitivních vzorků byly tyto prvky pozitivního panelu šachovnicově umístěny na mikrodestičky vedle jamek negativní kontroly. Tyto desky byly poté testovány s využitím automatické testovací metody RCS.

Výsledky tohoto hodnocení přenosu využívající sdružené vzorky pacientek naznačují potenciální míru falešné positivity 0,3 % díky přenosovým účinkům při provádění automatického testování RCS testem *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Zkušenosti společnosti QIAGEN při provádění testů se sdruženými vzorky PreservCyt naznačují, že sdružování patientských vzorků vytváří vzorky, které nevykazují charakteristiky podobným jednotlivým patientským vzorkům. Přestože jsou účinky tohoto sdružení potenciálního přenosu automatického testování RCS neznámé, dodatečné preklinické testování automatického testování RCS neprokázalo zvýšený potenciál pro falešně pozitivní výsledky kvůli přenosu. Tato hodnocení byla prováděna pomocí umělých plazmidových vzorků s koncentracemi DNA téměř 5krát vyššími, než které byly pozorovány v klinickém nastavení.

Třetí hodnocení přenosu vytvořilo testovací vzorky přidáním fluorescenčního barviva v koncentracích představujících dynamický rozsah RLU analýzy pro podkladové matrice, které aproximovaly viskozitu klinických vzorků a reagentie testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Tyto testované vzorky pak byly zpracovány pomocí 3 samostatných přístrojů RCS a byl vyhodnocen potenciál přenosu pro každý následující klíčový procedurální krok RCS:

- Přenos vzorku
- Přenos z desky na desku
- Přídavek sondy
- Třepání mikrodestičkou
- Promývání mikrodestičky

Výsledná fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 535 nm a byla dostatečně citlivá pro detekci případu přenosu v řádu 1:20.000, což by odpovídalo falešně pozitivnímu výsledku u testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (tj. 1 pg v 20 ng). Výsledky tohoto hodnocení neprokázaly žádný případ přenosu během kteréhokoliv z klíčových procedurálních kroků RCS, který by vedl k falešně pozitivnímu výsledku testu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Stabilita reagensí ponechaných v přístroji

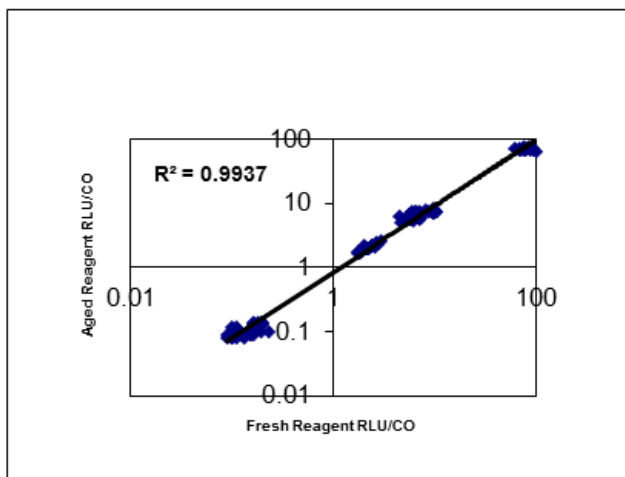
Společnost QIAGEN hodnotila charakteristiky chování automatického testování RCS při použití reagensí, které zůstaly uloženy v platformě systému dlouhá období. Reagencie, u nichž je největší pravděpodobnost, že zůstanou umístěny v přístroji, zahrnují Probe Mix (směs sond), DR1, DR2 a Capture Microplate (záchytová mikrodestička).

Chování testu bylo hodnoceno s využitím čerstvě připravených reagensí a reagensí, které v přístroji RCS zestály při pokojové teplotě po dobu 16 hodin (pro simulaci 2směnného provozu v laboratoři). Testování simulovaných klinických vzorků probíhalo na 2 přístrojích RCS, 2 testovací dny na každém z nich, s definovanou maticí reagensí (viz tabulka 55 níže).

