



AMPLICOR® Human Papilloma Virus (HPV) Test

PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

AmpliLute™ Liquid Media Extraction Kit	EXTRN	50 Tests	P/N: 03750540 190
AMPLICOR HPV Controls Kit	HPV CTL	4 Sets	P/N: 03610756 190
AMPLICOR HPV Amplification Kit	HPV AMP	96 Tests	P/N: 03610799 190
AMPLICOR HPV Detection Kit	HPV MWP DK	96 Tests	P/N: 03610721 190

POUŽITÍ

Test AMPLICOR na lidský papilloma virus (HPV) je kvalitativní test prováděný *in vitro* ke zjištění lidského papilloma viru v klinických vzorcích. Využívá se při něm amplifikace terčové DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a hybridizace nukleové kyseliny k detekci DNA vysoce rizikových virů HPV genotypu 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68 v cervikálních buňkách odebraných do kapalného média.

SOUHRN A PODSTATA TESTU

Persistentní infekce lidským papilloma virem (HPV) je hlavní příčinou rakoviny děložního krčku a jeho prekursoru, intraepiteliální neoplazie děložního krčku (CIN)¹⁻³. Ve světě byla HPV přítomna ve více než 99% případů rakoviny děložního krčku³. HPV je malý virus s nebalenou dvouřetězovou DNA, s genomem o zhruba 8000 nukleotidech. Genotypů HPV je více než 100 a zhruba 40 z nich může infikovat lidské genitální sliznice. Ovšem pouze podmožina těchto sexuálně přenosných virových genotypů je spojena s vysokou dysplazií a rakovinou děložního krčku³⁻⁵. Těm se říká vysoce rizikové HPV, zatímco nízkorizikové genotypy HPV jsou často spojeny s benigními nízkými intraepiteliálními lézemi nebo kondylomy. Pohlavní infekce virem HPV je velice běžná odhaduje se, že až 75% všech žen je někdy viru HPV vystaveno⁶. Většina infekcí HPV mizí spontánně, persistence vysoce rizikového HPV je však významným rizikovým faktorem pro vznik rakoviny děložního krčku.

V rozvinutých zemích, kde se na rakovinu děložního krčku provádí plošné vyšetření, se od poloviny padesátých let minulého století používá jako primární nástroj k detekci raných prekursorů karcinomu děložního krčku tzv. Papův stěr (podle Dr. George Papanicolaou). Díky tomu se úmrtnost na rakovinu děložního krčku v těchto zemích výrazně snížila, ovšem Papův stěr musí interpretovat vysoce odborně zdatný cytopatolog a test je poměrně nepřesný, s vysokou četností falešně negativních výsledků. Cytologické abnormality zjišťované při Papově stěru jsou způsobeny zejména infekcí virem HPV; ovšem různé zánětlivé variace nebo variace v odběru vzorků mohou vyústit ve falešně pozitivním výsledku Papova testu. Třídění abnormálního Papova stěru zahrnuje opakovaný test, kolposkopii a biopsii. Histologicky potvrzenou lézi vysokého stupně je třeba chirurgicky odstranit, aby se předešlo vzniku invazivního karcinomu děložního krčku.

Papillomavirus se mimořádně obtížně kultivuje *in vitro* a ne všichni pacienti, kteří jsou tímto virem infikováni, mají prokazatelnou reakci protilátek. Proto představuje testování na nukleovou kyselinu (DNA) reakcí PCR citlivou a neinvazivní metodu pro zjišťování aktivní cervikální infekce virem HPV. Zavedení testu na nukleovou kyselinu HPV je slibné pro zvýšení citlivosti a ekonomické efektivity programů plošného vyšetřování na rakovinu děložního krčku, protože se tak vysoce rizikové léze zjistí dříve a není tolik nutné provádět nadbytečnou kolposkopii a léčbu.

POSTUP

AMPLICOR HPV Test je založen na čtyřech hlavních postupech: příprava vzorků; PCR amplifikace⁷ terčové DNA za použití HPV-specifických komplementárních primerů; hybridizace amplifikovaných produktů na oligonukleotidové sondy a detekce takto navázaných amplifikovaných produktů kolorimetrickým stanovením.

AMPLICOR HPV Test umožňuje současnou PCR amplifikaci terčové DNA HPV a DNA β -globinu (buněčná kontrola). Činidlo Master Mix obsahuje dvojici primerů na DNA ze 13 vysoce rizikových genotypů HPV a DNA β -globinu. Detekce amplifikované DNA (amplikonu) se provádí pomocí oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci amplikonů HPV a β -globinu.

Příprava vzorku

DNA HPV se uvolňuje lýzou vzorků cervikálních buněk za denaturačních podmínek za zvýšených teplot. Lýza se provádí za přítomnosti proteinázy K, chaotropního činidla a detergentu; pak následuje izolace a čištění uvolněné nukleové kyseliny na sloupci a eluce vhodným elučním činidlem. Souběžně se izoluje gen β -globinu, který slouží k posouzení buněčné adekvátnosti, extrakce a amplifikace každého jednotlivého zpracovávaného vzorku.

PCR amplifikace

Volba terčové sekvence

V testu AMPLICOR HPV Test se používají primery k definování sekvence nukleotidů v polymorfním regionu L1 genomu HPV, který je dlouhý zhruba 165 bp. Směsí primerů HPV v činidle Master Mix se dá amplifikovat DNA HPV 13 vysoce rizikových genotypů, a to 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68³⁻⁵. Sekvence záchytové sondy se nacházejí v polymorfních regionech L1 vázaných těmito primery.

Další primerový pár se zaměřuje na gen lidského β -globinu (268 bp ampikon) pro kontrolu adekvátnosti buněk, extrakce a amplifikace.

Amplifikace terče

AmpliTaQ GOLD[®] k amplifikaci „s horkým startem“ terčové DNA HPV a β -globinové kontroly se používá DNA polymeráza. Nejprve se reakční směs pro PCR zahřívá, aby se aktivovala AmpliTaQ GOLD DNA polymeráza k denuraci virové DNA a genomické DNA a expozici primerových terčových sekvencí. Během ochlazování směsi dochází k anelaci upstream primerů k sekvencím terčové DNA. AmpliTaQ GOLD DNA polymeráza za přítomnosti Mg^{2+} a nadbytku dNTPs primer(y) prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se uzavírá první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii terčového regionu genomu HPV a genu β -globinu. Reakční směs se opět zahřeje k oddělení výsledné dvouřetězcové DNA a exponování sekvencí primerového terče. Během ochlazování směsi dochází k anelaci primerů (upstream i downstream) k terčové DNA. AmpliTaQ GOLD DNA polymeráza prodlužuje primery po anelaci podél terčových templátů a poskytuje molekulu dvouřetězcové DNA terčového HPV se zhruba 165 páry bází nebo molekulu DNA β -globinu se 268 páry bází, které se říká ampikon. Tento proces se mnohokrát opakuje a v každém cyklu se množství ampikonové DNA zdvojnásobuje. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HPV nebo genu β -globinu mezi příslušným primerovým párem; celý genom amplifikován není.

Selektivní amplifikace

K selektivní amplifikaci cílové nukleové kyseliny v klinických vzorcích se v testu AMPLICOR HPV používá enzym AmpErase[®] (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridintrifosfát (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin⁸, ale nikoli DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přiložené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v ampikonu díky tomu, že se jako jeden z dNTP v činidle Master Mix místo thymidintrifosfátu používá deoxyuridintrifosfát; proto je deoxyuridin obsažen pouze v ampikonu. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující ampikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací terčové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažen ve směsi Master Mix, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec ampikonové DNA v prvním tepelně cykličačním kroku při alkalickém pH činidla Master Mix zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je při teplotách nad 55°C, tedy během celé tepelné fáze cyklu, neaktivní a nerozbíjí cílový ampikon. Po amplifikaci je případně zbývající enzym denaturován přidávkem denaturačního roztoku, čímž se předejde rozrušení terčového ampikonu. Bylo prokázáno, že enzym AmpErase, který je součástí testu AMPLICOR HPV, inaktivuje nejméně 10³ kopií HPV ampikonu obsahujícího deoxyuridin per PCR.

