



LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

AmpliLute Liquid Media Extraction Kit	EXTRN	50 Tests	P/N: 03750540 190
LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test	LA HPV GT	48 Tests	P/N: 04391853 190
LINEAR ARRAY Detection Kit	LA DK	96 Tests	P/N: 03378179 190
24-Well Tray with Lid		1 Each	P/N: 03140725 001

URČENÉ POUŽITÍ

Genotypizační test LINEAR ARRAY HPV (Lidský papilloma virus) je kvalitativní *in vitro* test pro detekci lidského papilloma viru v klinických vzorcích. Test využívá amplifikaci cílové DNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a hybridizace nukleové kyseliny a detekuje třicet sedm genotypů anogenitální HPV DNA [6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 a CP6108] v cervikálních buňkách odebraných do odběrného média **cobas**[®] PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt[®] Solution.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Perzistující infekce lidským papilloma virem (HPV) je hlavní příčinou karcinomu čípku a předcházející cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN)¹⁻³. Přítomnost HPV byla zaznamenána u více než 99% případů karcinomu čípku na celém světě³. HPV je malý neobalený virus s dvouvláknovou DNA jehož genom obsahuje přibližně 8000 nukleotidů. Existuje více než 100 různých genotypů HPV viru a přibližně 40 různých HPV genotypů, které mohou infikovat sliznici lidského genitálu. Nicméně, pouze podskupina těchto pohlavně přenosných virových genotypů je spojena s vysokým stupněm cervikální dysplázie a karcinomem čípku³⁻⁵. Tyto jsou označovány jako HPV genotypy s vysokým rizikem, zatímco HPV genotypy s nízkým rizikem jsou často spojeny s benigními intraepiteliálními lézemi nízkého stupně nebo condylomy. Sexuálně přenášená infekce HPV je velmi častá. Odhaduje se, že až 75% všech žen je někdy exponováno infekci HPV⁶. Převážná většina HPV infekcí se spontánně vyléčí, ale perzistence HPV s vysokým rizikem je signifikantním rizikovým faktorem pro vznik karcinomu čípku.

V rozvinutých zemích se screeningovými programy karcinomu čípku je od poloviny 50. let používán Pap stěr (pojmenovaný podle Dr. George Papanicolaoua) jako primární nástroj pro detekci časných změn předcházejících karcinomu čípku. I když v těchto zemích došlo k dramatickému snížení mortality na karcinom čípku, Pap stěr vyžaduje interpretaci velmi zkušeným cytopatologem a je relativně nepřesným testem s vysokým počtem falešně negativních výsledků. Cytologické abnormality pozorované v Pap stěru jsou primárně způsobeny infekcí HPV. Nicméně různé zánětlivé a odběrové variace mohou způsobit falešně pozitivní výsledky Pap stěrů. Třídění abnormálních Pap stěrů zahrnuje opakované testování, kolposkopii a biopsii. Histologicky ověřená léze vysokého stupně dysplázie musí být chirurgicky odstraněna pro prevenci vzniku invazivního karcinomu čípku.

Kultivace papilloma viru je v podmínkách *in vitro* extrémně obtížná a protilátková odpověď není u všech pacientů infikovaných HPV prokazatelná. Proto je testování nukleové kyseliny (DNA) metodou PCR senzitivní a neinvazivní metodou pro stanovení přítomnosti aktivní infekce čípku HPV virem. Publikované aplikace typizačního testu HPV zahrnují hodnocení přírůstku a clearance specifických HPV typů⁷, monitorování typově specifické perzistence genotypů spojených s vysokým rizikem karcinomu čípku a cervikální karcinogeneze⁸, efektivitu excizionální terapie⁹, radioterapie¹⁰ nebo chemoterapie¹¹ lézí spojených s infekcí HPV (test léčby), genotypizaci vybraných screeningových programů před a po zavedení vakcíny¹² a usnadnění epidemiologických výzkumů týkajících se historie původu infekce virem HPV.

PRINCIPY PROCEDURY

Genotypizační test LINEAR ARRAY HPV je založen na čtyřech základních procesech: příprava vzorku, PCR amplifikace¹³ cílové DNA použitím HPV primerů, hybridizace amplifikovaných produktů s oligonukleotidovými sondami a detekce amplifikovaných produktů s navázanou sondou pomocí kolorimetrického vyšetření.

Oddíl s informacemi o revizi dokumentu se nachází na konci tohoto dokumentu.

Příprava vzorku pomocí extrakční soupravy AmpliLute Liquid Media Extraction Kit poskytuje cílovou HPV DNA a lidskou genomickou DNA vhodné pro amplifikaci metodou PCR. Směs činidla Master mix obsahuje primery pro amplifikaci DNA celkem od 37 genotypů HPV a lidského genu pro beta-globin. Detekce a stanovení genotypu je prováděno pomocí denaturované amplifikované DNA a sadou oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci jednotlivých genotypů HPV.

Příprava vzorku

HPV DNA je uvolněna lýzou vzorků cervikálních buněk za denaturačních podmínek při zvýšených teplotách. Lýza je prováděna v přítomnosti proteinázy K, chaotropního činidla a detergentu a je následována izolací a purifikací DNA ve sloupci a elucí pomocí elučního činidla. Současně je izolován gen beta-globinu a hodnotí se adekvátnost buněk, extrakce a amplifikace pro každý jednotlivě zpracovaný vzorek.

PCR amplifikace

Volba cíle

Genotypizační test LINEAR ARRAY HPV využívá biotinylované primery pro definování sekvence nukleotidů v rámci polymorfního regionu L1 v genomu HPV, který je dlouhý přibližně 450 párů bází. Zásoba HPV primerů přítomná ve směsi Master Mix je navržena pro amplifikaci HPV DNA z 37 HPV genotypů¹⁴ včetně 13 vysoce rizikových genotypů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68)³⁻⁵. Sekvence sondy Capture jsou umístěny v polymorfních oblastech L1 na něž se váží tyto primery.

Další pár primerů je namířen na gen lidského beta-globinu, aby umožnil kontrolu adekvátnosti buněk, extrakce a amplifikace.

Cílová amplifikace

DNA polymeráza AmpliTaq[®] Gold je používána k "horkému startu" amplifikace cílové HPV DNA a beta-globinové kontroly. Nejprve se reakční směs pro PCR zahřívá, aby se aktivovala DNA polymeráza AmpliTaq[®] Gold pro denaturaci virové DNA a lidské genomické DNA a pro expozici cílových primerových sekvencí. Během ochlazování směsi dochází k připojování primerů (upstream i downstream) k cílové DNA. DNA polymeráza AmpliTaq[®] Gold, v přítomnosti Mg²⁺ a nadbytku dNTPs, polymerizuje připojené primery podél cílových templátů a vytváří molekulu dvouřetězcové cílové HPV DNA se zhruba 450 páry bází nebo molekulu DNA beta-globinu s 268 páry bází, označované amplikon. Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se efektivně zdvojnásobuje množství amplikonové DNA. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HPV nebo genu beta-globinu mezi příslušným primerovým párem. Celý genom amplifikován není.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v genotypizačním testu LINEAR ARRAY HPV použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin¹⁵, ale nikoli DNA obsahující deoxytymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu díky použití deoxyuridin-trifosfátu vedle deoxytymidin-trifosfátu ve směsi činidla Master Mix, takže deoxyuridin je obsažen pouze v amplikonu. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažen ve směsi činidla Master Mix, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku při alkalickém pH směsi činidla Master Mix zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Při teplotách nad 55 °C, tedy během tepelného cyklování, je AmpErase inaktivní, a proto cílový amplikon nerozkládá. Po amplifikaci je případně zbývající enzym denaturován přidávkem denaturačního roztoku, čímž se předejde degradaci cílového amplikonu.

Hybridizační reakce

Po PCR amplifikaci jsou amplikony HPV a beta-globinu chemicky denaturovány přidáním denaturačního roztoku za vzniku jednovláčkové DNA. Alikvotní podíly denaturovaného amplikonu se poté přesunou do příslušné jamky typizační plotny, která obsahuje hybridizační pufr a jeden genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV, který je potažen řadami HPV a beta-globinových sond. Biotinem značený amplikon hybridizuje k oligonukleotidovým sondám pouze tehdy, když amplikon obsahuje odpovídající sekvenci, která je k této sondě komplementární. Kromě toho je genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV potažen jednou zkrříženě reagující oligonukleotidovou sondou, která hybridizuje s HPV genotypy 33, 35, 52 a 58. Amplikon obsahující úzce si odpovídající sekvence (pouze 1 až 3 neshody) komplementární k sondě bude hybridizovat s touto řadou sondy.

Detekční reakce

Po hybridizační reakci je genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV důkladně omyt, aby se odstranil nenavázaný materiál. Potom se k proužku přidá konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou. Ten se váže na biotinem značený amplikon hybridizovaný na oligonukleotidové sondy na proužku. Proužek se opláchne, aby se odstranil nenavázaný konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou a ke každému proužku se přidá substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Navázaný konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou katalyzuje v přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci TMB a vytváří modře zbarvený komplex, který se sráží v pozicích sondy, kde dochází k hybridizaci. Genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV se potom vyhodnocuje vizuálně porovnáním vzorku modrých pásů s referenčním návodem genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV.

ČINIDLA

AmpliLute Liquid Media Extraction Kit

EXTRN

50 testů

Extrakční souprava AmpliLute

P/N: 03750540 190

CAR

(Nosičová RNA)

1 x 310 µg

Syntetická RNA, lyofylizovaná
(Přidejte AVE)

PK

(Proteináza K)

1 x 1,25 ml

Proteináza K, serinová proteináza, tritirachium album

Xn  Proteináza K

Zdraví škodlivý

R: 36/37/38-42/43

Dráždí oči, dýchací orgány a kůži. Může vyvolat senzibilizaci při vdechování a při styku s kůží.

S: 23-24-26-36/37

Nevdechujte aerosoly. Zamezte styku s kůží. Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodný ochranný oděv a ochranné rukavice.

AVE

(Eluční pufr)

4 x 2 ml

Voda prostá RNázy
< 0,09% azid sodný

AW2

(Promývací pufr 2)

1 x 13 ml

Pufr Tris-HCl
< 0,09% azid sodný
(Přidejte absolutní etanol)

ATL

(Tkáňový lytický pufr)

1 x 10 ml


EDTA
≤ 10% dodecyl sulfát sodný

AL

(Lytický pufr)

1 x 33 ml

≤ 50% guanidin HCl

Xn  25-50% guanidin HCl

Zdraví škodlivý

R: 22-36/38

Zdraví škodlivý při požití. Dráždí oči a kůži.

S: 13-26-36-46

Uchovávejte odděleně od potravin, nápojů a krmiv. Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodný ochranný oděv. Při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte tento obal nebo označení.