Tabulka 55. Design studie pro stabilitu reagensí ponechaných v přístroji

Přístroj RCS	Den 1	Den 2
1	Přístroje, které zůstaly v přístroji	Čerstvé reagencie
2	Čerstvé reagencie	Přístroje, které zůstaly v přístroji

Všechny vynesené datové body RLU/CO jsou zachyceny na následujícím obrázku 3. Vynesené body a regresní analýza pro reagentie ponechané v přístroji versus čerstvé reagentie vykazují shodu mezi reagentiemi ponechanými v přístroji a čerstvými reagentiemi.



Obrázek 3. Bodový graf porovnávací kalibrátor analýzy a hodnoty kontroly při použití reagentií ponechaných v přístroji a čerstvých reagentií.

Další zkoumání výsledků shody výsledků ukazuje, že se při použití reagentií ponechaných v přístroji neobjevily žádné kvalitativní změny (viz tabulka 56 níže).

Tabulka 56. Shoda čerstvých reagentií a reagentií ponechaných v přístroji

Statistická měření	Výsledek
Celková shoda (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
95 % CI	97.97–100.0
Pozitivní shoda (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
95 % CI	97.97–100.0
Negativní shoda (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
95 % CI	97.97–100.0
R ²	0.9937
Sklon	0.97
Průsečík	0.47
Kappa	1.0

Analýza údajů ukazuje, že výsledky jsou statisticky shodné pro čerstvé reagenty a reagenty ponechané v přístroji, což znamená, že jsou reagenty dostatečně stabilní, pokud v přístroji zůstanou po dobu až 16 hodin.

Literatura

1. Broker, T. R. and Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: Botchan, M., Grodzicker, T., and Sharp, P., eds. *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A.T. and Reid, R. (1989) Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1**, 123.
3. Jenson, A.B., Kurman, R.J., and Lancaster, W.D. (1984) Human papillomaviruses. In: Belshe, R.B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG Wright, p 951.
4. Becker, T.M., Stone, K.M., and Alexander, E.R. (1987) Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **14**, 389.
5. McCance, D.J., Walker, P.G., Dyson, J.L., Coleman, D.V., and Singer, A. (1983) Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br. Med. J.* **287**, 784.
6. Naghashfar, Z. et al. (1985) Identification of genital tract papillomaviruses HPV 6 and HPV 16 in warts of the oral cavity. *J. Med. Virol.* **17**, 313.
7. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 560.
8. Munoz, N., Bosch, F.X., Shah, K.V., and Meheus, A., eds. (1992) *IARC Scientific Publications no. 119: The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
9. Reid, R. et al. (1987) Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156**, 212.
10. Fuchs, P.G., Girardi, F., and Pfister, H. (1988) Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer* **41**, 41.

11. Lorincz, A.T., Temple, G.F., Kurman, R.J., Jenson, A.B., and Lancaster, W.D. (1987) Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 671.
12. Lorincz, A.T., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1986) Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **58**, 225.
13. Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain Hobson, S., and Orth, G. (1986) A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246.
14. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1987) A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* **159**, 187.
15. Meyer, T. et al., (1998) Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J. Infect. Dis.* **178**, 252.
16. Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328.
17. Longuet, M., Beaudenon, S., and Orth, G. (1996) Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 738.
18. Naghashfar, Z.S., Rosenshein, N.B., Lorincz, A.T., Buscema, J., and Shah, K.V. (1987) Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18 related virus of the genital tract. *J. Gen. Virol.* **68**, 3073.
19. Nuovo, G.J., Crum, C.P., de Villiers, E.M., Levine, R.U., and Silverstein, S.J. (1988) Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virol.* **62**, 1452.
20. Shimoda, K., Lorincz, A.T., Temple, G.F., and Lancaster, W.D. (1988) Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **69**, 2925.










21. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., McAllister, P., and Temple, G.F. (1989) Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J. Gen. Virol.* **70**, 3099.
22. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., Schmidt, B.J., and Temple, G.F. (1989) Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low grade cervical neoplasia. *J. Virol.* **63**, 2829.
23. Beaudenon, S. et al. (1987) Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* **161**, 374.
24. Schiffman, M. (1993) Latest HPV findings: some clinical implications. *Contemp. Ob. Gyn.* **38**, 27.
25. Volpers, C.; and Streeck, R.E. (1991) Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419.
26. Matsukura, T., and Sugase, M. (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* **177**, 833.
27. Rho, J., Roy-Burman, A., Kim, H., de Villiers, E.M., Matsukura, T., and Choe, J. (1994) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* **203**, 158.
28. Bosch, F.X. et al. (1995) International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796.
29. Kahn, T., Schwarz, E., and zur Hausen, H. (1986) Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **51**, 61.
30. Koutsky, L.A. et al. (1992) 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.
31. Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Stellato, G., Vaheri, A., Soares, V.R.X., Paavonen, J. (1991) Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA p 77.

