

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

cobas [®] 4800 System Sample Preparation Kit	c4800 SMPL PREP	960 Tests	P/N: 05235804190
		240 Tests	P/N: 05235782190
cobas [®] 4800 HPV Amplification/Detection Kit	c4800 HPV AMP/DET	960 Tests	P/N: 05235910190
		240 Tests	P/N: 05235901190
cobas [®] 4800 HPV Controls Kit	c4800 HPV CTLS	10 Sets	P/N: 05235855190
cobas [®] 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit	c4800 LIQ CYT	960 Tests	P/N: 05235839190
		240 Tests	P/N: 05235812190
cobas [®] 4800 System Wash Buffer Kit	c4800 WB	960 Tests	P/N: 05235871190
		240 Tests	P/N: 05235863190

POZNÁMKA: Díky koupi tohoto produktu může zákazník provádět amplifikaci a detekci sekvencí nukleové kyseliny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a souvisejících procesů s využitím diagnostiky *in vitro*. Tímto se neudílí žádný obecný patent ani jiná licence jakéhokoliv typu mimo toto konkrétní právo použití.

ÚČEL POUŽITÍ

Test cobas[®] 4800 pro detekci lidského papilloma viru (HPV) je kvalitativní test *in vitro* pro detekci lidského papilloma viru v patientských vzorcích. Test využívá amplifikace cílové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a hybridizace nukleové kyseliny pro detekci 14 vysoce rizikových (HR) HPV typů v jedné analýze. Test specificky detekuje (typy) HPV16 a HPV18 a současně detekuje i ostatní vysoce rizikové typy (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) v klinicky relevantních infekčních hladinách. Vzorky jsou omezeny na cervikální buňky odebrané do PCR buněčného odběrového média cobas[®] (Roche Molecular Systems, Inc.), roztoku PreservCyt[®] Solution (Cytoc Corp.) a konzervačního roztoku SurePath[®] (BD Diagnostics-TriPath).

Indikace použití testu cobas[®] 4800 HPV jsou:

- Test cobas[®] 4800 HPV je určen pro screening pacientek s výsledky testu Pap ASC-US (atypické šupinové buňky neurčitěho významu) pro stanovení nutnosti provedení kolposkopie. Účelem tohoto testu není zabránit ženám v provedení kolposkopie.
- U žen ve věku 30 let a starších lze test cobas[®] 4800 HPV využít spolu s Pap k dodatečnému screeningu přítomnosti nebo nepřítomnosti vysoce rizikových typů HPV. Tyto informace společně s lékařským vyhodnocením anamnézy cytologie, dalších rizikových faktorů a odborných zásad lze použít jako vodítko při léčbě pacientek.
- U žen ve věku 30 let a starších lze test cobas[®] 4800 HPV využít ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti genotypů HPV 16 a 18. Tyto informace společně s lékařským vyhodnocením anamnézy cytologie, dalších rizikových faktorů a odborných zásad lze použít jako vodítko při léčbě pacientek.
- Test cobas[®] 4800 HPV je určen pro použití u pacientek s cytologickými výsledky ASC-US pro vyhodnocení přítomnosti nebo absence vysoce rizikového HPV typu 16 a 18. Tyto informace společně s lékařským vyhodnocením anamnézy cytologie, dalších rizikových faktorů a odborných zásad lze použít jako vodítko při léčbě pacientek. Účelem tohoto testu není zabránit ženám v provedení kolposkopie.

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 118 různých typů HPV viru^{4,5} a přibližně 40 různých HPV typů, které mohou infikovat sliznici lidského genitálu^{6,7}. Ale pouze podskupina 13 až 18 těchto typů je považována za vysoce rizikovou pro vznik karcinomu čípku a jemu předcházejících lézí^{3,8-13}. Podle analýzy údajů z multicentrické studie případů a kontrol Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC), smíšený OR (poměr šancí – Odds Ratio) pro šupinové buňky karcinomu děložního čípku s infekcí HPV byl 158,2, když byla analýza omezena na studie provedené pomocí dobře validovaných HPV detekčních technik¹². V této studii se poměr šancí u karcinomu děložního čípku pohyboval mezi 109 až 276 ve studiích z různých částí světa¹².

Přestože je perzistující infekce vysoce rizikovým (HR) virem HPV nutnou příčinou karcinomu čípku a jemu předcházejících lézí, velmi malé procento infekcí postoupí do tohoto stavu onemocnění. Sexuálně přenášovaná infekce HPV je velmi častá. Odhaduje se, že až 75 % všech žen je někdy exponováno infekcí HPV¹⁴. Ale více než 90 % infikovaných žen vytvoří účinnou imunní odpověď a po 6 až 24 měsících infekce odezní bez jakýchkoli dlouhodobých zdravotních následků¹⁵⁻²⁰. Infekce jakýmkoli typem HPV může mít za následek cervikální intraepiteliální neoplázii (CIN), i když i ta zpravidla ustoupí, jakmile odezní infekce HPV²¹.

V rozvinutých zemích se screeningovými programy karcinomu čípku je od poloviny 50. let používán Pap stěr 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. Implementace testování nukleové kyseliny na přítomnost viru HPV slibuje zvýšení senzitivity a zlevnění screeningových programů na karcinom děložního čípku díky dřívější detekci vysoce rizikových lézí a snížení nutnosti nepotřebné kolposkopie a léčby.