EXT (Prodlužovače sloupce, 3 ml)	50 kusů
VC (Vac konektory)	50 kusů
ELT (Eluční zkumavky, 1,5 ml)	50 kusů
CLM (Sloupce QIAamp® MinElute®) Křemíková membrána	50 kusů

LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test
Genotypizační test LINEAR ARRAY HPV
(P/N: 04391853 190)

LA HPV GT

48 testů

HPV MMX (LINEAR ARRAY HPV Master Mix)	4 x 0,58 ml
---	-------------

Tris pufr
Chlorid draselný
< 0,02% DNA polymeráza AmpliTaq® Gold (mikrobiální)
< 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)
< 0,001% dATP, dCTP, dUTP, dGTP, dTTP
< 0,001% každý z upstream a downstream primerů (biotinylovaných)
0,06% azid sodný

HPV Mg²⁺ (Roztok magnézia LINEAR ARRAY HPV)	4 x 0,125 ml
--	--------------

< 1% chlorid hořečnatý
amarantové barvivo
0,05% azid sodný

HPV (+) C (Pozitivní kontrola LINEAR ARRAY HPV)	4 x 0,5 ml
---	------------

Tris-HCl pufr
EDTA
< 0,002% poly rA RNA (syntetická)
< 0,001% neinfekční plasmidová DNA (mikrobiální) obsahující HPV sekvence
< 0,001% neinfekční plasmidová DNA (mikrobiální) obsahující sekvence lidského beta-globinu
0,05% azid sodný

HPV (-) C (Negativní kontrola LINEAR ARRAY HPV)	4 x 0,5 ml
---	------------

Tris-HCl pufr
EDTA
< 0,002% poly rA RNA (syntetická)
0,05% azid sodný

HPV Strip (Genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV)	4 x 12 testů
--	--------------


Nylonový proužek potažený sondami HPV DNA a 1 DNA sondou lidského beta-globinu
(s vysokými a nízkými koncentracemi sondy)

LINEAR ARRAY Detection Kit
Detekční souprava LINEAR ARRAY
(P/N: 03378179 190)


LA DK

96 testů

DN (Denaturační roztok)	2 x 12 ml
-----------------------------------	-----------

1,6% hydroxid sodný
EDTA
Thymolová modř
Xi  1,6% hm. hydroxid sodný

Dráždivý

SDS (Koncentrát SDS)	4 x 27 ml
20% laurylsulfát sodný (SDS) 1% konzervační činidlo ProClin® 150	
SSPE (Koncentrát SSPE)	2 x 160 ml
Roztok fosforečnanu sodného Chlorid sodný EDTA 1% konzervační činidlo ProClin® 150	
SA-HRP (Konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou)	2 x 2 ml
Konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou ACES pufr Chlorid sodný 1% konzervační činidlo ProClin® 150	
CIT (Citrátový koncentrát)	2 x 36 ml
Citrátový roztok	
SUB A (Substrát A)	3 x 160 ml
Citrátový roztok 0,01% peroxid vodíku 0,1% konzervační činidlo ProClin® 150	
SUB B (Substrát B)	3 x 40 ml
0,1% 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) 40% dimethylformamid (DMF)	
T  40% hm. dimethylformamid (DMF)	
<p>Toxický</p> <p>R: 61-20/21-36</p> <p>S: 53-45</p>	<p>Může poškodit plod v těle matky. Zdraví škodlivý při vdechování a při styku s kůží. Dráždí oči.</p> <p>Zamezte expozici – před použitím si obzaveďte speciální instrukce. V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte tento označení).</p>

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- A. **PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.**
- B. Tento test je určen pro vyšetření lidských cervikálních buněk odebraných do roztoku **cobas®** PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt Solution.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V pracovních částech laboratoře nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek ochrany očí. Po manipulaci se vzorky a testovými činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Při odebírání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální a DNA kontaminaci činidel. Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a hroty pipet bez DNA a DNázy.
- F. Nedávejte dohromady činidla z různých šarží ani z různých lahvíček stejné šarže.
- G. Nepoužitá činidla a vzniklý odpad zlikvidujte dle celostátních resp. místních předpisů.
- H. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti soupravy.
- I. Bezpečnostní listy (SDS) jsou k dispozici na vyžádání ve Vaší lokální kanceláři společnosti Roche.

- J. Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Preamplifikační činnosti musí začínat přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Materiály a vybavení se musejí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů cílové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
- K. Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními za použití bezpečných laboratorních postupů, například těch, jež jsou popsány v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*¹⁶ nebo v dokumentu CLSI č. M29-A3¹⁷. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

POZN.: Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25%. Ředěním domácího bělicího roztoku 1:10 dostaneme 0,5% roztok chlornanu sodného.

- L. **AW2, AVE, HPV MMX, HPV Mg²⁺, HPV (-) C a HPV (+) C** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olovenými nebo měděnými armaturami a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný v laboratorních výlevkách propláchněte odpad velkým množstvím vody, abyste zabránili hromadění azidu.
- M. Používejte ochranu očí, laboratorní pláště a rukavice na jedno použití při manipulaci s **AL, PK, HPV MMX, HPV Mg²⁺, DN, SA-HRP, SUB A, SUB B** a pracovním substrátem (smíchaná činidla **SUB A** a **SUB B**). Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud byste tuto péči zanedbali, mohly by se na postiženém místě vyvinout popáleniny. Pokud dojde k vylití těchto činidel, před očištěním do sucha je rozřeďte vodou.
- N. **SUB B** a pracovní substrát obsahující dimethylformamid, o němž se zjistilo, že je toxický ve vysokých perorálních dávkách a může být zdraví škodlivý pro nenarozené dítě. Je třeba dbát, aby nedošlo k jejich styku s pokožkou, vdechování výparů ani požití. Pokud ke styku s pokožkou dojde, omyjte ji důkladně vodou a mýdlem a vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.
- O. **AL** obsahuje guanidin-hydrochlorid, který ve styku s bělicím prostředkem může vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny. Pokud se kapalina obsahující tento pufr rozlije, postižené místo vyčistěte vodou s vhodným laboratorním detergentem. Jestliže rozlité kapalina obsahuje potenciálně infekční látky, vyčistěte místo nejprve vodou s vhodným laboratorním detergentem a potom 0,5% chlornanem sodným. Do odpadu obsahujícího **AL** nepřidávejte přímo žádné bělicí ani kyselé roztoky.
- P. Skleněné nebo plastové kontejnery, v nichž je podtlak, mohou potenciálně při použití implodovat, což může způsobit poranění osob. Velmi je doporučeno použití ochrany očí, kdykoli jsou použity skleněné nebo plastové kontejnery s částečným podtlakem, pro ochranu před poraněním. Měly by být používány pouze kontejnery, které jsou specificky navrženy pro tyto aplikace. Nepoužívejte kontejner pro aplikace s podtlakem, pokud není navržen tak, aby podtlaku odolal, je-li kontejner poškrábaný, naštíplý nebo prasklý, je-li kontejner stisknutý takovým způsobem, že dochází k napětí nebo je-li kontejner držený v ruce.
- Q. Používejte pouze činidlo LINEAR ARRAY HPV Master Mix s genotypizačním testem LINEAR ARRAY HPV. Činidlo AMPLICOR® HPV Master Mix nesmí být používáno s genotypizačním testem LINEAR ARRAY HPV.

MANIPULACE SE VZORKY A JEJICH SKLADOVÁNÍ

- A. **Činidla nezmrazujte pokud není uvedeno jinak.**
- B. Skladujte **CLM** a **PK** z extrakční soupravy AmpliLute Liquid Media Extraction Kit při teplotě 2–8 °C. Skladujte ostatní činidla z extrakční soupravy AmpliLute Liquid Media Extraction Kit při teplotě 2–25 °C. Po otevření je možné jakoukoliv nepoužitou část **PK** uchovávat až 2 měsíce při teplotě 2–8 °C, **ATL** a **AL** je možné uchovávat až 2 měsíce při teplotě 2–25 °C nebo do doby použitelnosti, dle toho, která je kratší. Po rozpuštění s **AVE** je možné **CAR** uchovávat maximálně po dobu 24 hodin při teplotě 2–8 °C nebo rozdělené na alikvotní části a uchovávat při teplotě -20 °C po dobu maximálně 2 měsíců (nebo do doby použitelnosti, dle toho která je kratší). Potom, co je k **AW2** přidán absolutní etanol, je možné nespoteřovanou část uchovávat při teplotě 2–25 °C po dobu maximálně 2 měsíců nebo do data použitelnosti, je-li tato doba kratší. Poté, co je rekonstituovaný **CAR** přidán k **AL**, pracovní **AL** může být uchováván při teplotě 2–8 °C po dobu maximálně 48 hodin.
- C. Skladujte **HPV MMX** a **HPV Mg²⁺** při teplotě 2–8 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do vypršení doby použitelnosti, která je na nich uvedena. Po otevření je třeba nespoteřovanou část zlikvidovat. Pracovní činidlo Master Mix (připravené tak, že se **HPV Mg²⁺** přidá k **HPV MMX**) musí být uchováno při teplotě 2–8 °C a je třeba ho spotřebovat do 6 hodin od přípravy.

- D. **HPV (-) C** a **HPV (+) C** skladujte při teplotě 2–8 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do vypršení doby použitelnosti, která je na nich uvedena. Po otevření musí být jakákoli nespotřebovaná část zlikvidována.
- E. **HPV Strip** skladujte při teplotě 2–8 °C. Pokud není toto činidlo otevřené, je stabilní až do vypršení uvedené doby použitelnosti. Po otevření je třeba nespotřebované proužky zlikvidovat.
- F. **DN** skladujte při teplotě 2–25 °C. Neotevřený **DN** je stabilní do uvedené doby použitelnosti. Po otevření je **DN** stabilní po dobu 3 měsíců při teplotě 2–25 °C (nebo do data použitelnosti, je-li tato doba kratší).
- G. **CIT**, **SA-HRP**, **SUB A** a **SUB B** skladujte při teplotě 2–8 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do uplynutí doby použitelnosti, která je na nich uvedena. Po otevření jsou tato činidla při teplotě 2–8 °C stálá 1 měsíc (nebo do data použitelnosti, je-li tato doba kratší).
- H. Skladujte **SDS** a **SSPE** při teplotě 2–8 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do uplynutí doby použitelnosti, která je na nich uvedena. Po otevření jsou tato činidla při teplotě 2–8 °C stálá 1 měsíc (nebo do data použitelnosti, je-li tato doba kratší). V činidlech **SDS** a **SSPE** se během skladování při teplotě 2–8 °C vytváří sraženina. Před použitím po dobu maximálně 30 minut za důkladného míchání zahřívejte na teplotu 53 °C ± 2 °C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní hybridizační a promývací pufrы připravené rozpuštěním **SDS** a **SSPE** v destilované nebo deionizované vodě by měly být uchovávány při pokojové teplotě v čistém uzavřeném kontejneru a jsou stabilní po dobu 30-ti dnů od data přípravy.
- I. Pracovní konjugát musí být čerstvě připraven každý den smícháním **SA-HRP** s pracovním “ambient” promývacím pufrým a je stabilní po dobu 3 hodin při teplotě okolí.
- J. Pracovní substrát musí být čerstvě připraven smícháním **SUB A** s **SUB B** a je stabilní po dobu 3 hodin při teplotě okolí, je-li chráněn před světlem. Nevystavujte **SUB A**, **SUB B** ani pracovní substrát styku s kovy, oxidačními činidly nebo přímému světlu.
- K. Pracovní citrátový pufr připravený rozpuštěním **CIT** v destilované nebo deionizované vodě by měl být uchováván při pokojové teplotě v čistém uzavřeném kontejneru a je stabilní po dobu 30-ti dnů od data přípravy.