32. Centers for Disease Control (1987) Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 36(Suppl 2), 3S.
33. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R., and Melnick, J.L. (1981) Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 762.
34. Martin, L.S., McDougal, J.S., and Loskoski, S.L. (1985) Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. *J. Infect. Dis.* **152**, 400.
35. Vernon, S.D., Unger, E.R., and Williams, D. (2000) Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 651.
36. Coleman, D. et al. (1993) European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Europe against cancer programme. *Eur. J. Cancer* 29A(Suppl. 4), S1.
37. Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Jaffurs, W.J., Marlow, J., Quinn, A.P., and Temple, G.F. (1990) Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **162**, 645.
38. Morrison, E.A.B. et al. (1991) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case control study. *Int. J. Cancer* **49**, 6.
39. Wheeler, C.M., Stewart, A.M., Gravitt, P.E., and Cheng, S. (1995) Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Res.* **5**, 79.
40. Burk R.D. et al. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* **23**, 333.
41. Belinson, J. et al. (2009) Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: implications for vaginal self-collection. *Int. J. of Cancer* **127**, 1151.
42. Zhao, F. et al. (2012) Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J. Natl Cancer Inst.* **104**, 178.

-
43. Lazcano-Ponce, E. et al. (2011) Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomized controlled trial. *Lancet* **378**, 1868.
 44. Lazcano-Ponce, E. et al. (2014) Specimen self-collection and HPV DNA screening in a pilot study of 100,242 women. *Int. J. Cancer* **135**, 109.
 45. Szarewski, A. et al. (2007) Human papillomavirus testing by self-sampling: assessment of accuracy in an unsupervised clinical setting. *J. Med Screen* **14**, 34.
 46. NCCLS (1999) *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices: Approved Guideline*. NCCLS document E5-A.

Symboly

V tomto návodu k použití jsou používány symboly uvedené v následující tabulce.

Symbol	Definice symbolu
 96	Obsahuje reagentie dostačující pro 96 testů
 384	Obsahuje reagentie dostačující pro 384 testů
	Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Katalogové číslo
	Výrobce
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství
	Použijte do
	Další informace viz návod k použití
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN

Řešení problémů

Komentáře a návrhy

Nesprávná nebo žádná barevná změna pozorovaná během denaturace.

- | | |
|--|--|
| a) DNR nebyl řádně připraven | Zajistěte, aby DNR obsahovala Indicator Dye (barva indikátoru) a měl tmavě fialovou barvu. |
| b) DNR nebyla přidána | Přidejte DNR ke vzorku měřením objemu vzorku (očekává se 1,5 ml). Pokud objem signalizuje, že DNR nebyla přidána, přidejte správné množství, promíchejte a pokračujte v testu, pokud byla poté zpozorována odpovídající změna barvy. |
| c) Vzorky obsahují krev nebo jiné materiály, které maskují změnu barvy | Popsaná přesná změna barvy se u těchto typů vzorků neočekává; výsledky testů by neměly být nepříznivě ovlivněny. |
| d) pH vzorků může být neobvykle kyselé | Pokud neplatí žádná jiná příčina, vzorky mohou být neobvykle kyselé a očekávaná změna barvy nenastane. Před použitím kyseliny octové na děložní čípek odeberte nový vzorek, protože nesprávné pH vzorku nepříznivě ovlivní výsledky testu. |

Kontroly kvality dávají nesprávné výsledky

- | | |
|---|--|
| a) Pro test byl vybrán nesprávný protokol analýzy | Pokud protokol analýzy neodpovídá prováděnému testu, analyzujte mikrodestičku znovu do 30 minut po přidání DR2 s využitím správného protokolu analýzy. |
| b) Zpětné umístění QC1-LR a QC2-HR | Vzorky znovu otestujte. |
| c) Zpětné umístění HRC a QC2-HR | Vzorky znovu otestujte |

Komentáře a návrhy

Nesprávná nebo žádná barevná změna pozorovaná během hybridizace.