Hybridizace

Po PCR amplifikaci je ampikon HPV β -globinu přidávkem denaturačního roztoku chemicky denaturován na jednořetězcovou DNA. Alikvotní podíly denaturovaného ampikonu se odměří do jamek mikroploten (MicroWell Plates, MWP) potažených sondami vysoce rizikového HPV nebo β -globin-specifickými (B_PCO3) oligonukleotidovými sondami. Biotinem značený ampikon HPV a β -globinu je k oligonukleotidovým sondám vázaným na jamky MWP hybridizován. Touto hybridizací ampikonu k sondám se zvyšuje celková specifičnost testu.

Detekce

Po skončení hybridizační reakce se MWP vypláchnou aby se odstranil nnavázaný materiál, a do každé jamky se přidá konjugát avidin-křenové peroxidázy. Tento konjugát se na biotinem značený ampikon hybridizovaný k oligonukleotidovým sondám (HPV nebo β -globinu) vázaným k MWP naváže. MWP se znovu vypláchnou, aby se odstranil nnavázaný konjugát, a do jamek se přidá substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB). Navázaná křenová peroxidáza katalyzuje v přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci TMB a vytváří barevný komplex. Reakce se zastaví přidáním slabé kyseliny a automatickou čtečkou mikroploten se měří absorbance při 450 nm.

ČINIDLA

AmpliLute Liquid Media Extraction Kit

Extrakční souprava AmpliLute Liquid Media

(P/N: 03750540 190)

EXTRN

50 testů

CAR

(Nosič RNA)

1 x 310 µg

Syntetická RNA lyofilizovaná

(Přidat AVE)

PK

(Proteináza K)

1 x 1,25 ml

Proteináza K, Serin-proteináza Tritirachium album

Xn  Proteináza K

Zdraví škodlivý

R: 36/37/38-42/43

Dráždí oči, dýchací orgány a kůži. Vdechnutí a styk s pokožkou může vyvolat zcitlivění.

S: 23-24-26-36/37

Nevdechovat sprej. Zamezit styku s pokožkou. V případě, že se látka dostane do očí, vypláchnout je velkým množstvím vody a vyhledat lékařskou pomoc. Nosit vhodný ochranný oděv a 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

(Přidat ethanol)

ATL

(Pufr na lýzu tkáně)

1 x 10 ml

EDTA

≤ 10% dodecylsulfát sodný

AL

(Pufr pro lýzu)

1 x 33 ml

≤ 50% guanidin HCl

Xn  25-50% guanidin HCl

Zdraví škodlivý



R: 22-36/38

Je-li požit, je zdraví škodlivý. Dráždí oči a kůži.

S: 13-26-36-46

Uchovávat mimo potraviny, nápoje a krmivo. Dostane-li se do očí, vypláchnout je velkým množstvím vody a vyhledat lékařskou pomoc. Nosit vhodný ochranný oděv. V případě požití vyhledat okamžitě lékařskou pomoc a ukázat tuto nádobku nebo štítek.

EXT (Kolonové nástavce, 3 ml)		50 testů
VC (VakKonektory)		50 testů
ELT (Eluční trubičky, 1,5 ml)		50 testů
CLM (Kolonky QIAamp® MinElute™)		50 testů
Křemenná membrána		
AMPLICOR HPV Controls Kit Kontrolní souprava AMPLICOR HPV (P/N: 03610756 190)	HPV CTL	4 sady
HPV (+) C [Kontrola HPV (+)]		4 x 0,5 ml
Tris-HCl pufr		
EDTA		
0,05% azid sodný		
< 0,002% poly rA RNA (syntetická)		
< 0,0001% neinfekční plazmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvenci HPV 16		
< 0,0001% neinfekční plazmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvence lidského β-globinu		
HPV (-) C [Kontrola HPV (-)]		4 x 0,5 ml
Tris-HCl pufr		
EDTA		
0,05% azid sodný		
< 0,002% poly rA RNA (syntetická)		
AMPLICOR HPV Amplification Kit Amplifikační souprava AMPLICOR HPV (P/N: 03610799 190)	HPV AMP	96 testů
HPV MMX (Činidlo Master Mix na HPV)		4 x 1,25 ml
Tris-pufr		
Chlorid draselný		
< 0,001% AmpliTaq GOLD DNA polymeráza (mikrobiální)		
< 0,001% AmpErase® (uracil-N-glykosyláza) enzym (mikrobiální)		
< 0,15% dATP, dCTP, dGTP, dUTP		
≤ 0,001% upstream a downstream primery (biotinylované)		
0,05% azid sodný		
< 1% Tween 20		
HPV MgCl₂ (Chlorid hořečnatý pro HPV)		4 x 0,15 ml
< 1% chlorid hořečnatý		
Amarantové barvivo		
0,05% azid sodný		
AMPLICOR HPV Detection Kit Detekční souprava AMPLICOR HPV (P/N: 03610721 190)	HPV MWP DK	96 testů
HPV MWP (Mikroplotna na HPV)		1 x 96 testů
Mikroplotna potažená HPV-specifickými DNA sondami (A16A, S18A, A31A, A35A, A39A, A45A, A51A, A3x5xC, A56A, A58A, S59A, A68A)		
Dvanáct 8-jamkových stripů v jednom opakovaně a těsně uzavíratelném sáčku s vysoušecím prostředkem		
BG MWP (Mikroplotna pro β-globin)		1 x 96 testů
Mikroplotna potažená β-globin-specifickou DNA sondou (B_PC03)		
Dvanáct 8-jamkových stripů v jednom těsně uzavíratelném sáčku s vysoušecím prostředkem		

<p>[1] DN (Denaturační roztok)</p> <p>1,6% hydroxid sodný EDTA Thymolová modř</p> <p>Xi  1,6% hm. hydroxid sodný</p> <p>Dráždivý</p>	1 x 12 ml
<p>[2] HPV HYB (Hybridizační pufr na HPV)</p> <p>Roztok fosforečnanu sodného < 0,2% rozpouštědlo < 25% thiokyanát sodný</p>	2 x 12 ml
<p>[3] AV-HRP (Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)</p> <p>Pufr Tris-HCl < 0,001% konjugát avidinu s křenovou peroxidázou Bovinní serumalbumin (savčí) Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) 0,1% fenol 1% ProClin 150</p>	2 x 12 ml
<p>[4A] SUB A (Substrát A)</p> <p>Citrátový roztok 0,01% peroxid vodíku 0,1% ProClin 150</p>	2 x 12 ml
<p>[4B] SUB B (Substrát B)</p> <p>0,1% 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) 40% dimethylformamid (DMF)</p> <p>T  40% hm. dimethylformamid (DMF)</p> <p>Toxický</p> <p>R: 61-20/21-36 Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.</p> <p>S: 53-45 Vyhňte se expozici – před použitím si vyžádejte speciální pokyny. V případě nehody nebo cítíte-li se nedobře, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc (pokud možno ukažte štítek).</p>	2 x 3 ml
<p>[5] STOP (Stop činidlo)</p> <p>4,9% kyselina sírová</p>	2 x 12 ml
<p>10X WB (Promývací koncentrát 10X)</p> <p>< 2% fosfátový pufr < 9% chlorid sodný EDTA < 2% detergent 0,5% ProClin 300</p>	4 x 90 ml

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Tento test se aplikuje na lidské cervikální buňky odebrané do kapalného média.
- C. Nepipetovat ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejíst, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek ochrany očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Při odebírání podílů z lahvíček s činidly dbejte, abyste zabránili jejich mikrobiální kontaminaci či kontaminaci DNA. Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety prosté DNázy.
- F. Nesměšujte dohromady činidlo z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- G. Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- H. Po vypršení lhůty použitelnosti již soupravu nepoužívejte.
- I. Materiálové bezpečnostní listy (MSDS) zašle na vyžádání vaše místní pobočka firmy Roche.
- J. Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním 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 terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
- K. Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními a používat odpovídající laboratorní postupy, například ty, jež jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁹ nebo v dokumentu NCCLS M29-A¹⁰. 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%. Roztok o koncentraci 0,5% tedy získáme zředěním bělicího prostředku pro domácnost v poměru 1:10.