DODÁVANÝ MATERIÁL

A. AmpliLute Liquid Media Extraction Kit

Extrakční souprava AmpliLute
(P/N: 03750540 190)

EXTRN

CAR

(Nosičová RNA)

PK

(Proteináza K)

AVE

(Eluční pufr)

AW2

(Promývací pufr 2)

ATL

(Tkáňový lytický pufr)

AL

(Lytický pufr)

EXT

(Prodlužovače sloupce, 3 ml)

VC

(Vac konektory)

ELT

(Eluční zkumavky, 1,5 ml)

CLM

(Sloupce QIAamp® MinElute®)

B. LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test

Genotypizační test LINEAR ARRAY HPV
(P/N: 04391853 190)

LA HPV GT

HPV MMX

(LINEAR ARRAY HPV Master Mix)

HPV Mg²⁺

(Roztok magnézia LINEAR ARRAY HPV)

HPV (+) C

(Pozitivní kontrola LINEAR ARRAY HPV)

HPV (-) C

(Negativní kontrola LINEAR ARRAY HPV)

HPV Strip

(Genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV)

Referenční návod

(Referenční návod k genotypizačnímu testu LINEAR ARRAY HPV)

C. LINEAR ARRAY Detection Kit

Detekční souprava LINEAR ARRAY

(P/N: 03378179 190)

LA DK

DN

(Denaturační roztok)

SDS

(Koncentrát SDS)

SSPE

(Koncentrát SSPE)

SA-HRP

(Konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou)

CIT

(Citrátový koncentrát)

SUB A

(Substrát A)

SUB B

(Substrát B)

D. 24-Well Tray with Lid

24-jamková plotna s víkem

(P/N: 03140725 001)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY**Oblast preamplifikace a přípravy činidla**

- Pro systém Gold-plated 96-Well GeneAmp[®] PCR System 9700 firmy Applied Biosystems použijte reakční zkumavky MicroAmp[®] (AB# N801-0533), uzávěry (AB# N801-0535 nebo AB# N801-0534), plotny/držáky (AB# 403081) nebo soupravu Ready-Pak MicroAmp Assembly (AB# 403083) a podložku (AB# N801-0531)
- Plastový uzavíratelný vak
- Pipeta Eppendorf Multipette^{®*}
- 1,0 ml nebo 1,25 ml Eppendorf Combitip[®] plus (sterilní, individuálně balený)*
- Pipetory (objem 50 µl až 125 µl)* s DNA a DNázy prostými hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Oblast preamplifikace a přípravy vzorků a kontrol

- Pipeta Eppendorf Multipette*
- 1,0 ml a 5,0 ml Eppendorf Combitip plus (sterilní, individuálně balený)*
- Pipetory (objem 20 µl, 200 µl a 1000 µl)* s DNA a DNázy-prostými hroty s aerosolovou bariérou nebo pozitivním posuvem
- Sterilní zkumavky o objemu 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (např. Sarstedt 72.693.005 nebo ekvivalentní)
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalentní)
- Absolutní etanol - vyhovuje specifikacím ACS
- Sterilní polypropylenové kónické zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml: (Corning 430052 a 430290 nebo ekvivalentní)
- Sterilní jednorázové sérologické pipety (5 ml, 10 ml a 25 ml)
- Pipet-Aid[®] (Drummond 4-000-100 nebo ekvivalentní)

- Mikrocentrifuga (min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M nebo ekvivalentní
- Vířivý mixér
- Suché vyhřívací bloky 56 °C ± 2 °C a 70 °C ± 2 °C
- Vakuový rozvod (např. QIAvac 24, kat. č. 19403; QIAvac 24 Plus, kat. č. 19413 s propojovacím systémem QIAvac, kat. č. 19419)
- Zdroj vakua [např. čerpadlo schopné vytvořit vakuum -800 až -900 mbar, KNF Neuberger LABOPORT® model UN840.3FTP (115 V, 60 Hz) nebo model N840.3FT.18 (230 V, 50 Hz) nebo vakuové čerpadlo QIAGEN P/N: 84000 (110 V, 60 Hz), 84010 (115 V, 60 Hz) nebo 84020 (230 V, 50 Hz)] s přípojkou k rozvodu
- Regulátor vakua (QIAGEN kat. č. 19530), volitelné příslušenství
- Odběrové zkumavky (2 ml, QIAGEN kat. č. 19201), volitelné příslušenství
- Rukavice na jedno použití, bez pudru

Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

- Systém Gold-plated 96-Well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, P/N: 4314878)
- Sérologické pipety polystyrenové (5 ml, 10 ml a 25 ml) na jedno použití
- Multikanálové pipetory (kapacita 100 µl)*
- Pipetory (kapacita 20 µl, 200 µl a 1000 µl)* s DNA a DNázy-prostými hroty s aerosolovou bariérou nebo pozitivním posunem
- Vířivý mixér
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- 53 °C ± 2 °C třepací vodní lázeň s výkonem přibližně 60 ot./min (Bellco Hotshaker Plus, P/N: 774622110 (115 V, 60 Hz) nebo P/N: 774622220 (230 V, 50 Hz), nebo ekvivalentní)
- 53 °C ± 2 °C vodní lázeň
- Krouživá třepačka s výkonem přibližně 60 ot./min
- Pinzeta z nerezavějící oceli (VWR #: 30033-042 nebo ekvivalentní)
- Permanentní inkoustové pero odolné vodě, chemikáliím a teple (Sharpie® Industrial Super Permanent Marker, P/N: 13801 nebo ekvivalentní)
- Vakuové nasávací zařízení s vhodným sběrným rezervoárem na tekutinu (filtrační nádoba s tlustými stěnami značky PYREX®, Corning P/N: 5340-2L nebo ekvivalentní)
- 12-kanálový jehlový dělič toku/aspirátor (Art Robbins Instruments, P/N: 102-5020-12)
- 1-librové prstencové závaží (VWR #: 29700-004 nebo ekvivalentní)
- Zásobní láhve o objemu 1 l, 2 l a 3 l
- Kádinky o objemu 100 ml, 250 ml a 500 ml
- Odměrné válce o objemu 100 ml, 250 ml, 500 ml a 1 l
- Pipeta Eppendorf Multipette*
- 50 ml Eppendorf Combitip plus (sterilní, individuálně balený)
- 50 ml adaptér Eppendorf Biopur® (P/N: 0030 069.480)
- RBS35 Čisticí roztok plotny (VWR #: PI27952 / Pierce #: 27952)
- Rukavice na jedno použití, bez pudru

* Pipetory musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, musejí být použity hroty s aerosolovou bariérou nebo pozitivním posunem prostě DNA a DNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

POZN.: Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s infekčními.

A. Odběr vzorků

Pouze vzorky cervikálních buněk odebrané do roztoku **cobas**® PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt Solution byly validovány pro použití s genotypizačním testem LINEAR ARRAY HPV. Při odběru vzorků cervikálních buněk do roztoku **cobas**® PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt Solution se řiďte pokyny příslušného výrobce.

B. Přeprava vzorků

Vzorky cervikálních buněk odebrané do roztoku **cobas**® PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt Solution lze přepravovat při teplotě 2–30 °C. Při přepravě vzorků cervikálních buněk je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy pro přepravu etiologických agens¹⁸.

C. Skladování vzorků

Vzorky cervikálních buněk odebrané do média **cobas**[®] PCR Cell Collection Media nebo roztoku PreservCyt je možné uchovávat při teplotě 2–30 °C až 6 měsíců.

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: Před použitím nechte všechna činidla vyrovnat s pokojovou teplotou (15-30 °C), pokud není řečeno jinak. Před započítím testu se pohledem přesvědčte, že je objem činidel dostatečný.

POZN.: Vzorky cervikálních buněk musí být před použitím v pokojové teplotě (15-30 °C).

POZN.: Kde je tak uvedeno, používají se pipetory s hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posunem. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.

Množství pro jedno měření:

Extrakční souprava AmpliLute Liquid Media Extraction Kit obsahuje dostatek činidel pro 50 testů. Každá detekční souprava LINEAR ARRAY obsahuje činidla pro 96 testů. Každý genotypizační test LINEAR ARRAY HPV obsahuje dostatečné množství činidla na čtyři 12-testová měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Minimálně jeden replikát každé negativní kontroly LINEAR ARRAY HPV a pozitivní kontroly LINEAR ARRAY HPV musí být zahrnut do každého běhu testu s maximálně 22 vzorky (viz část "Kontrola kvality").

Amplifikační činidla jsou balena v 12-testových lahvičkách na jedno použití. Negativní kontrola LINEAR ARRAY HPV a pozitivní kontrola LINEAR ARRAY HPV jsou baleny v lahvičkách na jedno použití. Genotypizační proužky LINEAR ARRAY HPV jsou baleny v sáčcích s 12 testy na jedno použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.

Pracovní tok:

Genotypizační test LINEAR ARRAY HPV je možné uskutečnit během jediného dne nebo se může rozložit do dvou dnů. Má-li být testování dokončeno v průběhu jednoho dne, postupujte podle návodu od bodu A do bodu D. V případě rozvržení testování do dvou dnů lze práci přerušit po dokončení přípravy vzorků a kontrol (část B) nebo po amplifikaci (část C).

Budete-li připravovat vzorky a kontroly v den 1 a amplifikaci a detekci provedete v den 2, postupujte podle kroků B.1 až B.29 a uchovávejte zpracovávané vzorky a kontroly podle návodu popsaného v kroku B.29. Druhý den začnete částí A (Příprava činidel), potom rozmrazte zpracované vzorky a kontroly při pokojové teplotě a pokračujte podle bodu B.30.

POZN.: Zpracované vzorky a kontroly se mohou zmrazit a rozmrazit pouze jednou.

Chcete-li dokončit přípravu a amplifikaci vzorků a kontrol v den 1 a detekci ponechat na den 2, proveďte část A (Příprava činidel), B (Příprava vzorků a kontrol) a C (Amplifikace) v průběhu dne 1 a denaturovaný ampikon uložte při teplotě 2-8 °C jak je uvedeno v kroku C.6. V den 2 pokračujte částí D (Detekce genotypu pomocí stripu LINEAR ARRAY HPV).

A. Příprava činidla

Provedení v: Preamplifikace – prostor pro přípravu činidla

1. Určete odpovídající počet reakčních zkumavek potřebných pro testování vzorku a kontrol. Vložte zkumavky do plotny MicroAmp a zajistěte držákem.
2. Připravte pracovní směs Master Mix přidáním 125 µl **HPV Mg²⁺** do jedné lahvičky s **HPV MMX**. Není nutné měřit objem činidla Master Mix. Přidejte 125 µl **HPV Mg²⁺** do celé lahvičky s **HPV MMX**. Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15-krát obrátíte dnem vzhůru. K promísení pracovní směsi Master Mix nepoužívejte víření. Růžové barvivo v **HPV Mg²⁺** slouží k vizuálnímu ověření, že byl roztok **HPV Mg²⁺** přidán k **HPV MMX**. Zbývající množství **HPV Mg²⁺** zlikvidujte.
3. Do každé reakční zkumavky odměřte 50 µl pracovní směsi Master Mix za použití pipety Multipette nebo pipetoru s hrotem s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posunem. V této fázi zkumavky neuzavírejte.
4. Plotnu s pracovní směsí Master Mix a s příslušným počtem víček k reakčním zkumavkám umístěte do uzavíratelného plastového vaku a pečlivě vak uzavřete. Přejděte do prostoru pro preamplifikační přípravu vzorků a kontrol. Plotnu s pracovní směsí Master Mix uchovávejte při teplotě 2–8 °C v prostoru preamplifikační přípravy vzorků a kontrol, dokud není příprava vzorků a kontrol hotova. Pracovní směs Master Mix je v reakčních zkumavkách uzavřených v plastovém vaku při teplotě 2-8 °C stálá po dobu 6 hodin.