- | | |
|--|--|
| a) Neadekvátní smíchání Probe Mix (směs sondy) s denaturovanými kalibrátory, kontrolami kvality a/nebo vzorky, případně nebyla Probe Mix (směs sondy) přidána, nebo byl přidán nesprávný objem reagensie | Další 2 minuty třepejte hybridizační mikrodestičkou nebo stojanem mikrozkuvek obsahujícím mikrozkuvku. Pokud existují mikrozkuvky nebo jamky mikrodestičky, které stále zůstávají fialové, přidejte dodatečných 25 μ l správné Probe Mix (směs sondy) a dobře promíchejte. Pokud po přidavku Probe Mix (směs sondy) a opakovaném promíchání nedojde k žádoucí změně barvy a vzorek neobsahuje krev ani jiné materiály, vzorek znovu otestujte. |
| b) Vzorky obsahují krev nebo jiné materiály, které maskují změnu barvy | Popsaná přesná změna barvy se u těchto typů vzorků neočekává; výsledky testů by neměly být nepříznivě ovlivněny. |
| c) Vzorek měl <1.000 μ l STM | Zkontrolujte objem původního vzorku. Objem by měl být 1.425 μ l \pm 20 μ l (od odebrání 75 μ l alikvotního množství pro testování). Pokud bude objem 1.425 μ l, původní vzorek obsahoval <1.000 μ l STM. Získejte nový vzorek. |

Test neuspěl při validaci analýzy. V pozitivních kalibrátorech, kontrolách kvality nebo vzorcích nebyl pozorován žádný signál.

- | | |
|---|--|
| a) Do Probe Diluent (ředidlo sondy) nebyla přidána žádná sonda | Připravte Probe Mix (směs sondy) podle popisu uvedeného v tomto návodu k použití. Zkuvky pečlivě označte. |
| b) Sonda kontaminována RNázou během přípravy | Při pipetování sondy používejte pipetové hroty s aerosolovou bariérou a noste rukavice. Připravte Probe Mix (směs sondy) ve sterilní nádobě. Používejte pouze čisté, nové, jednorázové nádoby na reagensie. |
| c) Neadekvátní míchání Probe Mix (směs sondy) | Po přidavku Probe Diluent (ředidlo sondy), důkladně promíchejte protřepáním při vysoké rychlosti nejméně 5 sekund. Musí dojít k viditelnému protřepání. |
| d) Neadekvátní míchání Probe Mix (směs sondy) a denaturovaného vzorku | Po přidavku Probe Mix (směs sondy) a vzorku do každé jamky hybridizační mikrodestičky nebo hybridizační mikrozkuvky protřepejte na třepače Rotary Shaker I nastavené na 1.100 \pm 100 ot/min po 3 \pm 2 minuty. Zkontrolujte změnu barvy z fialové na žlutou v každé jamce mikrodestičky nebo mikrozkuvce. |

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|--|
| e) Nesprávná doba či teplota během hybridizačního kroku | Hybridizujte po 60 ± 5 minut při $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Zkontrolujte teplotu Microplate Heater I (ohříváč mikrodestičky I) nebo 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 je zapotřebí periodicky kalibrovat. |
| f) Neadekvátní míchání během záchyťového kroku | Protřepejte na třepačce Rotary Shaker I 60 ± 5 minut při $20\text{--}25^\circ\text{C}$, jak je to popsáno v tomto návodu. Ověřte otáčky třepačky Rotary Shaker I kalibrací. (Viz Rotary Shaker I Uživatelská příručka (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>)). |
| g) Nepřidání správného množství DR1 nebo inkubace po jinou než stanovenou dobu | Napipetujte $75 \mu\text{l}$ DR1 do každé jamky mikrodestičky 8kanálovou pipetou. Inkubujte při $20\text{--}25^\circ\text{C}$ 30–45 minut. |
| h) Nepřidání správného množství DR2 nebo inkubace po jinou než stanovenou dobu | Napipetujte $75 \mu\text{l}$ DR2 do každé jamky mikrodestičky 8kanálovou pipetou. Inkubujte při $20\text{--}25^\circ\text{C}$ 15–30 minut. |
| i) Vadná funkce přístroje DML nebo nesprávné naprogramování | Viz příslušná příručka uživatele přístroje DML a příručka uživatele softwaru, kde jsou další pokyny, nebo kontaktujte technické služby QIAGEN. |

Zvýšené hodnoty RLU v kalibrátorech, kontrolách kvality a/nebo vzorcích (≥ 200 RLU v mnoha nebo všech jamkách mikrodestičky). Test možná neuspěl při validaci analýzy.