- L. **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 rozlitá 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.
- M. **AVE, AW2, HPV MMX, HPV MgCl₂, HPV (-) C a HPV (+) C** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověnými nebo měděnými armaturami a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Budete-li tedy vylévat roztoky obsahující azid do laboratorní výlevky, spláchněte je velkým objemem vody, aby se azid nemohl nikde usadit.
- N. Při manipulaci s **HPV MMX, HPV MgCl₂, [1] DN, [2] HPV HYB, [3] AV-HRP, [4A] SUB A, [4B] SUB B**, pracovním substrátem (směs činidel **[4A] SUB A** a **[4B] SUB B**) a **[5] STOP** noste prostředky ochrany očí, laboratorní plášť a rukavice na jedno použití. Dbejte, 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. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, před vytřením dosucha je zředte vodou.
- O. Zabraňte kontaktu kůže a sliznic s **[4B] SUB B** nebo s pracovními substráty. Pokud se některá z těchto látek do styku s pokožkou dostane, okamžitě ji omyjte velkým množstvím vody.
- P. **[4B] SUB B** a pracovní substrát obsahují dimethylformamid, který je při požití většího množství toxický a může poškodit lidský plod. Potřísnění kůže, vdechnutí par a požití je třeba se vyvarovat. Pokud ke styku s pokožkou dojde, omyjte ji důkladně vodou a mýdlem a vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.
- Q. **[2] HPV HYB**, jenž obsahuje thiokyanát sodný, se nesmí dostat do styku s roztokem chlornanu sodného (bělicím prostředkem). Tato směs vytváří vysoce jedovatý plyn.

ZACHÁZENÍ SE VZORKY A JEJICH SKLADOVÁNÍ

- A. **Činidla nezmrazujte.**
- B. **CLM** a **PK** z extrakční soupravy AmpliLute Liquid Media Extraction Kit uchovávejte při teplotě 2-8°C, ostatní činidla ze soupravy AmpliLute Liquid Media Extraction Kit uchovávejte při teplotě 2-25°C. Po otevření je možno případně nespotebované podíly **AL, ATL** a **AVE** uschovat pro pozdější testy, je ovšem třeba dodržet výše uvedené skladovací podmínky. **CAR** po rekonstrukci pomocí **AVE** je možno uchovávat po

dobu 24 hodin při teplotě 2-8°C, nebo je možno jej rozdělit na alikvotní podíly a skladovat při teplotě -20°C. Potom co je k **AW2** přidán ethanol, je možno případný nespotřebovaný podíl skladovat při teplotě 2-25°C po dobu 1 roku (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší). Potom co je k **AL** přidán rekonstituovaný **CAR**, je třeba případný nespotřebovaný zbytek pracovního **AL** zlikvidovat.

- C. **HPV MMX** a **HPV MgCl₂** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespotřebovanou část zlikvidovat. Pracovní činidlo Master Mix (připravené tak, že se k **HPV MMX** přidá **HPV MgCl₂**) se uchovává při teplotě 2-8°C a je třeba je spotřebovat do 4 hodin od přípravy.
- D. **HPV (-) C** a **HPV (+) C** uchovávejte při teplotě 2-8°C. Tyto látky jsou stálé do vyznačeného data expirace. Po otevření je třeba nespotřebovanou část zlikvidovat.
- E. **[1] DN**, **[2] HPV HYB** a **[5] STOP** uchovávejte při teplotách 2-25°C. Látky jsou stálé do vyznačeného data expirace.
- F. **HPV MWP** a **BG MWP** uchovávejte při teplotě 2-8°C v dodaném plastovém vaku. Po otevření jsou **HPV MWP** a **BG MWP**, uchovávané při teplotě 2-8°C v těsně uzavřeném vaku s vysoušedlem, stále 3 měsíce (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší).
- G. **[3] AV-HRP**, **[4A] SUB A** a **[4B] SUB B** uchovávejte při teplotách 2-8°C. Neotevřeny zůstávají tyto látky stálé do vyznačeného data expirace. Po otevření jsou při teplotách 2-8°C stále ještě 3 měsíce (nebo do data expirace, je-li tato doba kratší).
- H. Pracovní substráty musejí být připravovány denně čerstvé. Připraví se smícháním **[4A] SUB A** s **[4B] SUB B**; při pokojové teplotě, chráněny před světlem, jsou stálé 3 hodiny. Zabráňte styku **[4A] SUB A**, **[4B] SUB B** a pracovních substrátů s kovy, oxidačními látkami a přímým světlem.
- I. **10X WB** uchovávejte při teplotách 2-25°C. **10X WB** je stálý do vyznačeného data expirace. Před zředěním **10X WB** prohlédněte a zpozorujete-li sraženinu, kapalinu zahřejte na 30–37°C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní promývací roztok (1X), připravený naředěním **10X WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou, se uchovává při teplotách 2-25°C v čisté uzavřené plastové lahvi. Je stálý 2 týdny od data přípravy.

MATERIÁLY, JEŽ JSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

AMPLICOR Human Papilloma Virus Test

- A. **AmpliLute Liquid Media Extraction Kit**
Extrakční souprava AmpliLute Liquid Media
(P/N: 03750540 190)

EXTRN

CAR

(Nosič RNA)

PK

(Proteináza K)

AVE

(Eluční pufr)

AW2

(Promývací pufr 2)

ATL

(Pufr na lýzu tkáně)

AL

(Pufr na lýzu)

EXT

(Kolonové nástavce, 3 ml)

VC

(Vakuové spojky)

ELT

(Eluční trubičky, 1,5 ml)

CLM

(Kolonky QIAamp® MinElute™)

- B. **AMPLICOR HPV Controls Kit**
Kontrolní souprava AMPLICOR HPV
(P/N: 03610756 190)

HPV CTL

HPV (+) C

[Kontrola HPV (+)]

HPV (-) C
[Kontrola HPV (-)]

C. AMPLICOR HPV Amplification Kit
Amplifikační souprava AMPLICOR HPV
(P/N: 03610799 190)

HPV AMP

HPV MMX
(Činidlo Master Mix na HPV)

HPV MgCl₂
(Chlorid hořečnatý pro HPV)

D. AMPLICOR HPV Detection Kit
Detekční souprava AMPLICOR HPV
(P/N: 03610721 190)

HPV MWP DK

HPV MWP
(Mikroplotna na HPV)

BG MWP
(Mikroplotna na β-globin)

[1] DN
(Denaturační roztok)

[2] HPV HYB
(Hybridizační pufr na HPV)

[3] AV-HRP
(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

[4A] SUB A
(Substrát A)

[4B] SUB B
(Substrát B)

[5] STOP
(Stop činidlo)

10X WB
(Promývací koncentrát 10X)

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Předamplifikace – pracoviště pro přípravu činidel

- Pro tepelný cyklovač GeneAmp® PCR System 9700 firmy Applied Biosystems použijte reakční trubičky MicroAmp® (AB# N801-0533), uzávěry (AB# N801-0535 nebo AB# N801-0534), košíky/retainery (AB# 403081) nebo soupravu Ready-Pak MicroAmp Assembly (AB# 403083) a bázi (AB# N801-0531)
- Těsně uzavíratelné plastové vaky
- Pipeta Eppendorf Multipette® s 1,25 ml špičkou Combipip® Zásobník (sterilní, balený po jednom)
- Pipetory (objem 50 µl a 100 µl)* s DNázy-prostými špičkami s aerosolovou bariérou nebo typu „positive displacement”
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Předamplifikace – prostor pro přípravu vzorku a kontroly

- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428)
- Zkumavky 2,0 ml se šroubovacím uzávěrem (např. Sarstedt 72.693.005)
- Serologické pipety polystyrenové (5 ml, 10 ml a 25 ml) na jedno použití
- Pipetory (objem 20 µl, 200 µl a 1000 µl)* s DNázy-prostými špičkami s aerosolovou bariérou nebo typu „positive displacement”
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16 000 x g, min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M, nebo její ekvivalent
- Vířivý mixer
- Suché vyhřívací bloky 56°C ± 2°C a 70°C ± 2°C
- Rukavice na jedno použití, bez pudru