B. Příprava vzorků a kontrol

Provedení v: Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorků a kontrol

1. Teplotu vyhřívacího bloku nastavte na 56 °C ± 2 °C.
2. Teplotu dalšího vyhřívacího bloku nastavte na 70 °C ± 2 °C.

3. Činidla, vzorky a kontroly vytemperujte na teplotu okolí (minimálně 15 minut). Pokud vznikla v **ATL** nebo **AL** sraženina, rozpusťte ji zahřátím na 70 °C a jemným protřepáním.

POZN.: Kroky B.4-B.6 je možno provést během inkubace vzorků/kontrol s PK a ATL (krok B.10).

4. Rozpusťte lyofylizovaný **CAR** přidáním 310 µl **AVE**. Vířením míchejte 10 sekund. Lahvičku parafujte a vyznačte datum.

POZN.: Rozpuštěné činidlo CAR je při teplotě 2-8 °C stále maximálně 24 hodin; je také možné je rozdělit na alikvotní podíly a zmrazit na -20 °C na dobu maximálně 2 měsíců nebo do data použitelnosti, je-li tato doba kratší. Rozpuštěný CAR nezmrazujte a nerozmrazujte více než 3-krát.

5. K činidlu **AW2** přidejte 30 ml absolutního ethanolu. Lahvičku parafujte a vyznačte datum. Protřepáním promíchejte rozředěný **AW2**.

POZN.: Rozředěný AW2 může být uchováván při pokojové teplotě maximálně 2 měsíce nebo do uplynutí doby použitelnosti, pokud je kratší.

6. Připravte pracovní **AL** přidáním odpovídajícího množství rozpuštěného **CAR** do **AL** jak ukazuje tabulka 1. Jemně promíchejte 10-ti násobným obrácením zkumavky. Nemíchejte vířením, aby nevznikla pěna.

**Tabulka 1
Příprava pracovního AL**

Činidla	Počet vzorků nebo kontrol pro zpracování						
	12	24	36	48	60	72	96
CAR (ml)	0,04	0,07	0,10	0,13	0,16	0,20	0,25
AL (ml)	4,0	7,0	10,0	13,0	16,0	20,0	25,0

POZN.: Pracovní AL je stabilní při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně 48 hodin.

7. Pro každý zpracovávaný vzorek a kontrolu si označte jednu 2 ml zkumavku se šroubovacím uzávěrem.

POZN.: NEPOUŽÍVEJTE zkumavky se šroubovacím uzávěrem o objemu 1,5 ml, ani zkumavky konické, protože by mohly narušovat přenos tepla během inkubace a lýza by nemusela proběhnout kompletně.

8. Do každé zkumavky přidejte 80 µl **ATL**.
9. Každý vzorek a kontrolu míchejte vířením po dobu 10 sekund. Do patřičně označené zkumavky přidejte po 250 µl vzorku a kontroly.
10. Do každé zkumavky přidejte 20 µl **PK**. Zkumavky uzavřete a vířením po dobu 10 sekund promíchejte. Zkumavky inkubujte po dobu 30 minut ve vyhřívacím bloku při teplotě 56 °C ± 2 °C.
11. Vakuový rozvodný systém QIAvac 24 (nebo QIAvac 24 Plus) sestavte během inkubace vzorků a kontrol podle příručky k vakuovému rozvodnému systému QIAGEN. Z blistrového balení vyjměte po jedné **CLM** na každý vzorek a kontrolu a označte je. Zkumavky na odpad uschovejte pro použití v kroku B.23. Otevřete víko na **CLM** a vložte do **VC**. Do **CLM** vložte **EXT**.
12. Po dokončení inkubace při teplotě 56 °C ± 2 °C přidejte do každé zkumavky po 250 µl pracovního **AL**. Zkumavky uzavřete a vířením po dobu 10 sekund při maximální rychlosti promíchejte.

POZN.: Po přidání pracovního AL se může vytvořit bílá sraženina. Precipitát neinterferuje s postupem přípravy vzorku a kontroly a během následující inkubace se rozpustí.

13. Zkumavky inkubujte po dobu 15 minut ve vyhřívacím bloku při teplotě 70 °C ± 2 °C. Vzorky a kontroly občas během inkubace vířením promíchejte.
14. Po dokončení inkubace vzorků a kontrol při teplotě 70 °C ± 2 °C přidejte 300 µl absolutního ethanolu do každé zkumavky. Zkumavky uzavřete a vířením po dobu 15 sekund při maximální rychlosti promíchejte.
15. Inkubujte zkumavky po dobu 5 minut při teplotě okolí. Podrobte zkumavky pulzní rotaci ve stolní centrifuze při maximálních otáčkách.
16. Lyzát z každé zkumavky přemístěte do příslušné **CLM**. Ponechte inkubovat minimálně 1 minutu.
17. Zapněte vakuovou pumpu. Na rozvodný systém připojte vakuum, aby se odstranil **veškerý** lyzát a ponechte vakuum ještě minimálně jednu minutu v chodu. Vakuum z rozvodu odpojte postupem uvedeným v příručce k rozvodnému systému firmy QIAGEN.

POZN.: Pokud lyzát z některého jednotlivého vzorku nebo kontroly neprošel kompletně membránou, vložte CLM do čisté 2 ml odběrové zkumavky, uzavřete a centrifugujte plnou rychlostí po dobu 1 minuty nebo tak dlouho, dokud lyzát kompletně neprojde. Další 2 ml odběrové zkumavky je možno dokoupit zvlášť (viz „POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY“).

18. Do každé **CLM** přidejte 750 µl **AW2**. Ponechte inkubovat minimálně 1 minutu.
19. Zapněte vývěvu. K rozvodnému systému připojte vakuum, aby se odstranila veškerá tekutina a ponechte vakuum ještě minimálně jednu minutu v chodu. Vakuum z rozvodu odpojte postupem uvedeným v příručce k rozvodnému systému firmy QIAGEN.
20. Do každé **CLM** odměřte 750 µl absolutního etanolu. Ponechte inkubovat minimálně 1 minutu.
21. Zapněte vývěvu. K rozvodnému systému připojte vakuum, aby se odstranila veškerá tekutina a ponechte vakuum ještě minimálně jednu minutu v chodu. Vakuum z rozvodu odpojte postupem uvedeným v příručce k rozvodnému systému firmy QIAGEN.
22. Opatrně odstraňte **EXT** z každé **CLM**. **EXT** zlikvidujte.

POZN.: Aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci, dbejte na to, abyste se během vyjímání EXT nedotkli sousední CLM.

23. Vložte každý **CLM** do odpadní odběrové zkumavky (z kroku B.11) a uzavřete víko. Sestavy 3 minuty centrifugujte při maximálních otáčkách.
24. Označte po jedné **ELT** pro každý vzorek a kontrolu.
25. Odpadní odběrové zkumavky zlikvidujte a každý **CLM** vložte do příslušného **ELT**.
26. Otevřete víko každého **CLM** a po dobu 15 minut při teplotě okolí inkubujte.
27. Do každé **CLM** přidejte 120 µl **AVE**. Uzavřete každé víko.

POZN.: Před přidáním do každé CLM musí být AVE vytemperováno na pokojovou teplotu.

28. Sestavy po dobu 5 minut při teplotě okolí inkubujte a potom po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách centrifugujte.
29. Ze sestav vyjměte **CLM** a zlikvidujte je; zkumavky uzavřete. Amplifikujte zpracovávané vzorky a kontroly okamžitě nebo je uchovejte při teplotě 2–8 °C nebo zmrazené při ≤ -20 °C. Zpracované vzorky a kontroly je možno uchovávat za pokojové teploty 6 hodin, při teplotě 2–8 °C po dobu 7 dnů a při teplotě -20 °C nebo nižší 8 týdnů, přičemž zmrazit a rozmrazit se smějí pouze jednou. Více než jeden cyklus zmrazení a rozmrazení může způsobit ztrátu signálu.
30. Do příslušných amplifikačních zkumavek obsahujících pracovní Master Mix odměřte po 50 µl vzorku a kontroly. Na každý vzorek resp. kontrolu použijte nový hrot s aerosolovou bariérou nebo pozitivním posunem. Amplifikační zkumavky uzavřete.

POZN.: Jsou-li zpracované vzorky a kontroly uchovávány ve zmrazeném stavu, nechte je rozmrazit při pokojové teplotě. Po rozmrazení důkladně promíchejte vzorek a kontrolu vířením po dobu 10 sekund. Jsou-li zpracované vzorky a kontroly uchovávány při teplotě 2–8 °C, důkladně každý promíchejte vířením po dobu 10 sekund před přidáním pracovní směsi Master Mix.

POZN.: Amplifikace v systému Gold-plated 96-Well GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems musí být zahájena do 45 minut po přidání zpracovaného vzorku a kontroly do pracovní směsi Master Mix.

31. Přesuňte připravené vzorky a kontroly v amplifikační plotně do oblasti určené k amplifikaci a detekci. Zbytek zpracovaných vzorků a kontrol je možné uchovat dle instrukcí v kroku B.29.

C. Amplifikace

Provádění v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

1. Vložte soupravu plotny a držáku do bloku termocykleru.
2. Naprogramujte systém Gold-plated 96-Well GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV následujícím způsobem:

Program HOLD:	2 min 50 °C
Program HOLD:	9 min 95 °C
Program CYCLE (40 cyklů):	30 sekund 95 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C (Náběhová rychlost (ramp rate) = 50 %)
Program HOLD:	5 min 72 °C
Program HOLD:	72 °C bez omezení

V programech CYCLE nastavte ramp rate na 50%. Přiřadte název metody a jméno uživatele tak, jak je vyžadováno. Prostudujte si v uživatelském manuálu k systému Gold-plated 96-Well GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems další informace o programování a obsluze termocyklieru.

3. Zapněte program METHOD. Na obrazovce „Method Options“ nastavte hodnotu „Ramp Speed“ na „Max“ a „Reaction Volume“ na „100 µL“. Znovu stiskněte START. Program běží zhruba 3 hodiny a 15 minut.
4. Do 4 hodin během posledního programu HOLD vyjměte plotnu z termocyklieru, vložte do MicroAmp Base a ihned pokračujte krokem 5. Reakční zkumavky nesmějí v termocyklieru zůstat déle než 4 hodiny. **AMPLIFIKOVANÉ VZORKY NEPŘENÁŠEJTE DO PREAMPLIFIKAČNÍHO PROSTORU. AMPLIFIKOVANÉ KONTROLY A VZORKY JSOU POKLÁDÁNY ZA HLAVNÍ ZDROJ MOŽNÉ KONTAMINACE.**
5. Odstraňte uzávěry z reakčních zkumavek opatrně tak, aby se z amplifikačních produktů netvořil aerosol. Pomocí multikanálového pipetoru s hroty s aerosolovou bariérou odměřte ihned do prvního sloupce (nebo řady) reakčních zkumavek 100 µl **DN** a pětkrát promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Tento postup opakujte u všech sloupců (nebo řad), přičemž používejte vždy nové sady hrotů.
6. Denaturovaný amplikon je možno nechat před detekcí (část D) stát při pokojové teplotě nejvýše 5 hodin. Není-li možné zahájit detekční reakci do 5-ti hodin, uzavřete zkumavky novými víčky a denaturovaný amplikon pak můžete uložit při teplotě 2-8 °C na dobu maximálně 7 dnů.