- | | |
|---|--|
| a) Nebyla přidána DNR nebo byl přidán nesprávný objem reagensie, případně neadekvátní míchání DNR se vzorky, kalibrátory či kontrolami kvality. | Dbejte na to, aby opakovací pipeta před přidavkem DNR přesně dávkovala. Kalibrované pipety jsou zásadně důležité. Přidejte polovinu objemu DNR 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 by měly po přidavku DNR zfallovět. |
|---|--|

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|---|
| b) Slabá netěsnost v přístroji DML, dvířka netěsní, těsnění okolo dveří je porušené | Zkontrolujte odečet pozadí (měření hrubých dat) přístroje DML odečtem prázdné mikrodestičky. Odečet větší než 50 RLU signalizuje, že je přístroj mírně netěsný. Viz vhodná příručka uživatele přístroje DML, kde jsou další pokyny, nebo kontaktujte technické služby QIAGEN. |
| c) Kontaminace DR2 nebo jamek záchytové mikrodestičky DR1 nebo exogenní alkalickou fosfatázou | Viz „Kontrola kontaminace DR2“, strana 127. |
| d) Kontaminovaný Wash Buffer (promývací pufr) | Viz „Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody“, strana 127. |
| e) Kontaminovaná Automated Plate Washer (automatická promývačka desek) | Viz „Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody“, strana 127. |
| f) Neadekvátní promytí jamek záchytové mikrodestičky po inkubaci DR1 | Důkladně promyjte jamky záchytové mikrodestičky 6krát Wash Buffer (promývací pufr) buď proplachováním jamek, nebo pomocí Automated Plate Washer (automatická promývačka desky). V jamkách mikrodestičky po promývání by neměla být vidět žádná zbytková růžová kapalina. Viz Automated Plate Washer Uživatelská příručka (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>), kde naleznete další pokyny ohledně kontaminace nebo vadných funkcí. |
| g) Kontaminace DR1 jamek mikrodestičky | Zajistěte, aby všechny pracovní povrchy zůstaly čisté a suché. Při použití DR1 postupujte opatrně. Chraňte aerosoly. |
| h) Vysušte hybridizační roztok na témže místě rouškami Kimtowels nebo ekvivalentními papírovými ručníky, které neuvolňují vlákna | Neodsávejte vodu již použitými rouškami Kimtowels nebo ekvivalentními papírovými ručníky, které neuvolňují vlákna. |
| i) Použity nesprávné odsávací roušky | Použijte roušky Kimtowels nebo odpovídající papírové ručníky, které neuvolňují vlákno. |

Komentáře a návrhy

Nízké poměry PC/NC nebo vysoký počet nízko pozitivních vzorků s poměry <2,0 (>20 %).