- Vakuový rozvod (např. QIAvac 24, kat. č. 19403; QIAvac 24 Plus, kat. č. 19413, s propojovacím systémem QIAvac, kat. č. 19419, a vývěva, kat. č. 84020)
- Zdroj vakua (např. vývěva dosahující vakua -800 až -900 mbar nebo KMS Neuberger Laboport typ N840,3 FT18) s propojovacími hadičkami k rozvodnému systému
- Regulátor vakua (QIAGEN kat. č. 19530) volitelné příslušenství
- Odběrové trubičky (2 ml, QIAGEN kat. č. 19201) volitelné příslušenství
- Ethanol absolutní
- Příručka k vakuovému rozvodnému systému QIAGEN

Poamplifikace – prostor pro amplifikaci/detekci

- Pipetor multikanálový (objem 25 µl a 100 µl) nebo elektronický (Impact[®] nebo AMPLICOR[®])
- Špičky s aerosolovou bariérou k pipetám prosté DNázy (25 µl a 100 µl) a bezbariérové špičky (100 µl)*
- Tepelný cyklovač GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems
- Instalační nástroj na MicroAmp Base a čepičku pro použití ve spojení se zařízením GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems
- Omývač mikroploten**
- Čtecí zařízení na mikroplotny***
- Zásobníky na činidla na jedno použití
- Víčko k mikroplotnám
- 96-jamkový strip ejektor Costar[®] #2578
- Inkubátor pro teplotu 37°C ± 2°C
- Odměrné válce
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Rukavice na jedno použití, bez pudru

* Pipetory musejí být přesné na 3% jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky „positive displacement“ prosté DNázy, aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

** S kapacitou pro mytí mikroploten 12 x 8 mikrojamek v objemu 250-300 µl mycího roztoku na jednu jamku v intervalech 30 sekund.

*** Specifikace čtecího zařízení: Šířka pásma = 10 nm ± 3 nm, absorbanční rozsah = 0 až ≥ 3,00 A₄₅₀; opakovatelnost ≤ 1%; správnost ≤ 3% pro A₄₅₀ = 0 až 2,00, drift ≤ 0,01 A₄₅₀ za hodinu.

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

POZN.: *Se vzorky zacházejte jako s možnými nositeli infekce.*

A. Odběr vzorků

Pro použití při testu AMPLICOR HPV Test bylo validováno médium „Liquid Based Cytology“ (LBC) PreservCyt[®] (lékováka ThinPrep liquid PAP) od firmy Cytoc Corporation a SurePath[®] od firmy TriPath Imaging Inc. Při odběru cervikálních vzorků do médií PreservCyt a SurePath se řiďte pokyny příslušného výrobce.

B. Přeprava vzorků

Cervikální buněčné vzorky odebrané do média PreservCyt je možno přepravovat při teplotách 2-30°C. Vzorky odebrané do média SurePath je třeba uchovávat při teplotě 2-8°C, a to maximálně 8 hodin od odběru; při téže teplotě 2-8°C se vzorky přepravují. Vzorky je třeba zpracovat do doby, jež je níže u každého média uvedena. Při přepravě vzorků cervikálních buněk je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy pro přepravu etiologických látek¹¹.

C. Uchovávání vzorků

Vzorky cervikálních buněk v médiu PreservCyt je možno uchovávat při pokojové teplotě až 21 dnů nebo při teplotě 2-8°C až 8 týdnů. V médiu SurePath je možno vzorky cervikálních buněk uchovávat při teplotě 2-8°C po dobu 2 týdnů.

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: *Všechna činidla musejí být před použitím vytemperována na teplotu místnosti. Před započatím testu vizuálně zkontrolujte, zda, je objem činidel dostatečný.*

POZN.: *Kapalné cytologické vzorky musejí být před použitím vytemperovány na pokojovou teplotu.*

POZN.: *Kde je tak uvedeno, používají se pipetory se špičkami s aerosolovou bariérou nebo typu „positive displacement“. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.*

Velikost souprav:

Extrakční souprava AmpliLute Liquid Media Extraction Kit obsahuje činidla na 50 testů. Souprava pro amplifikaci, kontrolu a detekci obsahuje činidla na čtyři měření po 24 vzorcích, jež lze provést současně nebo zvlášť. Každé měření musí zahrnovat minimálně po jednom replikátu kontroly AMPLICOR HPV (-) a kontroly AMPLICOR HPV (+) (viz část *Kontrola jakosti*).

Pracovní tok:

Test AMPLICOR HPV se dá provést během jediného dne, nebo se může rozložit do dvou dnů. Má-li být test proveden během jednoho dne, postupujte podle návodu od bodu A do bodu D. V případě, že je test rozvržen 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 první den a amplifikaci a detekci provedete příští den, postupujte podle bodů B.1 až B.29 a přechovávejte rozpracované vzorky a kontroly podle návodu popsaného v části B, bod 29. Druhý den začněte částí A (Příprava činidel), potom rozmrazte 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 provést přípravu a amplifikaci vzorků a kontrol první den a detekci ponechat na druhý den, proveďte první den částí A (*Příprava činidel*), B (*Příprava vzorků a kontrol*) a C (*Amplifikace*) a denaturovaný amplikon uložte při teplotě 2-8°C podle kroku C.6. Druhý den pokračujte částí D (*Detekce*).

A. Příprava činidel

Provádějte v: Předamplifikace – prostor pro přípravu činidel

1. Zvolte odpovídající počet reakčních zkumavek, potřebných pro testování vzorků od pacientů a kontrol. Vložte zkumavky do stojánku MicroAmp a zajistěte záložkou.
2. Připravte si pracovní směs Master Mix, a to tak, že do jedné lékovky činidla **HPV MMX** odměříte 150 µl roztoku **HPV MgCl₂**. *Objem činidla Master Mix není třeba měřit. Objem 150 µl HPV MgCl₂ odměřte do celé lékovky HPV MMX.* Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15-krát obrátíte dnem vzhůru. **Víření k promísení pracovní směsi Master Mix nepoužívejte.** Růžové barvivo v roztoku **HPV MgCl₂** slouží k vizuálnímu ověření, že byl roztok **HPV MgCl₂** k činidlu **HPV MMX** přidán. Zbývající množství **HPV MgCl₂** zlikvidujte. Pracovní činidlo Master Mix se uchovává při teplotě 2-8°C a musí se spotřebovat do 4 hodin od přípravy.
3. Do každé A-zkumavky odměřte 50 µl pracovního roztoku Master Mix za použití opakovacího pipetoru nebo pipetoru s aerosolovou bariérou nebo se špičkou „positive displacement“. V této fázi zkumavky víčkem neuzavírejte.
4. Vložte stojan s pracovním roztokem Master Mix a přiměřeným počtem víček k uzavření zkumavek do uzavíratelného plastového sáčku a sáček důkladně uzavřete. Přejděte na pracoviště pro předamplifikační přípravu vzorků a kontrol. Stojan s pracovním roztokem Master Mix uchovávejte při teplotě 2-8°C v prostoru předamplifikační přípravy vzorků a kontrol, dokud není příprava vzorků a kontrol hotova. Pracovní roztok Master Mix je ve zkumavkách uzavřených v plastovém sáčku při teplotě 2-8°C stálý po dobu 4 hodin.

B. Příprava vzorků a kontrol

Prováděná v: Předamplifikace – prostor pro přípravu vzorku a kontroly

POZN.: Rukavice si často vyměňujte a v průběhu celého postupu dodržujte všechna bezpečnostní opatření k minimalizaci kontaminace.

1. Teplotu jednoho vyhřívacího bloku nastavte na 56°C.
2. Teplotu druhého vyhřívacího bloku nastavte na 70°C.
3. Činidla, vzorky a kontroly vytemperujte na teplotu okolí (minimálně 15 minut).

POZN.: Kroky B.4-B.7 je možno provést během inkubace vzorků/kontrol s PK a ATL (krok B.10).

4. Přídavkem 310 µl **AVE** rozpustíte lyofilizované činidlo **CAR**. Vířením po dobu 10 sekund promíchejte. Lékovku parafujte a vyznačte datum.

POZN.: Rozpuštěné činidlo CAR je při teplotě 2-8°C stále 24 hodiny; je také možno je rozdělit na podíly a zmrazit na -20°C.