D. Detekce genotypu pomocí stripu LINEAR ARRAY HPV

Provedení v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

POZN.: V průběhu detekční procedury zabraňte přelévání vzorků z jedné jamky na plotně do druhé. Zabraňte přelévání vody z lázně do jamek plotny. 24-jamkové plotny neskládejte na sebe.

1. Všechna detekční činidla zahřejte na pokojovou teplotu.
2. Předehřejte vodní lázeň na 53 °C ± 2 °C.
3. Předehřejte třepací vodní lázeň na teplotu 53 °C ± 2 °C a třepací rychlost nastavte na přibližně 60 ot./min. Dbejte, aby bylo v lázni dost vody na vyhřátí 24-jamkové plotny, ale ne příliš mnoho, aby do plotny nenastříkla. Voda musí být v kontaktu s přibližně 1/4 zevní hloubky jamky nebo 0,5 cm 24-jamkové plotny.

POZN.: Falešně pozitivní výsledky se mohou objevit, pokud není voda ve vodní lázni v správném kontaktu s 24-jamkovou plotnou.

4. Následujícím způsobem připravte pracovní hybridizační pufr. Zkontrolujte **SSPE** a **SDS** a v případě potřeby je ve vodní lázni zahřejte na 53 °C ± 2 °C, aby se jakákoli sraženina znovu rozpustila. Přidejte 100 ml **SSPE** k 388 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 12,5 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní hybridizační pufr je dostatečný pro 100 genotypizačních proužků LINEAR ARRAY HPV. Uchovává se za pokojové teploty v čistém kontejneru a je stálý 30 dnů.
5. Následujícím způsobem připravte pracovní „ambient“ promývací pufr. Zkontrolujte **SSPE** a **SDS** a v případě potřeby je ve vodní lázni zahřejte na 53 °C ± 2 °C, aby se jakákoli sraženina znovu rozpustila. Přidejte 133 ml **SSPE** k 2520 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Přidejte 13,3 ml **SDS** a dobře promíchejte. Pracovní „ambient“ promývací pufr je dostatečný pro 100 genotypizačních proužků LINEAR ARRAY HPV. Uchovává se v čistém kontejneru za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
6. Následujícím způsobem připravte pracovní „stringent“ promývací pufr. Pro každý testovaný proužek odeberte 5 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru (připraveném v předchozím kroku) a přidejte do čisté láhve na médium o vhodné velikosti. (např. pro běh o 24 proužcích odeberte 120 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru a přidejte do láhve na médium.) Před každým během by měl být pracovní „stringent“ promývací pufr připraven čerstvý.
7. Minimálně 15 minut zahřívajte pracovní hybridizační pufr a pracovní „stringent“ promývací pufr na vodní lázni při teplotě 53 °C ± 2 °C. Dokud je nebudete potřebovat, oba pufrovací roztoky ve vodní lázni ponechte.
8. Následujícím způsobem připravte pracovní citrátový pufr. Zkontrolujte **CIT** a v případě potřeby je ve vodní lázni zahřejte na 53 °C ± 2 °C, aby se jakákoli sraženina znovu rozpustila. Přidejte 25 ml **CIT** k 475 ml destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Pracovní citrátový pufr je dostatečný pro 100 genotypizačních proužků LINEAR ARRAY HPV. Uchovává se v čisté nádobě za pokojové teploty a je stálý 30 dnů.
9. Čistou pinzetou vyjměte potřebný počet genotypizačních proužků LINEAR ARRAY HPV ze sáčku **HPV Strip**.

10. Permanentním inkoustovým perem odolným vodě, chemikáliím a teplu označte každý **HPV Strip** odpovídajícím identifikátorem pro vzorek a kontrolu.
11. Umístěte každý proužek se řadami sond tak, že sondy směřují nahoru do odpovídající jamky na 24-jamkové plotně.
12. Do všech jamek, ve kterých je označený proužek, přidejte po 4 ml předeřhátého pracovního hybridizačního pufru.
13. Pomocí pipetoru s hrotem s aerosolovou bariérou nebo pozitivním posunem odměřte pečlivě do příslušné jamky s označeným proužkem 75 μ l denaturovaného amplikonu. Po každém přidavku plotnou opatrně zakolébejte. Pro každý přidavek amplikonu použijte nový hrot.
14. Přikryjte 24-jamkovou plotnu víkem a vložte do třepací vodní lázně vyhřáté na $53\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aby se 24-jamkové plotna během třepání neposouvala, umístěte na její víko jednodílné prstencové závaží. Hybridizujte po dobu 30 minut při rychlosti třepání přibližně 60 ot./min.
15. V průběhu hybridizace (krok 14) připravte pracovní konjugát následujícím způsobem: Pro každý testovaný proužek přidejte 15 μ l **SA-HRP** k 5 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru. Dobře promíchejte. Pracovní konjugát je třeba uchovávat v čisté nádobě za pokojové teploty; pak je stálý 3 hodiny.
16. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z vodní třepací lázně a pracovní hybridizační pufr odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
17. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru. 24-jamkovou plotnou opatrně třikrát až čtyřikrát zakolébejte, aby se proužky opláchly a pracovní „ambient“ promývací pufr okamžitě z jamek vakuově odsajte.
18. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml předeřhátého pracovního „stringent“ promývacího pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete jakýkoli kondenzát z víka plotny, víko položte je na 24-jamkovou plotnu a vložte ji zpět do třepací vodní lázně vyhřáté na $53\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aby se 24-jamkové plotna během třepání neposouvala, umístěte na její víko jednodílné prstencové závaží. Inkubujte po dobu 15 minut při rychlosti třepání přibližně 60 ot./min.
19. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z vodní třepací lázně a pracovní „stringent“ promývací pufr odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
20. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního konjugátu. Čistým papírovým ubrouskem otřete jakýkoli kondenzát z víka plotny, víko položte na 24-jamkovou plotnu a vložte ji do orbitální třepačky s pokojovou teplotou. Inkubujte 30 minut **při pokojové teplotě (15–30 °C)** při rychlosti třepání přibližně 60 ot./min.
21. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z orbitální třepačky a pracovní konjugát odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
22. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru. 24-jamkovou plotnou opatrně 3–4-krát zakolébejte, aby se proužky opláchly a pracovní „ambient“ promývací pufr okamžitě z jamek vakuově odsajte.
23. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru. Čistým papírovým ubrouskem otřete jakýkoli kondenzát z víka plotny, víko položte na 24-jamkovou plotnu a vložte je do orbitální třepačky s pokojovou teplotou na 10 minut při rychlosti třepání přibližně 60 ot./minutu.
24. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z orbitální třepačky a pracovní „ambient“ promývací pufr odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
25. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního „ambient“ promývacího pufru. Položte víko na 24-jamkovou plotnu a tu vložte do orbitální třepačky s pokojovou teplotou na dobu 10 minut při rychlosti třepání přibližně 60 ot./minutu.
26. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z orbitální třepačky a pracovní „ambient“ promývací pufr odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
27. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního citrátového pufru. Položte víko na 24-jamkovou plotnu a tu vložte do orbitální třepačky s pokojovou teplotou na dobu 5 minut při rychlosti třepání přibližně 60 ot./minutu.
28. Následujícím postupem si připravte pracovní substrát: Na každý testovaný proužek přidejte k 1 ml **SUB B** objem 4 ml **SUB A**. Dobře promíchejte. Pracovní substrát je třeba uchovávat v čisté nádobě za pokojové teploty mimo dosah přímého světla; pak je stálý 3 hodiny.
29. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z orbitální třepačky a pracovní citrátový pufr odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
30. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml pracovního substrátu. Položte víko na 24-jamkovou plotnu a tu vložte do orbitální třepačky s pokojovou teplotou na dobu 5 minut při rychlosti třepání přibližně 60 ot./minutu.

31. Vyjměte 24-jamkovou plotnu z orbitální třepačky a pracovní substrát odstraňte z jamek vakuovým odsátím.
32. Do každé jamky obsahující proužek přidejte 4 ml destilované nebo deionizované vody.
33. Vyjměte stripy z 24-jamkové misky pomocí čisté pinzety, umístěte je na čistý suchý povrch a nechte je uschnout na vzduchu po dobu minimálně jedné hodiny nebo až 72 hodin při pokojové teplotě před provedením interpretace.

Čistění 24-jamkové plotny

Provedení v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

POZN.: 24-jamkové plotny jsou na jedno použití nebo mohou být použity opakovaně. Pro opakované použití ploten je třeba po každém použití dodržet tento čisticí postup.

1. Přidáním 1 dílu RBS35 k 9 dílům destilované nebo deionizované vody si připravte 10% roztok RBS35.
2. Všechny jamky plotny tímto 10% roztokem naplňte a nechte přes noc za pokojové teploty nasáknout.
3. Plotnu **důkladně** destilovanou nebo deionizovanou vodou opláchněte.
4. Před použitím plotnu dokonale vysušte.

VÝSLEDKY

Ujistěte se, že jsou kontrolní výsledky pro běh platné (viz část Kontrola kvality). Pokud běh platný není, zopakujte celý postup (přípravu vzorku, amplifikaci a detekce genotypu pomocí stripu LINEAR ARRAY HPV).

Pro platný běh interpretujte genotypizační strip LINEAR ARRAY HPV umístěním referenčního návodu ke genotypizačnímu testu LINEAR ARRAY HPV na strip ve vyříznuté oblasti tak, aby se genotypové HPV referenční linie objevily na každé straně stripu. Zajistěte, že černá inkoustová referenční linie (REF) na vodiči je vyrovnána s plnou černou linií na HPV stripu. Zaznamenejte viditelné pozitivní pásy a interpretujte výsledky HPV a beta-globinu (BG) pro každý proužek následujícím způsobem:

HPV výsledek	Výsledek “BG nízký”	Výsledek “BG vysoký”	Interpretace
-	-	-	Výsledek neplatný. V případě výskytu nemohla být HPV DNA detekována. Absence výsledků “BG vysoký” a “BG nízký” naznačuje neadekvátní odběr vzorku, zpracování nebo přítomnost inhibitorů. Zpracujte další podíl původního vzorku a test zopakujte. Pokud není původní vzorek k dispozici, je třeba odebrat nový.
-	-	+	Výsledek neplatný. Je-li přítomná HPV DNA, nemusela být detekována. Absence “BG nízký” naznačuje neadekvátní odběr vzorku, zpracování nebo přítomnost inhibitorů. Zpracujte další podíl původního vzorku a test zopakujte. Pokud již není původní vzorek k dispozici, je třeba odebrat nový.
-	+	+	HPV DNA nebyla detekována. Negativní výsledek nevylučuje přítomnost HPV infekce, jelikož výsledky testu jsou závislé na adekvátním odběru vzorku, zpracování, absenci inhibitorů a dostatečném množství HPV DNA, která je detekována.
+	-	-	HPV DNA detekována (Nahlaste genotypy). Vzorek je pozitivní na přítomnost HPV. Absence “BG nízký” a “BG vysoký” naznačuje neadekvátní odběr vzorku, zpracování, přítomnost inhibitorů nebo kompetici s vysokým titrem cílového HPV. Další HPV genotypy, které nebyly detekovány, mohou být přítomny.
+	-	+	HPV DNA detekována (Nahlaste genotypy). Vzorek je pozitivní na přítomnost viru HPV. Absence “BG nízký” naznačuje neadekvátní odběr vzorku, zpracování, přítomnost inhibitorů nebo kompetici s vysokým titrem cílového HPV. Další HPV genotypy, které nebyly detekovány, mohou být přítomny.
+	+	+	HPV DNA detekována (Nahlaste genotypy). Vzorek je pozitivní na přítomnost viru HPV. Přítomnost dalších HPV genotypů ve vzorku není možné zcela vyloučit.