Test možná neuspěl při validaci analýzy

- | | |
|---|---|
| a) Neadekvátní příprava vzorku | <p>Přidejte správný objem DNR a důkladně promíchejte protřepáváním. Aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům, zajistěte, aby kapaliny promývala celý vnitřní povrch zkumavky.</p> <p>U vzorků PreservCyt zajistěte, že správné míchání a opakovaná suspenze buněčných pelet je dokončena před inkubací denaturace.</p> <p>Byla pozorována význačná barevná změna z průhledné na tmavě fialovou. Inkubujte 45 ± 5 minut při $65 \pm 2^\circ\text{C}$.</p> |
| b) Probe Mix (směs sondy) namíchána neadekvátně nebo přidán nedostatek Probe Mix (směs sondy) | <p>Připravte Probe Mix (směs sondy) jak je uvedeno. Důkladně promíchejte protřepáním, dbejte na to, aby byl vytvořen viditelný vír. Probe Mix (směs sondy) se musí přidat do zkumavek pipetami s pozitivním výtlakem nebo vícekanálovou pipetou, aby byla zajištěna přesná dávka.</p> |
| c) Neadekvátní objem Probe Mix (směs sondy) přidán do každé hybridizační mikrozkušavky nebo jamky mikrodestičky | <p>Dbejte na to, aby 8kanálová pipeta přesně dávkovala před přidáním Probe Mix (směs sondy). Přidejte 25 μl Probe Mix (směs sondy) do každé mikrozkušavky nebo jamky mikrodestičky obsahující denaturované kalibrátory, kontroly kvality a vzorky. Změna barvy by měla být z tmavě fialové do žluté po přidání a důkladném promíchání. Vzorky PreservCyt by se měly změnit na růžovou místo žluté.</p> |
| d) Ztráta aktivity DR1 | <p>Uchovávejte DR1 při $2-8^\circ\text{C}$. Použijte před uplynutím doby použitelnosti.</p> |
| e) Nedostatečný záchyt | <p>Záchyt by se měl provést rotačkou Rotary Shaker I nastavenou na 1.100 ± 100 ot/min. Validujte rychlost třepačky kalibrací.</p> |
| f) Neodpovídající promytí | <p>Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát Wash Buffer (promývací pufr) buď proplachováním jamek, nebo pomocí Automated Plate Washer (automatická promývačka desky).</p> |
| g) Kontaminovaný Wash Buffer (promývací pufr) | <p>Viz „Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody“, strana 127.</p> |

Komentáře a návrhy

Řady pozitivních vzorků s hodnotami RLU sou přibližně stejné.

- | | |
|---|--|
| a) Kontaminace jamek záchytové mikrodestičky během testu | Zakryjte záchytovou mikrodestičku během všech inkubací. Zabraňte expozici zkumavek aerosolové kontaminaci během provádění analýzy. Během manipulace používejte rukavice bez prášku. |
| b) Kontaminace DR2 | Zajistěte, aby nedošlo ke kontaminaci materiálu při pipetování DR2 do jamek záchytové mikrodestičky. Zabraňte kontaminaci DR2 aerosoly z DR1 nebo laboratorním prachem, atd. |
| c) Vadná funkce Automated Plate Washer (automatická promývačka desky) | Viz „Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody,“ stránka 127, nebo viz Automated Plate Washer Uživatelská příručka (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>), kde naleznete další pokyny ohledně kontaminace nebo vadných funkcí. |

Široké CV mezi replikáty.

- | | |
|--|---|
| a) Nepřesné pipetování | Zkontrolujte pipetu, aby bylo zajištěno, že se dávkují reprodukovatelné objemy. Rutinně kalibrujte pipety. |
| b) Nedostatečné míchání | Ve všech krocích důkladně míchejte. Protřepejte před a po inkubaci denaturace a po přidání Probe Mix (směs sond). Zajistěte, aby byl vytvořen viditelný vír. |
| c) Neúplný přenos kapaliny z hybridizačních mikrozkušavek nebo jamek hybridizační mikrodestičky do jamek záchytové mikrodestičky | Zajistěte během přenosu z hybridizační mikrodestičky nebo hybridizačních mikrozkušavek do jamek záchytové mikrodestičky, že budou převedeny reprodukovatelné objemy. |
| d) Nevhodné podmínky promývání | Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát Wash Buffer (promývací pufr) buď proplachováním jamek, nebo pomocí Automated Plate Washer (automatická promývačka desky). |
| e) Kontaminace DR1 jamek mikrodestičky | Zajistěte, aby všechny pracovní povrchy zůstaly čisté a suché. Při použití DR1 postupujte opatrně. Chraňte aerosoly. |

Falešně pozitivní výsledky získané ze známých negativních vzorků.