5. K činidlu **AW2** přidejte 30 ml absolutního ethanolu. Na štítku zaškrtněte kontrolní okénko, abyste vyznačili, že byl přidán ethanol. Lahvičku parafujte a vyznačte datum.
6. Připravte pracovní pufr **AL**, a to tak, že k činidlu **AL** přidáte příslušný objem rekonstituovaného **CAR** podle tab. 1.

Tabulka 1
Příprava pracovního pufru AL

Činidla	Počet zpracovávaných vzorků /kontrol						
	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 pufir AL je třeba před zpracováním vzorků a kontrol připravit čerstvý. Nespotřebovaný podíl pracovního pufiru AL je nutno zlikvidovat.

7. Na 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 odměřte 80 µl ATL.

9. Každý vzorek a kontrol vířením po dobu for 10 sekund promíchejte a do příslušně označené zkumavky odměřte 250 µl.

10. Do každé zkumavky odměřte 20 µl PK. Zkumavky uzavřete a vířením po dobu 10 sekund promíchejte. Zkumavky po dobu 30 minut inkubujte v suchém vyhřívacím bloku při teplotě 56°C ± 2°C.

11. Během inkubace vzorků a kontrol sestavte podle příručky k výrobku firmy QIAGEN vakuový rozvodný systém QIAvac 24 (nebo QIAvac 24 Plus). Z blistrového balení vyjměte po jedné CLM na každý vzorek a kontrolu a označte je. Zkumavky na odpad uschovejte pro použití v kroku B23. Otevřete CLM a vložte do VC. Do CLM vložte EXT.

12. Po inkubaci při teplotě 56°C ± 2°C odměřte do všech zkumavek po 250 µl pracovního pufiru AL. Zkumavky uzavřete a vířením po dobu 10 sekund při maximální rychlosti promíchejte.

POZN.: Při přidání pracovního pufiru AL se může vytvořit bílá sraženina. Ta postup QIAamp nenarušuje a během následující inkubace se rozpustí.

13. Zkumavky inkubujte po dobu 15 minut v suchém vyhřívacím bloku při teplotě 70°C ± 2°C. Občas je během inkubace vířením promíchejte.

14. Po inkubaci při teplotě 70°C přidejte do všech zkumavek po 300 µl absolutního ethanolu. 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 odstředivce při maximálních otáčkách.

16. Lyzát z každé zkumavky převedte do příslušné CLM a nechte minimálně jednu minutu inkubovat.

17. Zapněte vývěvu. Vložte na rozvodný systém vakuum, aby se odstranil veškerý lyzát, a ponechte vakuum ještě minimálně jednu minutu v chodu. Vakuum z rozvodu uvolněte 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 odměrové zkumavky, uzavřete a odstřeďte plnou rychlostí po dobu 1 minuty nebo tak dlouho, dokud lyzát kompletně neprojde. Další 2 ml odběrové zkumavky je možno dokoupit (viz „Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky”).

18. Do každé CLM odměřte 750 µl AW2 a nechte minimálně 1 minutu inkubovat.

19. Zapněte vývěvu. Vložte na rozvodný systém vakuum tak, aby se odstranila veškerá kapalina, a ponechte vakuum ještě minimálně 1 minutu v chodu. Vakuum z rozvodu uvolněte postupem uvedeným v příručce k rozvodnému systému firmy QIAGEN.

20. Do každé CLM odměřte 750 µl absolutního ethanolu a nechte minimálně 1 minutu inkubovat.

21. Zapněte vývěvu. Vložte na rozvodný systém vakuum tak, aby se odstranila veškerá kapalina, a ponechte vakuum ještě minimálně 1 minutu v chodu. Vakuum z rozvodu uvolněte postupem uvedeným v příručce k rozvodnému systému firmy QIAGEN.

22. Z CLM opatrně vyjměte EXT a EXT zlikvidujte.

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

23. Vložte CLM do zkumavek pro sběr odpadu (z kroku B.11) a uzavřete víčka. Sestavy 3 minuty odstřeďuje při maximálních otáčkách.

24. Označte po jedné **ELT** pro každý vzorek a kontrolu.
25. Zkumavky na sběr odpadu zlikvidujte a **CLM** vložte do příslušně označených **ELT**.
26. Otevřete víčka **CLM** a po dobu 15 minut při teplotě okolí inkubujte.
27. Do každé **CLM** odměřte 120 µl **AVE**. Víčka uzavřete.

POZN.: Před odměřením do 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 odstředujte.
29. Ze sestav vyjměte **CLM** a zlikvidujte je; zkumavky uzavřete. Zpracované vzorky a kontroly buď ihned amplifikujte, nebo je uložte při teplotě 2-8°C nebo ve zmrazeném stavu při teplotě -20°C. (Viz krok B.31.)
30. Do příslušných amplifikačních zkumavek obsahujících pracovní Master Mix odměřte po 50 µl vzorku nebo kontroly. Na každý vzorek resp. kontrolu použijte novou špičku s aerosolovou bariérou nebo typu „positive displacement”. Amplifikační zkumavky uzavřete.
31. Připravené vzorky a kontroly v amplifikačním košíku přeneste do prostoru Amplifikace/detekce. Zbytek zpracovaných vzorků/kontrol je možno uchovávat za pokojové teploty 8 hodin, při teplotě 2-8°C jeden týden a při teplotě -20°C nebo nižší čtyři týdny, přičemž zmrazit a rozmrazit se smějí pouze jednou, jinak by mohlo dojít ke snížení signálu.

C. Amplifikace

Prováděna v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

1. Vložte soupravu stojánek se zarážkou do bloku zařízení pro tepelnou cyklizaci.
2. Naprogramujte zařízení GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems pro AMPLICOR HPV Test takto:

Program HOLD:	2 minuty při 50°C
Program HOLD:	9 minut při 95°C
Program CYCLE: (40 cyklů)	30 sekund při 95°C, 45 sekund při 54°C, 30 sekund při 72°C
Program HOLD :	72°C bez omezení

V programech CYCLE nastavte hodnotu ramp rate na 50% a jak je vyžadováno, přiřaďte název metody (Method Name) a jméno uživatele (User Name). Další informace k programování a obsluze zařízení GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems naleznete v příslušné uživatelské příručce.

3. Nastartujte program METHOD. Na obrazovce „Method Options” nastavte hodnotu „Ramp Speed” na „Max” a „Reaction Volume” na „100 µL”. Znovu stiskněte START. Program běží zhruba 2 hodiny a 45 minut. Vzorky a kontroly je třeba ze zařízení vyjmout a denaturovat do 1 hodiny od startu posledního programu HOLD.
4. Do 1 hodiny během posledního programu HOLD vyjměte ze zařízení stojánek, vložte do MicroAmp Base a ihned pokračujte krokem 5. Reakční zkumavky nesmějí v přístroji pro tepelnou cyklizaci zůstat déle než jednu hodinu. **AMPLIFIKOVANÉ VZORKY NEPŘENÁŠEJTE DO PŘEDAMPLIFIKAČNÍHO PROSTORU. NA AMPLIFIKOVANÉ KONTROLY A VZORKY JE TŘEBA POHLÍŽET JAKO NA HLAVNÍ MOŽNÝ ZDROJ KONTAMINACE.**
5. Sejměte ze zkumavek opatrně víčka tak, aby se nemohl vytvořit aerosol amplifikovaných produktů. Pomocí multikanálové pipety se špičkami s ochranou proti tvorbě aerosolů odpipetujte ihned do první zkumavky (nebo řady) 100 µl [1] DN a promíchejte pětinasobným nasátím do pipety a opětovným vypuštěním. U všech vzorků (řad) tento postup opakujte za použití vždy nové sady špiček. Pro dosažení úplné denaturace inkubujte vzorky 10 minut při pokojové teplotě.
6. Denaturovaný amplikon je možno nechat před detekcí (část D) stát při pokojové teplotě nejvýše 2 hodiny. Není-li možné zahájit detekční reakci dříve než po 2 hodinách, uzavřete zkumavky novými víčky a uložte denaturovaný amplikon při teplotě 2-8°C nejvýše na jeden týden.