Interpretace zkříženě reaktivní sondy

Genotypizační proužek LINEAR ARRAY HPV obsahuje zkříženě reagující sondu, která hybridizuje s HPV genotypy 33, 35, 52 a 58. Pozitivní výsledky pásu pro danou sondu by měly být interpretovány následujícím způsobem:

Výsledek pásu	Interpretace
33, 52/33/35/58	HPV 33*
35, 52/33/35/58	HPV 35*
58, 52/33/35/58	HPV 58*
52/33/35/58	HPV 52

* Těmito výsledky testu není možné vyloučit koinfekci genotypem HPV 52.

KONTROLA KVALITY

S každým během až 22 vzorků je třeba zpracovat minimálně jeden replikát negativní kontroly LINEAR ARRAY HPV a jeden replikát pozitivní kontroly LINEAR ARRAY HPV. Při zavádění každého nového laboratorního postupu musí operátor uvážit zařazování dalších negativních i pozitivních kontrol do každého testovaného souboru a to až do doby, kdy si je dostatečně jist, že provádí testování správně. Není rozhodující, na které pozici na plotně MicroAmp jsou kontroly zařazeny.

Vzorky a kontroly z oddělených běhů přípravy vzorků mohou být amplifikovány a detekovány společně. Každý jednotlivý běh přípravy vzorku je však validován individuálně sadou kontrol zahrnutou do daného běhu. Proto je možné vyřadit jeden běh vzorků ze společné amplifikace a/nebo detekce a přitom akceptovat jiný běh v závislosti na výkonnosti kontrol zpracovaných s těmito vzorky.

Všechny testové vzorky a kontroly připravené v jednom běhu by měly být amplifikovány a detekovány v pozicích vedle sebe jak v termocykleru, tak i na detekční plotně. Přesné pořadí umístění těchto vzorků a kontrol v termocykleru nebo na detekční plotně není rozhodující.

Negativní kontrola

Výsledkem testu negativní kontroly LINEAR ARRAY HPV nesmějí být žádné pozitivní pásy. Je-li viditelný jakýkoli pozitivní pás, celý běh je neplatný. Zopakujte celý proces (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce genotypu pomocí stripu LINEAR ARRAY HPV). Pokud negativní kontrola LINEAR ARRAY HPV soustavně vykazuje výsledky s pozitivními pásy, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Pozitivní kontrola

Výsledek testu pozitivní kontroly LINEAR ARRAY HPV musí vykazovat pozitivní výsledek interpretovaný jako HPV 16, beta-globin vysoký a beta-globin nízký. Pás beta-globin nízký bude slabý ve srovnání s pásem beta-globin vysoký, ale musí být viditelný okem. Pokud pozitivní kontrola LINEAR ARRAY HPV nevykazuje tento přesný výsledek, celý běh testu je neplatný. Zopakujte celý proces (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce genotypu pomocí stripu LINEAR ARRAY HPV). Pokud pozitivní kontrola LINEAR ARRAY HPV soustavně vykazuje výsledky s odlišnou skladbou pozitivních pásů, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické senzitivitě tohoto testu je třeba věnovat mimořádnou péči tomu, aby se zachovala čistota činidel soupravy a amplifikačních směsí. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je podezření na kontaminaci, je třeba činidlo zlikvidovat.

PRECEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test je určen pro vyšetření lidských cervikálních buněk odebraných do roztoku **cobas**[®] PCR Cell Collection Media nebo PreservCyt Solution. Testování jiných typů vzorků může způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
2. Test je validován pouze pro použití s extrakční soupravou AmpliLute Liquid Media Extraction Kit. Pokud by se při testování použily jiné postupy extrakce vzorků, mohly by být výsledky chybné.
3. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat patřičné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků.
4. Detekce HPV závisí na tom, kolik virových genomů je ve vzorku přítomno, a vliv mohou mít i metody odběru vzorku, faktory pacienta (např. věk, přítomnost symptomů) a/nebo stádium infekce.

5. Falešné negativní výsledky se mohou objevit z důvodu inhibice polymerázy nebo neadekvátnosti buněk. Amplifikace beta-globinu byla přidána k genotypizačnímu testu LINEAR ARRAY HPV, aby byla umožněna identifikace zpracovaných vzorků obsahujících substance, které mohou interferovat s PCR amplifikací anebo neadekvátní odběr buněk.
6. Přítomnosti enzymu AmpErase ve směsi LINEAR ARRAY HPV Master Mix snižuje riziko kontaminace amplikonu. Kontaminaci od HPV-pozitivních kontrol a vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné laboratorní praxe a pečlivým dodržováním postupů uvedených v této vložce.
7. S produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.
8. Pro použití s tímto produktem byl validován pouze systém Gold-plated 96-Well GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems. Žádný jiný termocykler, včetně GeneAmp PCR System 2400, GeneAmp PCR System 9600 ani termocykler GeneAmp PCR System 9700 s hliníkovým blokem, nemůže být použit s tímto produktem.
9. Vzorky obsahující bioadhezivní antikoncepční gel Advantage-S® mohou interferovat s výkonností genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV a mohou dávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
10. Bylo prokázáno, že vzorky obsahující více než 3,5 % obj. krve mohou inhibovat PCR amplifikaci a dávat falešně negativní výsledky.
11. Identifikace HPV genotypů 64 a 69 je založena na výsledcích genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV pro plasmidovou DNA HPV genotypů 64 a 69. HPV genotypy 64 a 69 nebyly detekovány v klinickém vzorku v průběhu hodnocení výkonnosti.
12. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokrytého primery genotypového testu LINEAR ARRAY HPV a/nebo sondou mohou vést k selhání detekce příslušného genotypu.
13. Díky samotným rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před změnou technologie na jinou provedli korelační metodické studie ve vlastní laboratoři a stanovili rozdíly mezi technologiemi.

RUŠIVÉ LÁTKY

Bylo zjištěno, že na genotypizační test LINEAR ARRAY HPV nepůsobí rušivě následující běžné výrobky ženské osobní hygieny, lubrikanty, protiplísňové krémy a antikoncepční gely.

Tabulka 2

Název produktu	
Ortho Options™ Delfen® vaginální antikoncepční pěna	Mycelex® 3 antimykotický krém
Clotrimazol 3 vaginální krém	Vagi-Gard® léčivý krém
Gyne-Lotrimin® 3 vaginální krém	Vagisil® krém proti svědění
Gynecort® 1% hydrokortizon krém proti svědění	Yeast Gard™ homeopatické vaginální čípky
Vaginex® formule s hydrokortizonem	Norforms® deodorační čípky
Betadine® léčivý sprchový koncentrát	K-Y Brand® rosolový osobní lubrikant
Mikonazol externí vulvární krém	Vagisil® intimní lubrikant
Kombinované balení vaginálního antifungicidního prostředku Monistat® 3	

Falešně negativní resp. neplatné výsledky byly zaznamenány pro HPV pozitivní vzorky obsahující bioadhezivní antikoncepční gel Advantage-S o koncentraci 0,11 g/20 ml nebo vyšší.

Falešně negativní výsledky byly pozorovány pro HPV pozitivní vzorky obsahující více než 3,5 % obj.krve.

Žádné falešně negativní nebo neplatné výsledky nebyly pozorovány pro HPV pozitivní vzorky obsahující endocervikální nebo exocervikální hlen.

PREVALENCE GENOTYPŮ HPV

Bylo prokázáno, že se prevalence a distribuce genotypů HPV liší v závislosti na geografickém regionu na celém světě¹⁹⁻²¹. Kromě toho se zdá, že některé genotypy, např. 55, 64 a 69, jsou novými genotypy s nízkou prevalencí a nejsou asociovány s karcinomem čípku^{20,22}. Nejčastější HPV genotypy spojené s karcinomem čípku s klesající prevalencí nebo frekvencí, jsou typy 16, 18, 45 a 31. Variabilita frekvence v geografické distribuci byla zjištěna u většiny genotypů, včetně 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59 a 68.

Tabulka 3
Zaznamenaná prevalence genotypů HPV u kontrola a případů s karcinomem čípku¹⁹⁻²¹

HPV genotyp	Prevalence (%)
16	7,5 – 56,0
18	2,3 – 22,1
45	2,4 – 7,9
58	0,2 – 5,4
53	0,0 – 5,2
33	1,0 – 4,4
31	2,0 – 4,2
52	0,5 – 4,2
62	4
54	0,0 – 3,6
39	0,0 – 3,3
61	0,0 – 3,2
35	0,4 – 2,7
56	0,2 – 2,5
66	0,0 – 2,4
84	2,3
6	0,3 – 2,3
81	0,1 – 2,3
70	0,0 – 2,3
59	0,0 – 2,1
CP6108	0,0 – 1,8
83	1,6
72	0,0 – 1,5
68	0,1 – 1,2
42	0,0 – 1,2
43	0,0 – 1,2
55	1,1
73	0,1 – 1,0
11	0,1 – 0,8
40	0,0 – 0,8
82	0,0 – 0,6
67	0,5
44	0,0 – 0,4
69	0,2
71	0,2
IS39	0,2
26	0,0 – 0,2
64	0,1
57	0

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

A. Mez detekce

Detekční mez byla stanovena pro 18 genotypů HPV (6, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82). Plasmidová DNA [kvantifikovaná spektrofotometrií (absorpce 260 nm)] pro každý genotyp byla rozředěna na minimálně 5 úrovní koncentrace pomocí roztoku PreservCyt Solution, který obsahuje 250 ng/ml lidské genomické DNA jako ředidla. Každý ze dvou operátorů provedl minimálně 4 běhy analýzy z nichž každý se skládal minimálně ze 3 replikátů na úroveň koncentrace celkově minimálně pro 24 replikátů na hladinu koncentrace. Pro každý z těchto 18 genotypů HPV byla provedena Probit analýza a odhadnutá 95% pozitivní míra detekce koncentrace pro každý genotyp je uvedena v tabulce 4. V tabulce 4 je dále uvedena nejnižší koncentrace s pozorovanou $\geq 95\%$ pozitivní mírou detekce a při níž všechny vyšší koncentrace pozorovaly $\geq 95\%$ pozitivní míru detekce.