- | | |
|----------------------|---|
| a) Kontaminovaná DR2 | Dbejte na to, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků, když mezi vzorky převádíte alikvotní množství DR2. |
|----------------------|---|

Komentáře a návrhy

- Pokud používáte pouze část sady, převedte alikvotní objem potřebný pro tento test do čisté jednorázové nádoby reagensů před naplnění pipety.
- b) Kontaminace DR1 jamek mikrodestičky
Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát Wash Buffer (promývací pufr) buď proplachováním jamek, nebo pomocí Automated Plate Washer (automatická promývačka desky). V jamkách mikrodestičky po promývání by neměla být vidět žádná zbytková růžová kapalina.
- c) Odsávejte na stejném místě rouškami Kimtowels nebo ekvivalentními papírovými ručníky neuvolňujícími vlákna v několika řadách
Neodsávejte vodu v místě, které již bylo použito dříve.
- d) Neadekvátní příprava vzorku
Přidejte správný objem DNR a důkladně promíchejte protřepáváním. Aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům, zajistěte, aby kapaliny promývala celý vnitřní povrch zkumavky.
- Při ruční přípravě vzorků PreservCyt se ujistěte, že před inkubací denaturace proběhlo náležité promíchání a resuspendování buněčných pelet. Viz návod k použití sady *digene* HC2 Sample Conversion.
- Byla pozorována význačná barevná změna z průhledné na tmavě fialovou. Inkubujte 45 ± 5 minut při teplotě 65 ± 2 °C. Při ruční přípravě vzorků SurePath dbejte na to, aby byly vzorky inkubovány po 90 ± 5 minut při teplotě 65 ± 2 °C.
- e) Nevhodné podmínky promývání
Důkladně promyjte jamky mikrodestičky 6krát Wash Buffer (promývací pufr) buď proplachováním jamek, nebo pomocí Automated Plate Washer (automatická promývačka desky).
- f) Kontaminace hrotu pipety
Denaturační krok v rámci zpracování vzorku se musí provádět podle pokynů v tomto návodu k použití.

Komentáře a návrhy

nedenaturovaným materiálem během přenosu denaturovaného vzorku do hybridizační mikrozkušavky nebo jamky hybridizační mikrodestičky	Nevhodné protřepání vzorku, obrácení zkumavky dnem vzhůru a míchání může způsobit neúplnou denaturaci nespecifických hybridů RNA–DNA endogenních pro cervikální vzorky. Zvláště u vzorků PreservCyt nebo SurePath je u těchto hybridů pravděpodobné, že budou přítomny na vnitřních stěnách denaturační zkumavky vzorku. Aby nedošlo k přenosu tohoto nedenaturovaného buněčného materiálu, hrot pipety se nesmí dotýkat stran denaturační zkumavky vzorku během přenosu denaturovaného vzorku do hybridizační mikrozkušavky nebo jamky hybridizační mikrodestičky.
--	---

Zvýšené hodnoty NC RLU (>200 RLU). Zbytek testu probíhá podle očekávání.

- | | |
|---|---|
| a) DR2 byla inkubována při teplotě větší než 20–25°C. | Znovu proveďte test a zajistěte, že kroky zachytu a detekce probíhají při teplotě 20–25°C. |
| b) DR2 byla inkubována déle než 30 minut. | Přečtěte mikrodestičku po 15 minutách inkubace (a ne déle než 30 minut inkubace) při 20–25°C. |
| c) DR2 nebo Wash Buffer (promývací pufr) byl kontaminován alkalickou fosfatázou nebo DR1. | Viz „Kontrola kontaminace DR2,“ strana 127 nebo „Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody,“ strana 127. |

Test neuspěl při validaci analýzy. Zvýšený poměr $PC\bar{X}/NC\bar{X}$.

Zpětné umístění HRC a QC2-HR	Vzorky znovu otestujte. Pečlivě si přečtěte štítky na injekčních lahvičkách kalibrátoru a kontrol kvality, aby se zabránilo obrácení umístění těchto reagensů.
------------------------------	--

Kontrola kontaminace DR2

1. Pipetujte 75 µl z alikvotní, reziduální nebo originální injekční lahvičky DR2 do prázdné jamky záchytové mikrodestičky.

Poznámka: Testování DR2 v replikátech po 3 poskytuje optimální hodnocení chování.

2. Inkubujte při 20–25°C po 15 minut. Chraňte před přímým slunečním světlem.
3. Měření mikrodestičky přístrojem DML.

Kontrola DR2 by měla být <50 RLU.