D. Detekce

Provádění v: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci

POZN.: *Tímto postupem se řídíte pro detekci amplikonu HPV a β -globinu. K detekční reakci použijte HPV MWP resp. BG MWP. Pro obě MWP použijte [2] HPV HYB, [3] AV-HRP, [4A] SUB A, [4B] SUB B a [5] STOP dodané v rámci detekční soupravy AMPLICOR HPV Detection Kit.*

1. Všechna činidla zahřejte na pokojovou teplotu.
2. Následujícím postupem připravte pracovní promývací roztok. Prohlédněte si **10X WB** a zpozorujete-li sraženinu, ohřátím na teplotu 30-37°C ji rozpusťte. Přidejte jeden objem **10X WB** k 9 objemům destilované nebo deionizované vody. Dobře promíchejte. Pro ruční promývání připravte 40 ml pracovního promývacího roztoku na každý strip 8-jamkové mikroplotny (MWP). Pro automatické promývání připravte potřebné množství podle používané promývačky MWP. Pracovní promývací roztok uchovávejte při teplotách 2-25°C v čistých uzavřených plastových nádobách. Je stálý po dobu 2 týdnů od přípravy.
3. Před vyjmutím **HPV MWP** a **BG MWP** z plastového sáčku je nechte vytemperovat na pokojovou teplotu. Z plastového obalu vyjměte příslušný počet 8-jamkových MWP stripů a vložte do MWP rámečku. Nepoužité stripy vraťte do sáčku, přesvědčte se, že je v něm vysoušedlo, a sáček uzavřete.

POZN.: *S MWP stripy se musí zacházet opatrně, aby se nepolámaly. Při vyjímání z rámečku vystředěte MWP na 96-jamkovém strip ejektoru Costar® a rohy rámečku rovnoměrně zatlačte. K zajištění stripů na místě položte ejektor na ně a rovnoměrně na ně tiskněte.*

4. Do každé testovací jamky MWP odměřte 100 μ l [2] HPV HYB.
5. Pokud byl denaturovaný amplikon uchovávaný při teplotě 2-8°C, inkubujte jej po dobu 2-4 minut při 37°C, aby poklesla jeho viskozita.
6. Do jamky (jamek) MWP odměřte pomocí špiček s aerosolovou bariérou po 25 μ l denaturovaného amplikonu. Na plotnu zhruba 10-15 krát jemně poklepejte nebo pětinasobných nasátím do pipety a vypuštěním promíchejte, aby zbarvení přešlo z modrého ve světle žluté (tato barevná změna indikuje, že je směs dostatečně promísena).
7. Zakryjte MWP víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C \pm 2°C.
8. Promyjte MWP pracovním promývacím roztokem 5 krát ručně nebo za použití automatické myčky MWP.

Ruční promývání:

- a. Plotny vyprázdněte destičky a vysušte na papírové osušky.
- b. Do každé jamky odpipetujte tolik promývacího roztoku, aby se jamka zcela zaplnila (250-300 μ l). Ponechte 30 sekund působit. Vyprázdněte a osušte.
- c. Opakujte krok (b) 4 krát.

Při automatickém promývání nastavte promývačku takto:

- a. Obsah jamek vysajte.
- b. Naplňte každou jamku až po okraj pracovním promývacím roztokem (přibližně 250-300 μ l podle typu promývačky), nechte působit 30 sekund a všechnu tekutinu dosucha odsajte.
- c. Opakujte krok (b) 4 krát.
- d. Po automatickém promytí plotnu na čisté rovné ploše osušte

9. Do každé jamky odměřte 100 μ l [3] AV-HRP. MWP zakryjte a inkubujte 15 minut při teplotě 37°C \pm 2°C.
10. Připravte si pracovní substrát smísením 2,0 ml [4A] SUB A a 0,5 ml [4B] SUB B na každou dvojici 8-jamkových stripů mikroplotny (16 testů). Připravený pracovní substrát je třeba do 3 hodin spotřebovat. Uchovávejte při pokojové teplotě a chraňte před přímým světlem.
11. MWP promyjte, jak je popsáno v bodě 8.
12. Do každé jamky, ve které bude probíhat stanovení, odměřte 100 μ l pracovního substrátu (AMPLICOR Electronic Pipettor, Program 2).
13. Během 10 minut při pokojové teplotě (20-25°C) v temnu se objeví zbarvení.
14. Do každé jamky přidejte 100 μ l činidla [5] STOP (AMPLICOR Electronic Pipettor, Program 2).
15. Do 10 minut od přidání činidla [5] STOP změřte absorbanci při 450 nm. Hodnotu absorbance pro každý vzorek a kontrolu zaznamenejte.

VÝSLEDKY

Interpretace výsledků:

1. Ujistěte se, že jsou hodnoty absorbancí kontrol pro dané měření platné. Pokud měření platné není, celý postup (přípravu vzorku, amplifikaci a detekci) zopakujte.
2. Jestliže je měření platné, lze výsledky vzorků interpretovat takto:

Výsledek HPV A_{450}	β -globin A_{450}	Interpretace
< 0,20	$\geq 0,20$	DNA vysoce rizik. HPV nedetekována. Negativní výsledek infekci virem HPV nevylučuje, protože správný výsledek je podmíněn vhodným odběrem vzorku, nepřítomností inhibitorů a dostatečným množstvím DNA pro detekci.
< 0,20	< 0,20	Neplatný výsledek. Pokud je DNA HPV přítomna, nedala se detekovat. Zpracujte další alikvotní část původního vzorku a test opakujte. Pokud již není původní vzorek k dispozici, je třeba odebrat nový.
$\geq 0,20$	JAKÉKOLIV	Detekována DNA vysoce rizik. HPV. Vzorek je na vysoce rizikový HPV pozitivní.

KONTROLA KVALITY

S každou šarží až 24 vzorků je třeba zpracovat minimálně jeden replikát kontroly AMPLICOR HPV (–) a jeden replikát kontroly AMPLICOR HPV (+). Jako je tomu vždy při zavádění nového laboratorního postupu, musí obsluha zvážít, zda by neměla při každém testování použít další negativní i pozitivní kontroly, a to až do doby, než si bude dostatečně jista, že provádí testování správně. Není rozhodující, na které pozici ve stojánku MicroAmp jsou kontroly zařazeny.

Vzorky a kontroly z různých šarží mohou být amplifikovány a detekovány společně. Ovšem správnost výsledků měření v každé šarži je ověřována vlastní sadou kontrol, které se měří a zpracovávají společně se vzorky. Proto je možné ze společné amplifikace resp. detekce jednu šarži vzorků vyřadit a stejně tak jinou šarži na základě její kontroly zařadit.

Vzorky a kontroly připravené v jedné sadě by měly být v tepelném cyklizátoru a na detekční desce amplifikovány a detekovány ve vzájemném sousedství. Přesné pořadí vzorků a kontrol v tepelném cyklizátoru a na detekční desce ovšem není rozhodující.

Negativní kontrola

U kontroly AMPLICOR HPV (–) musejí být hodnoty A_{450} pro HPV i β -globin nižší než 0,20. Pokud se kterákoliv z těchto hodnot A_{450} rovná nebo je vyšší než 0,20, je měření neplatné a celý zkušební postup (přípravu vzorků, amplifikaci a detekci) je třeba zopakovat. Jestliže je takto absorbance A_{450} kontroly AMPLICOR HPV (–) vyšší než 0,20 soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Pozitivní kontrola

Hodnota A_{450} kontroly AMPLICOR HPV (+) musí činit u HPV i u β -globinu minimálně 1,0. Pokud je hodnota A_{450} nižší než 1,0, je měření neplatné a celý zkušební postup (přípravu vzorků, amplifikaci a detekci) je třeba zopakovat. Jestliže je takto absorbance A_{450} kontroly AMPLICOR HPV (+) nižší než 1,0 soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

1. Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním 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 terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
2. Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu věcí zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické citlivosti 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 na kontaminaci podezření, je třeba činidlo zlikvidovat.