Tabulka 4
Výsledky detekční meze pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV

HPV genotyp	Probit predikovala 95% úspěšnost detekce koncentrace (kopii/ml)	Pozorovaná LOD (koncentrace $\geq 95\%$ pozitivní míry detekce) (kopii/ml)
6	2319	2000
16#	195	200
18#	580	1300
26	2935	6000
31#	1863	6600*
33#	4000	20 000**
35#	466	600
39#	1367	1500
45#	401	900
51#	181	260
53	256	400
56#	6915	12 000
58#	185	250
59#	53	76
66	250	300
68#	848	900
73	165	300
82	8089	20 000

Identifikovány jako genotypy s vysokým rizikem spojené s vysokým stupněm cervikální dysplazie a cervikálním karcinomem³⁻⁵.

* Pro genotyp 31 byly pozorovány $> 95\%$ míry detekce při 2000, 1300, 900 a 660 kopiích/ml a 92% míra detekce byla pozorována při 3300 a 3000 kopiích/ml.

** Pro genotyp 33 byly pozorovány $> 95\%$ míry detekce při 4 000 a 2 700 kopiích/ml a 92% míra detekce při 6700 kopiích/ml a 94% míra detekce při 13000 kopiích/ml.

B. Genotypová inkluzivita: Plasmidová DNA

Genotypová inkluzivita byla stanovena analýzou plasmidů 36 HPV genotypů (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 a CP6108). Plasmidová DNA pro HPV genotyp 52 nebyla dostupná pro testování. Inkluzivita pro HPV typ 52 byla demonstrována ve studiích s klinickým vzorkem (část C). Pro HPV genotypy 6, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82 byla inkluzivita demonstrována ve studii detekční meze. Zbývajících 18 dostupných plasmidových DNA genotypů HPV bylo kvantifikováno spektrofotometricky (260 nm absorpce), rozředěných na 900 kopiích/ml v roztoku PreservCyt a pak testových v šesti replikátech za použití dvou šarží činidla. Pro jakýkoli genotyp HPV, který nebyl detekován se 100% mírou pozitivnosti při 900 kopiích/ml, bylo provedeno doplňkové testování za použití vzrůstajících koncentrací plasmidové DNA do stanovení 100% hladiny inkluzivity (n=6) pro daný genotyp. Výsledky ukázaly, že genotypizační test LINEAR ARRAY HPV může detekovat 36 HPV genotypů z plasmidové DNA HPV při různých koncentracích v závislosti na HPV genotypu (tabulka 5).

Tabulka 5
Genotypová inkluzivita pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV

HPV genotyp	Hladina inkluzivity* (kopie/ml)	HPV genotyp	Hladina inkluzivity* (kopie/ml)
6	2319	59#	53
11	900	61	900
16#	195	62	900
18#	580	64	300 000
26	2935	66	250
31#	1863	67	30 000
33#	4000	68#	848
35#	466	69	900
39#	1367	70	900
40	70 000	71	900
42	30 000	72	900
45#	401	73	165
51#	181	81	900
53	256	82	8089
54	900	83	900
55	900	84	900
56#	6915	CP6108	900
58#	185	IS39	1500

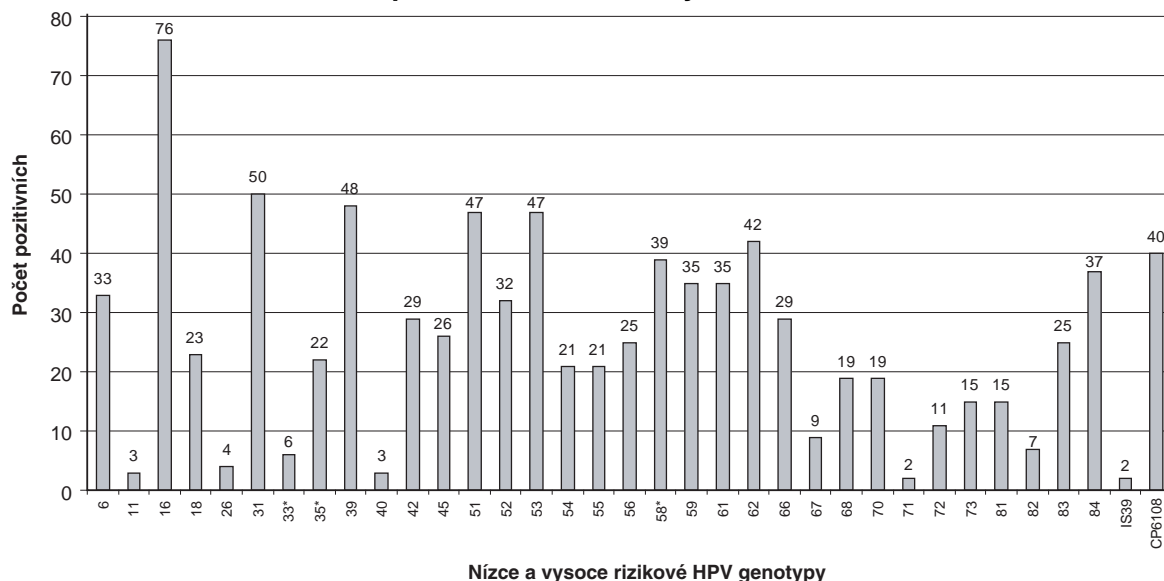
* Hladina inkluzivity se rovná 100% míře positivity detekce (n=6) při uvedených koncentracích s výjimkou HPV genotypů 6, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82, u nichž je uvedená koncentrace 95% mírou positivity detekce odhadnuté analýzou Probit.

Identifikovány jako genotypy s vysokým rizikem spojené s vysokým stupněm cervikální dysplazie a cervikálním karcinomem³⁻⁵.

C. Genotypová inkluzivita: Klinické vzorky

Během hodnocení výkonnosti bylo testováno celkově 451 klinických vzorků pozitivních na HPV použitím genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV. 35 z 37 genotypů HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 a CP6108) bylo detekováno v klinických vzorcích pomocí genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV, čímž byla demonstrována inkluzivita. Distribuce těchto HPV genotypů je ukázána na obrázku 1. V rámci hodnocení výkonnosti nebyly v klinickém vzorku detekovány HPV genotypy 64 a 69.

Obrázek 1
Distribuce HPV genotypů v LINEAR ARRAY HPV pozitivních klinických vzorcích (n=451) v průběhu hodnocení výkonnosti



Nízce a vysoce rizikové HPV genotypy

* U 58 klinických vzorků, které byly při testu pozitivní na DNA HPV 33, HPV 35 resp. HPV 58 nebylo možné vyloučit koinfekci s HPV genotypem 52.

D. Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla hodnocena se 3-mi šaržemi činidel, kombinací 5-ti zařízení (termocyklery a vodní lázně) a 3 operátorů v průběhu celkově 15 běhů. Každý operátor provedl celkově 5 běhů s každou ze tří šarží činidel a s jedním během provedeným na každé z 5-ti kombinací zařízení. Byl připraven čtyřčlenný panel skládající se ze čtyř HPV genotypů (16, 18, 31 a 45) v roztoku PreservCyt obsahujícím 250 ng/ml lidské genomické DNA. Členové panelu byli připraveni s každým genotypem při 2000 kopiích/ml a také při nízké (~3 až 4 násobek LOD), střední (~10 až 15-ti násobek LOD) a vysoké (~100 až 150-ti násobek LOD) koncentraci. Každý člen panelu byl testován trojnásobně za použití každé šarže činidla pro každý běh. Pro HPV genotypy 16, 18, 31 a 45 byla 99% pozitivní míra detekce prokázána při 2000 kopiích/ml a při nízké koncentraci. 100% pozitivní míra detekce byla prokázána pro HPV genotypy 16, 18, 31 a 45 při střední a vysoké koncentraci (tabulka 6). Nebyla zaznamenána žádná významná variabilita mezi jednotlivými běhy, šaržemi, operátory nebo zařízeními.

Tabulka 6
Reprodukovatelnost pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV

Člen panelu	HPV 16 DNA (kopií/ml)	HPV 18 DNA (kopií/ml)	HPV 31 DNA (kopií/ml)	HPV 45 DNA (kopií/ml)	Testovaný počet	LINEAR ARRAY HPV výsledky genotypizačního testu HPV pozitivní		
						Pozitivní výsledky	%	95% CI (interval spolehlivosti)
Vysoký	12 000	81 500	192 000	25 100	135	135	100%	98-100%
Střední	1200	8150	19 200	2510	135	135	100%	98-100%
Nízký	360	2445	5760	753	135	133	99%	95-100%
2000 (kopií/ml)	2000	2000	2000	2000	135	133	99%	95-100%

E. Analytická specifita: Jiné než HPV mikroorganismy

Pro zhodnocení specifity testu pro vyloučení jiných než HPV mikroorganismů byly přidány kulturované bakterie, viry, prvoci nebo kvasinky uvedené v tabulce 7 do roztoku PreservCyt obsahujícím 250 ng/ml lidské genomické DNA a byly testovány genotypizačním testem LINEAR ARRAY HPV. Koncentrace testovaných mikroorganismů se pohybovala v rozmezí $3,5 \times 10^2$ až $2,0 \times 10^3$ IFU/ml pro *C. trachomatis*, 1×10^6 PFU/ml pro Herpes viry, 8×10^5 buněk/ml pro *T. vaginalis*, 2×10^2 až 2×10^3 CFU/ml pro *C. neoformans* a $1,5 \times 10^4$ až $9,8 \times 10^9$ CFU/ml pro zbývající mikroorganismy kromě *H. ducreyi*, *M. hominis* a *N. gonorrhoeae*, pro něž nebyly koncentrace známy. Výsledky ukázaly, že genotypizační test LINEAR ARRAY HPV nevykazuje zkříženou reaktivitu s řadou virů, bakterií, prvoků a kvasinek, které by mohly být přítomny v cervikálních vzorcích.

Tabulka 7
Testované mikroorganismy jiné než HPV

<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Acinetobacter sp. genospecies 3</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Pasteurella maltocida</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pediococcus acidilactica</i>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Ewingella americana</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Prevotella corporis</i>
<i>Bacteriodes fragilis</i>	<i>Gamella morbillorum</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Bifidobacillus longum</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Herpes simplex virus 1</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Herpes simplex virus 2</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Serratia denitrificans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> typ D	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss ozaenae	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> typ F	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Chromobacter violaceum</i>	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Treponema phagedenis</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Deinococcus radiopugnans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Derxia gummosa</i>	<i>Morganella morganii</i>	

F. Analytická specifita: HPV genotypy

Genotypová specifita HPV pro každou linii HPV sondy na HPV proužku byla hodnocena testováním vysokých koncentrací plasmidové HPV DNA pro 36 HPV genotypů (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 a CP6108). Plasmidová DNA pro HPV genotyp 52 nebyla dostupná pro testování. Dostupné plasmidové HPV DNA byly kvantifikovány měřením 260 nm absorbce na spektrofotometru a ředěním na 500 000 kopií/ml v TE pufru (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). Každý plasmidový HPV genotyp byl amplifikován a detekován v duplikátu použitím genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV. Výsledky ukázaly specifitu HPV genotypu pouze k očekávané linii sondy pro 36 genotypů HPV hodnocených s plasmidovou DNA. Vedle toho byla ukázána specifita HPV genotypu 52 k očekávané linii sondy při testování klinického vzorku (genotyp potvrzen sekvenováním) o neznámém titru HPV.