Pokud hodnoty DR2 jsou <50 RLU, DR2 lze použít pro opakování testu.

Pokud bude kontaminovaná (>50 RLU), získejte novou sadu a opakujte test.

Kontrola kontaminace mycího přístroje a/nebo zdroje vody

1. Označte jamky 1–4. Pipetujte 75 µl DR2 do 4 samostatných jamek záchytové mikrodestičky. Jamka 1 slouží jako kontrola DR2.

2. Pipetujte 10 µl promývacího pufru z promývací lahve do jamky 2 mikrodestičky.

3. Nechte promývací pufr protékat skrz potrubí promývačky. Pipetujte 10 µl promývacího pufru z potrubí do jamky 3 mikrodestičky.

4. Získejte alikvotní množství do používané vody pro přípravu promývacího pufru. Pipetujte 10 µl vody do jamky 4 mikrodestičky.

5. Inkubujte při 20–25°C po 15 minut. Chraňte před přímým slunečním světlem.

6. Měření mikrodestičky přístrojem DML.

Kontrola DR2 (jamka 1) by měla být <50 RLU.

Srovnajte RLU z jamek 2, 3 a 4 do RLU kontroly DR2. Individuální RLU pro jamky 2, 3 a 4 by neměly překročit 50 RLU kontroly DR2.

Hodnoty překračující 50 RLU kontroly DR2 indikují kontaminaci. Viz „Metoda ručního promývání,“ strana 57, kde jsou pokyny ohledně čištění a údržby mycího přístroje.

Kontrola kontaminace Automated Plated Washer (automatická promývačka desky)

1. Označte jamky 1–5. Pipetujte 75 µl DR2 do 5 samostatných jamek záchytové mikrodestičky. Jamka 1 slouží jako kontrola DR2.
2. Pipetujte 10 µl Wash Buffer (promývací pufr) z Plate Washer Wash Bottle (promývací lahev promývačky desky) do jamky 2 mikrodestičky.
3. Pipetujte 10 µl oplachovací kapaliny z Plate Washer Wash Bottle (promývací lahev promývačky desky) do jamky 3 mikrodestičky.
4. Stiskněte klávesu „Prime“ (plnění) na klávesnici Plate Washer (promývačka desky), což dovoluje, aby Wash Buffer (promývací pufr) protékal linkami. Pipetujte 10 µl promývacího pufru z nádržky do jamky 4 mikrodestičky.
5. Stiskněte klávesu „Rinse“ (oplachování) na klávesnici Plate Washer (promývačka desky), což dovoluje, aby omývací kapalina protékala linkami. Pipetujte 10 µl Wash Buffer (promývací pufr) z nádržky do jamky 5 mikrodestičky.
6. Zakryjte a inkubujte 15 minut při 20–25°C. Chraňte před přímým slunečním světlem.
7. Měření mikrodestičky přístrojem DML.

Kontrola DR2 (jamka 1) by měla být <50 RLU.

Srovnejte RLU z jamek 2, 3, 4 a 5 do RLU kontroly DR2. Individuální RLU pro jamky 2, 3, 4 a 5 by neměly překročit 50 RLU kontroly DR2.

Hodnoty překračující 50 RLU kontroly DR2 indikují kontaminaci Plate Washer (promývačka desky).

Viz Automated Plate Washer Uživatelská příručka (*Automated Plate Washer User Manual*), kde je uveden postup dekontaminace.

Kontaktní informace

Použijte list s kontaktními informacemi QIAGEN dodávaný s testovací sadou pro kontaktu se svým lokálním představitelem QIAGEN.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, *digene*®, Hybrid Capture®, QIAasymphony®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CDP-Star® (Life Technologies Corporation); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); pGEM® (Promega Corp); PrepMate®, 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 zákonem nechráněné.

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

technologie Hybrid Capture je chráněna Evropským patentem č. 0 667 918 registrovaným v Rakousku, Belgii, Švýcarsku, Lichtenštejnsku, Německu, Dánsku, Španělsku, Francii, Velké Británii, Řecku, Irsku, Itálii, Lucembursku, Nizozemsku a Švédsku.

Patent Hybrid Capture USA

6,228,578B1

Patenty USA HPV

5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173

© 2012- 2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com