OMEZENÍ ANALÝZY

1. Test je validován pouze pro cervikální buňky v kapalném médiu (např. PreservCyt nebo SurePath). Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky falešně negativní nebo falešně pozitivní.
2. Pro pelety cervikálních buněk zbývající po zpracování v systému PrepStain™ (dříve AutoCyte PREP®) test validován není.
3. Test je validován výhradně pro použití s extrakční soupravou AmpliLute Liquid Media Extraction Kit. Pokud by se použily jiné postupy extrakce vzorků, mohly by být výsledky chybné.
4. Vzorky obsahující bioadhezivní kontracepční gel Advantage-S® mohou AMPLICOR HPV Test narušovat.
5. Spolehlivé výsledky jsou odvislé od adekvátního odběru vzorku, přepravy, uchovávání a postupů zpracování.
6. Detekce HPV závisí na tom, kolik virových genomů je ve vzorku přítomno, a vliv mohou mít i metody odběru vzorku, status pacienta (např. věk, symptomy) a popřípadě stadium infekce.
7. Inhibice polymerázy nebo neadekvátnost buněk může vést k falešně negativním výsledkům. Do testu AMPLICOR HPV Test byla zařazena amplifikace β -globinu, což umožňuje zjistit zpracované vzorky, které obsahují látky, jež by mohly PCR amplifikaci rušit, nebo odběr neadekvátních buněk (či nesprávný odběr buněk).
8. Riziko kontaminace amplikonu se snižuje díky tomu, že směs Master Mix pro HPV obsahuje enzym AmpErase. Kontaminaci od HPV-pozitivních kontrol a HPV-pozitivních klinických vzorků lze ovšem zabránit pouze důsledným uplatňováním zásad správné klinické praxe a pečlivým dodržováním postupů zde uvedených.
9. S produktem by měli pracovat pouze pracovníci znalí technik PCR.
10. Pro použití s produktem byl validován pouze přístroj GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems. Žádný jiný tepelný cyklizátor (a to ani GeneAmp PCR System 2400 nebo 9600) se s tímto produktem použít nesmí.

RUŠIVÉ LÁTKY

Bylo zjištěno, že na AMPLICOR HPV Test nepůsobí rušivě tyto běžné výrobky ženské osobní hygieny, lubrikant, protiplísňový krém a kontracepční žele.

Tabulka 2

Název produktu	
Ortho Options™ Delfen® vaginální kontracepční pěna	Mycelex® 3 krém proti plísním
Clotrimazole 3 vaginální krém	Vagi-Gard® léčivý krém
Gyne-Lotrimin® 3 vaginální krém	Vagisil® krém proti svědění
Gynecort® 1% hydrokortizonový krém proti svědění	Yeast Gard™ homeopatické vaginální čípky
Vaginex® hydrokortizonový přípravek	Norforms® deodorantní čípky
Betadine® léčebný koncentrát pro výplachy	K-Y Brand® Jelly tělesný lubrikant
Miconazole vnější vulvální krém	Vagisil® intimní lubrikant
Monistat® 3 kombinované balení	

Na AMPLICOR HPV Test nemá rušivý vliv krev ani cervikální hlen ve vzorcích.

Rušivý vliv na AMPLICOR HPV Test mohou mít vzorky obsahující bioadhezivní kontracepční gel Advantage-S.

MIMOKLINICKÉ HODNOCENÍ

A. Mez detekce a genotypová inkluzivita

Mez detekce a inkluzivita AMPLICOR HPV testu byla stanovena analýzou zředění plazmidů 13 vysoce rizikových genotypů HPV v konzervačním roztoku PreservCyt. Inventář plazmidů k přípravě ředících panelů zahrnoval vysoce rizikové HPV genotypy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68. Koncentrace každého inventáře plazmidové DNA byla stanovena Poissonovou analýzou. Ředící panel zaujímal koncentrační rozsah 10 kopií/ml - 1920 kopií/ml. U každého genotypu bylo nezávisle připraveno minimálně 6 panelů. U každého vysoce rizikového genotypu byly pro každou koncentraci HPV plazmidu generovány minimálně 24 platné (validní) výsledky. Studie prokázala, že AMPLICOR HPV test dokáže s četností pozitivita vyšší než 95% detekovat HPV genotypy 31, 52, 58 a 59 na úrovni 240 kopií/ml a HPV genotypy 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 56 a 68 na úrovni 100 kopií/ml.

Se 100% četností pozitivita jsou všechny genotypy detekovány na úrovni 480 kopií/ml.

Tabulka 3
Mez detekce pro AMPLICOR HPV Test

Genotyp HPV	Mez detekce* (kopií/ml)
16	100
18	100
31	240
33	100
35	100
39	100
45	100
51	100
52	240
56	100
58	240
59	240
68	100

*Mez detekce představuje > 95% pozitivita při koncentracích uvedených níže.

B. Reprodukovatelnost

K vyhodnocení reprodukovatelnosti testu AMPLICOR HPV Test byla provedena studie. Reprodukovatelnost byla hodnocena po dobu 15 dnů při zapojení dvou laboratorních pracovníků a při použití tří šarží činidel. Každý pracovník prováděl po dobu 5 dnů jedno měření denně za použití každé ze 3 šarží činidel. Byl připraven tříčlenný panel sestávající z DNA plazmidu HPV genotypu 16 v konzervačním roztoku PreservCyt. Koncentrace plazmidu genotypu 16 činily 480, 960 a 1440 kopií/ml. Každý člen panelu byl při každém měření testován triplicitně. Všechny replikáty při všech testovaných koncentracích byly pozitivní. Údaje z této studie jsou shrnuty v tab. 4.

Tabulka 4
Reprodukovatelnost testu AMPLICOR HPV Test

DNA HPV 16 kopií/ml	Testovaný počet	Výsledky testu AMPLICOR HPV Test HPV-pozitivní ($A_{450} \geq 0,20$)		
		Počet	%	i.s.*
1440	90	90	100	96-100%
960	90	90	100	96-100%
480	90	90	100	96-100%
HPV-negativní ($A_{450} < 0,20$)				
0	90	90	100	96-100%

*95% interval spolehlivosti

C. Analytická specifčnost:

Specifčnost testu AMPLICOR HPV Test byla hodnocena tak, že byly do konzervačního roztoku PreservCyt přidány plazmidy vypěstovaných bakterií, virů, prvoků, kvasinek a „nízkorizikového“ viru HPV uvedených v tab. 5. Všechny vzorky byly analyzovány testem AMPLICOR HPV Test. Výsledky ukazují, že AMPLICOR HPV Test nevykazuje křížovou reaktivitu s celou řadou virů, bakterií, prvoků, kvasinek ani s „nízkorizikovými“ viry HPV, které mohou být v cervikálních vzorcích přítomny.

Tabulka 5
Testované non-HPV mikroorganismy a „nízkorizikové“ genotypy HPV

<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Derxia gummosa</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Acinetobacter sp. genospecies 3</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pasteurella maltocida</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Pediococcus acidilactica</i>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Ewingella americana</i>	<i>Prevotella corporis</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Propionibacterium acnes</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>Staphylococcus aureus</i>
<i>Chlamydia trachomatis ser E</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ss ozaenae</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Chlamydia trachomatis ser A</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>
<i>Chromobacter violaceum</i>	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Treponema phagedenis</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	
<i>Deinococcus radiopugnans</i>	<i>Morganella morganii</i>	
Lidský papilloma virus 6	Lidský papilloma virus 43S	Lidský papilloma virus 57
Lidský papilloma virus 11	Lidský papilloma virus 44	Lidský papilloma virus 64
Lidský papilloma virus 26	Lidský papilloma virus 53	Lidský papilloma virus 66
Lidský papilloma virus 40	Lidský papilloma virus 54	Lidský papilloma virus 67
Lidský papilloma virus 42	Lidský papilloma virus 55B	Lidský papilloma virus 70

D. Klinická citlivost a specifčnost

Analýzou klinických cervikálních vzorků byla ve dvou samostatných studiích hodnocena funkčnost testů AMPLICOR HPV Test a Hybrid Capture® 2 High Risk HPV DNA Test™ (HC2 od firmy Digene Corp., Gaithersburg, MD, USA).