G. Senzitivita a specifická pro detekci HPV z klinických vzorků

Senzitivita a specifická genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV pro detekci vysoce rizikové HPV DNA z klinických vzorků byla hodnocena testováním 698 cervikálních vzorků odebraných do roztoku PreservCyt. Pro účely této studie byly HPV genotypy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68 klasifikovány jako vysoce rizikové. 487 těchto vzorků bylo negativních a 211 bylo pozitivních pro vysoce rizikové HPV dle testu Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA Test (HC2 HPV Test). Přítomnost nebo absence vysoce rizikové HPV DNA ve vzorcích byla stanovena pomocí shody mezi těmito dvěma testy. Neshodné výsledky byly dořešeny další analýzou vzorků pomocí testu AMPLICOR® HPV Test. Na základě dohody o výsledcích pro 2 ze 3 analýz bylo stanoveno správné rozdělení pro každý klinický vzorek (tzn. správně pozitivní pro vysoce rizikové HPV DNA nebo správně negativní pro vysoce rizikové HPV DNA). Výsledky pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV jsou uvedeny v tabulce 8. Z 485 klinických vzorků, které byly správně negativní pro vysoce rizikovou HPV DNA, bylo 118 klinických vzorků, které byly pozitivní pro níže rizikovou HPV DNA podle genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV. Rozdělení níže rizikových HPV genotypů detekovaných u těchto 118 klinických vzorků je uvedeno na obrázku 2. Senzitivita a specifická na přítomnost vysoce rizikové HPV DNA v cervikálních vzorcích odebraných do roztoku PreservCyt byla 96%, resp. 99% pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV (tabulka 9).

Tabulka 8
Výsledky klinických vzorků při použití genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV

Výsledky genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV*	Počet klinických vzorků
Správně pozitivní	197
Správně negativní	485
Falešně negativní	9
Falešně pozitivní	3
Neplatný	4
Celkem	698

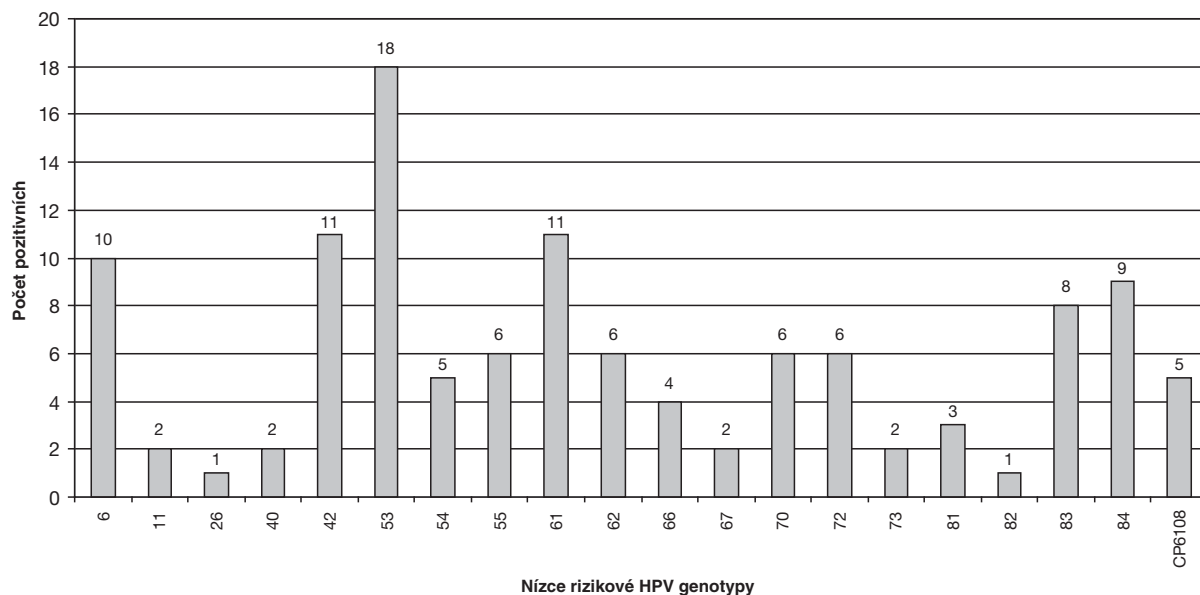
* Pozitivní výsledek znamená pozitivitu pro vysoce rizikovou HPV DNA. Vzorky, které jsou pozitivní pouze pro níže rizikovou HPV DNA jsou pro tuto analýzu klasifikovány jako negativní.

Tabulka 9
Specifická a senzitivita genotypizačního testu LINEAR ARRAY HPV pro vysoce rizikovou HPV DNA

Parametr	Odhad	95% CI*
Senzitivita	96%	92-98%
Specifická	99%	98-100%

* 95% Waldův interval spolehlivosti

Obrázek 2
Rozdělení nízce rizikových genotypů HPV v klinických vzorcích, které byly negativní pro vysoce rizikovou HPV DNA (n=118) při hodnoceních specificity a senzitivity



H. Selhání celého systému

Míra selhávání celého systému byla pro genotypizační test LINEAR ARRAY HPV stanovena hodnocením 135 výsledků testů pro každý ze čtyř HPV genotypů (16, 18, 31 a 45) při koncentracích třikrát vyšších než je detekční mez (detekční mez byla stanovena jako Probit analýzou předpověděná 95% pozitivní míra detekce). Testové roztoky obsahující plasmidovou DNA pro čtyři HPV genotypy byly připraveny v roztoku PreservCyt a také obsahovaly 250 ng/ml lidské genomické DNA. Dohromady z celkového počtu 540 pokusů pro čtyři HPV genotypy byly zaznamenány dvě systémová selhání (HPV negativní a beta-globin pozitivní) s mírou selhání celého systému 0,4%.

LITERATURA

1. Burd, Eileen M. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**:1-17.
2. zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. *Nat Rev Cancer*. **2(5)**:342-50.
3. Walboomers, Jan M. M., Marcel V. Jacobs, M. Michele Manos, et al. 1999. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *Journal of Pathology*. **189**:12-19.
4. Bosch, F. Xavier, M. Michele Manos, Nubia Munoz, et. al. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. 1995. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 87, No. 11:796-802.
5. Davies, Philip, Janet Kornegay, and Thomas Iftner. 2001. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 15, No. 5:677-700.
6. Koutsky, L. 1997. Epidemiology of genital human Papillomavirus infection. *American Journal of Medicine*. **102(5A)**:3-8.
7. Richardson, H., et al. 2003. The Natural History of Type-Specific Human Papillomavirus Infections in Female University Students. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. **12**:485-490.
8. Kjaer, S., et al. 2002. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ*. Vol. 325:572.
9. Costa, S., et al. 2003. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conization. *Gynecologic Oncology*, 2003, August; **90(2)**:358-365.
10. Yutaka, N., et al. 2004. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004, 191, 1907-1913.
11. Nobeyama, H., et al. 2004. Association of HPV infection with prognosis after neoadjuvant chemotherapy in advanced uterine cervical cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 2004, July; **14(1)**:101-105.
12. Koutsky, L., et al. 2002. A Controlled Trial of a Human Papillomavirus Type 16 Vaccine, *NEJM*, Vol. **347(21)**:1645-1651.
13. Myers, T.W. and Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**:7661-7666.
14. Gravitt P.E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C.M.Wheeler, F. Coutlée, A. Hildesheim, M.H. Schiffman, D.R. Scott, and R.J. Apple. 2000. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:357-361.
15. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
16. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline-Third Edition*. CLSI document C24-A3 (ISBN 1-56238-613-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
18. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 41.st Edition. 2000. 704 pp.
19. Clifford, et al., Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta analysis, *British Journal of Cancer*, (2003) 88, 63-73.
20. Peyton, et al., Determinants of Genital Human Papillomavirus Detection in a US Population, *The Journal of Infectious Diseases*, 2001; **183**:1554-1564.
21. Muñoz, et al., Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer, *New England Journal of Medicine*, 2003; **348**:518-527.
22. Bernard, et al., Identification and Assessment of Known and Novel Human Papillomaviruses by Polymerase Chain Reaction Amplification, Restriction Fragment Length Polymorphisms, Nucleotide Sequence, and Phylogenetic Algorithms, *The Journal of Infectious Diseases*, 1994; **170**:1077-1085.

Informace k revizi dokumentu

Doc Rev. 8.0
4/2011

Část **SKLADOVÁNÍ VZORKŮ** byla změněna a uvádí nyní, že vzorky odebrané do média **cobas**[®] PCR Cell Collection Media nebo roztoku PreservCyt, mohou být skladovány při teplotě 2–30 °C až po dobu 6 měsíců.

Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA
Člen skupiny Roche



Distributed by

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.
Av. de la Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguapé, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Quebec
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
F-38240 Meylan

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics SpA
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Roche Farmacêutica Química, Lda
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

ROCHE, COBAS, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLILUTE, AMPLITAQ, AMPLITAQ GOLD a LINEAR ARRAY jsou obchodní značky společnosti Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER je servisní značka společnosti Roche.

Technologie prevence přenosu v enzymu AmpErase je chráněna patenty U.S.A č. 5,035,996, 5,683,896, 5,945,313, 6,287,823, 6,518,026 a zahraničními protějšky, které vlastní společnost Invitrogen Corporation a které jsou licencovány společností Roche Molecular Systems, Inc.

ADVANTAGE-S je registrovaná obchodní známka Columbia Laboratories, Inc.

BETADINE je registrovaná obchodní známka Purdue Pharma L.P.

DELFIN, K-Y a MONISTAT jsou registrované obchodní známky a ORTHO OPTIONS je obchodní známka společnosti Johnson a Johnson.

EPPENDORF MULTIPETTE, EPPENDORF COMBITIP a BIOPUR jsou registrované obchodní známky společnosti Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburk, Německo.

GENEAMP a MICROAMP jsou registrované obchodní známky společnosti Applera Corporation nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech a některých dalších zemích.

GYNECORT a VAGISIL jsou registrované obchodní známky Combe Incorporated.

GYNE-LOTRIMIN je registrovaná obchodní známka společnosti Schering-Plough Healthcare Products.

HYBRID CAPTURE, QIAAMP, MINELUTE a QIAGEN jsou registrované obchodní známky společnosti QIAGEN Inc.

LABOPORT je registrovaná obchodní známka společnosti KNF Neuberger GmbH.

MYCELEX je registrovaná obchodní známka společnosti Bayer, jejích dceřiných a přidružených společností, licenciantů nebo partnerů ve společných podnicích.

NORFORMS je registrovaná obchodní známka společnosti C.B. Fleet Company, Inc.

PIPET-AID je registrovaná obchodní známka společnosti Drummond Scientific Company.

PRESERVCYT je registrovaná obchodní známka společnosti Cytoc Corporation.

PROCLIN je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

PYREX je registrovaná obchodní známka společnosti Corning Incorporated.

SHARPIE je registrovaná obchodní známka společnosti Sanford nebo jejích poboček.

VAGI-GARD je registrovaná obchodní známka a YEAST GARD je obchodní známka společnosti Lake Consumer Products, Inc.

VAGINEX je registrovaná obchodní známka společnosti Quality Health, Inc.

Copyright 2011 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

4/2011

(04392116001-08ENGL)
04700597001-08

Doc Rev. 8.0



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