V rámci první studie bylo pomocí testů AMPLICOR HPV a HC2 HPV DNA proměřeno 478 cervikálních vzorků odebraných do konzervačního roztoku PreservCyt a 284 cervikálních vzorků odebraných do konzervační tekutiny SurePath. Přítomnost nebo nepřítomnost DNA vysoce rizikového HPV ve vzorcích byla stanovena souhlasem obou testů a další analýzou vzorků, jež poskytly nesouhlasné výsledky, za použití kombinace modifikovaných PCR specifických pro typ E7³ a testu LINEAR ARRAY HPV Assay⁵. Citlivost a specifčnost na DNA vysoce rizikového HPV v cervikálních vzorcích v konzervačním roztoku PreservCyt a v konzervační tekutině SurePath byla stanovena jak pro AMPLICOR HPV test, tak pro HC2 HPV DNA test (Tab. 6 a 7).

Tabulka 6

Citlivost a specifčnost testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV DNA Test na přítomnost DNA vysoce rizikového HPV v cervikálních vzorcích uložených v konzervačním roztoku PreservCyt

Test	Parametr	Odhad	95% i.s.*
AMPLICOR HPV	Citlivost	96,3%	92-99%
AMPLICOR HPV	Specifčnost	95,6%	94-98%
HC2 HPV DNA	Citlivost	88,9%	83-93%
HC2 HPV DNA	Specifčnost	92,7%	89-95%

* 95% Waldův interval spolehlivosti

Tabulka 7

Citlivost a specifčnost testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV DNA Test na přítomnost DNA vysoce rizikového HPV v cervikálních vzorcích uložených v konzervační tekutině SurePath

Test	Parametr	Odhad	95% i.s.*
AMPLICOR HPV	Citlivost	95,8%	90-99%
AMPLICOR HPV	Specifčnost	95,8%	92-98%
HC2 HPV DNA	Citlivost	82,2%	74-87%
HC2 HPV DNA	Specifčnost	94,6%	90-97%

* 95% Waldův interval spolehlivosti

Tab. 8 shrnuje funkční parametry testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV DNA Test (citlivost a specifičnost pro DNA vysoce rizikového HPV) při sloučení výsledků získaných u vzorků uložených v kapalných cytologických médiích jak PreservCyt, tak SurePath.

Tabulka 8

Citlivost a specifičnost testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV DNA Test na přítomnost DNA vysoce rizikového HPV v cervikálních vzorcích uložených v kapalných cytologických médiích (PreservCyt a SurePath)

Test	Parametr	Odhad	95% i.s.*
AMPLICOR HPV	Citlivost	96,1%	93-99%
AMPLICOR HPV	Specifičnost	95,6%	93-97%
HC2 HPV DNA	Citlivost	86,1%	81-90%
HC2 HPV DNA	Specifičnost	93,4%	91-95%

* 95% Waldův interval spolehlivosti

Ve druhé studii byl testem AMPLICOR HPV Test analyzován 201 vzorek od 201 osoby sekvenčně vybrané z patientských vzorků uložených v konzervačním roztoku PreservCyt. U všech vzorků bylo původně požadováno cytologické testování a na studijní pracoviště k testování na HPV byly vzorky poukázány na žádost lékaře; při použití testu Hybrid Capture 2 (HC2) High Risk HPV DNA Test firmy Digene byl 101 vzorek na DNA vysoce rizikového HPV negativní a 100 vzorků bylo na DNA vysoce rizikového HPV pozitivních.

Vzorek od jedné pacientky byl testem AMPLICOR HPV Test analyzován dvakrát, ale ani jednou nebyl výsledek platný. Pro nedostatek dalšího materiálu nemohl být vzorek již dále testován a byl z analýzy vyloučen.

Diskrepantní vzorky byly testovány modifikací PCR specifických pro typ E7³. Dále bylo pro testování pomocí PCR specifických pro typ E7 aplikováno na 10% náhodně vybraných vzorků se souhlasně pozitivním výsledkem a 10% vzorků se souhlasně negativním výsledkem.

Citlivost a specifičnost testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV Test byla posouzena pomocí Bayesova teorému¹². Standardní chyby odhadů parametrů byly vypočteny metodou delta. Pro citlivost a specifičnost jednotlivých testů byl vypočítán 95% Waldův normální aproximovaný interval spolehlivosti.

Odhad citlivosti a specifičnosti testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV Test shrnuje tab. 9.

Tabulka 9

Citlivost a specifičnost testů AMPLICOR HPV Test a HC2 HPV DNA na přítomnost DNA vysoce rizikového HPV DNA v cervikálních vzorcích

Test	Parametr	Odhad	95% i.s.*
AMPLICOR	Citlivost	93,1%	88-98%
AMPLICOR	Specifičnost	94,9%	90-99%
HC2	Citlivost	90,2%	84-96%
HC2	Specifičnost	92,9%	88-98%

* 95% Waldův interval spolehlivosti

E. Selhání celého systému

Robustnost testu AMPLICOR HPV Test byla hodnocena testováním 110 identických zkušebních roztoků (replikátů) obsahujících DNA HPV v koncentraci představující přibližně trojnásobek meze detekce testu. Tyto roztoky byly připraveny v konzervační tekutině SurePath a v konzervačním roztoku PreservCyt. Obsahovaly také 20 000 kopií/ml plazmidu se sekvencí β -globinu. Nedošlo k žádnému případu selhání systému (hodnoty OD pro HPV a β -globin pod cut-off limitem zkoušky) při četnosti selhání celého systému 0% s 95% intervalem spolehlivosti 0-3,3%.

LITERATURA

1. Burd, Eileen M. 2003. Lidsk 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., Jacobs, Marcel V., Manos, M.M., et al. 1999. Lidsk Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *Journal of Pathology*. **189**:12-19.
4. Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., et al. 1995. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of Lidsk Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 87, No. **11**:796-802.
5. Davies, P., Kornegay, J., Iftner, T. 2001. Current methods of testing for lidsk papillomavirus. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 15, No. **5**:677-700.
6. Koutsky, L. 1997. Epidemiology of genital lidsk papillomavirus infekc. *American Journal of Medicine*. **102(5A)**:3-8.
7. Myers, T.W. and Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplifikac by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. **30**:7661-7666.
8. 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.
9. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
10. NCCLS. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. NCCLS Document M29-A Villanova, PA:NCCLS, 1997.
11. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
12. Hawkins, D.M. and et al. 2001. Some issues in resolution of diagnostic tests using an imperfect gold standard. *Statistics in Medicine*. **20**:1987-2001.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ USA
Člen Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics Corporation
Indianapolis, IN 46256 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800 526 1247)

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

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics SpA
Piazza Durante 11
I-20131 Milano

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

Distribuidor em Portugal:
Roche Farmacêutica Química, Lda
P-2700 Amadora

Roche, AMPLICOR, AmpErase enzyme, AmpliTaq GOLD, AmpliLute a GeneAmp jsou obchodní známky člena Roche Group.

Roche Response Center je známkou služeb člena Roche Group.

Technika prevence přenosu v enzymu AmpErase je kryta patentem USA č. 5 035 996 a jeho zahraničními protějšky, jež jsou vlastnictvím společnosti Invitrogen Corporation, a je licencována společností Roche Molecular Systems, Inc.

Advantage-S[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Columbia Laboratories, Inc.

AutoCyte PREP[®] a Surepath[®] jsou registrované obchodní známky a PrepStain[™] je obchodní známka společnosti TriPath Imaging, Inc.

Betadine[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Purdue Pharma L.P.

Costar[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Corning Costar Corporation.

Delfen[®], K-Y[®] a Monistat[®] jsou registrované obchodní známky a Ortho Options[™] je obchodní známka společnosti Johnson and Johnson.

Eppendorf Multipette[®] a Eppendorf Combitip[®] jsou registrované obchodní známky společnosti Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburk, Německo.

Gynecort[®] a Vagisil[®] jsou registrované obchodní známky Combe Incorporated.

Gyne-Lotrimin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Schering-Plough Healthcare Products.

Hybrid Capture[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Digene Corporation.

Impact[®] je registrovaná obchodní známka společnosti MATRIX Technologies Inc.

MicroAmp[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Applied Biosystems Corporation nebo jejích dceřiných společností v USA a některých dalších zemích.

Mycellex[®] 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.

PreservCyt[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Cytoc Corp.

ProClin[®] je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

QIAamp[®] a Qiagen[®] jsou registrované obchodní známky a MinElute[™] je obchodní známka společnosti QIAGEN Inc.

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 2004, Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

1/2004



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim



(03585611001-01ENGL)
04519256001-01