PRINCIPY POSTUPU

Test **cobas**[®] 4800 HPV je založen na dvou základních postupech: (1) automatizovaná příprava vzorků pro simultánní extrakci HPV a buněčné DNA; (2) PCR amplifikace²² cílových sekvencí DNA pomocí HPV a párů komplementárních primerů specifických pro β-globin a detekce rozštěpených fluorescenčních HPV a β-globin specifických oligonukleotidových detekčních sond v reálném čase. Souběžná extrakce, amplifikace a detekce β-globinu v testu **cobas**[®] 4800 HPV monitoruje celý postup testu.

Činidlo Master Mix pro test **cobas**[®] 4800 HPV obsahuje páry primerů a sondy specifické na 14 vysoce rizikových typů HPV a β-globin DNA. Detekce amplifikované DNA (amplikon) probíhá během tepelného cyklu pomocí oligonukleotidových sond značených čtyřmi různými fluorescenčními barvivy. Amplifikovaný signál dvanácti vysoce rizikových typů HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) je detekován pomocí stejného fluorescenčního barviva, zatímco signály HPV16, HPV18 a β-globinu se detekují pomocí svých vlastních dedikovaných barviv.

Příprava vzorku

Příprava vzorku testu **cobas**[®] 4800 HPV je automatizována díky použití zařízení **cobas x 480**. Cervikální vzorky odebrané do PCR buněčného odběrového média **cobas**[®], roztoku PreservCyt nebo konzervačního roztoku SurePath se rozpouštějí za denaturačních podmínek při zvýšených teplotách a poté jsou rozštěpeny za přítomnosti chaotropického činidla. Uvolněné nukleové kyseliny HPV spolu s přidanou kontrolou DNA β-globinu jsou purifikovány pomocí absorpce na magnetické skleněné částice, promyty a nakonec separovány z těchto částic, čímž jsou připraveny k PCR amplifikaci a detekci.

PCR amplifikace

Volba cílové sekvence

Test **cobas**[®] 4800 HPV využívá primery pro definování sekvence asi 200 nukleotidů v rámci polymorfního regionu L1 v genomu HPV. Směs HPV primerů přítomná ve směsi Master Mix je navržena pro amplifikaci HPV DNA z 14 vysoce rizikových typů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68)^{3,8-13,23}. Fluorescenční oligonukleotidové sondy se vážou na polymorfní regiony v sekvenci definované těmito primery.

Další pár primerů a sonda je namířeny na gen lidského β-globinu (amplikon 330 bp), aby umožnily kontrolu procesu.

Amplifikace cíle

EagleZ05[®] DNA polymeráza²⁴, chemicky modifikovaná verze *Thermus species* Z05 DNA polymerázy²⁵, se využívá k „horkému startu“ amplifikace cílové HPV a β-globinové kontroly. Nejprve se reakční směs pro PCR zahřívá, aby se aktivovala EagleZ05[®] DNA polymeráza k denaturaci virové DNA a genomické DNA a expozici primerových cílových sekvencí. Během ochlazení směsi dochází k anelaci upstream a downstream primerů k sekvencím cílové DNA. EagleZ05[®] DNA polymeráza za přítomnosti dvojmocných kovových iontů a nadbytku dNTP primer(y) prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se uzavírá první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou DNA kopii cílového regionu genomu HPV a genu β-globinu. DNA polymeráza prodlužuje primery po anelaci podél cílových vzorů a poskytuje molekulu dvouřetězcové DNA cílového HPV se zhruba 200 páry bází nebo molekulu DNA β-globinu se 330 páry bází, které se říká amplikon. Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se efektivně zdvojnásobuje množství amplikonové DNA. Amplifikace probíhá pouze v oblasti genomu HPV a/nebo genu β-globinu mezi příslušným primerovým párem. Celý genom amplifikován není.

Automatická detekce v reálném čase

Test **cobas**[®] 4800 HPV využívá v reálném čase běžící^{27,28} PCR technologii. Každá oligonukleotidová sonda v reakci je označena fluorescenčním barvivem, které slouží jako oznamovací, a dalším barvivem, které je tlumicí a tlumí fluorescenční emise z barviva v intaktní sondě. Jak amplifikace pokračuje, sondy komplementární k amplikonu se vážou na specifické jednovláknové DNA sekvence a jsou rozštěpeny 5' až 3' nukleázovou aktivitou EagleZ05[®] DNA polymerázy. Jakmile je pomocí této nukleázové aktivity separováno oznamovací barvivo od tlumicího barviva, po excitaci příslušným světelným spektrem se emituje fluorescenční signál o specifické vlnové délce. Tato specifická vlnová délka pro každé barvivo umožňuje nezávisle změřit HPV16 amplikon, HPV18 amplikon, jiné vysoce rizikové amplikony (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68) a β-globinovou kontrolu, protože sondy specifické pro tyto sekvence jsou označeny různými barvivy.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu **cobas**[®] 4800 HPV použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin²⁶, ale nikoli DNA obsahující deoxytimidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu díky tomu, že se jako jeden z dNTP v činidle Master Mix místo thymidintrifosfátu používá deoxyuridintrifosfát; proto je deoxyuridin 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 tepelném cyklickém kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Při teplotách nad 55 °C, tedy během tepelného cyklování, je enzym AmpErase inaktivní, a proto cílový amplikon nerozkládá. Je prokázáno, že enzym AmpErase v testu **cobas**[®] 4800 HPV inaktivuje minimálně 10³ kopií deoxyuridin-obsahujícího HPV amplikonu na jednu PCR.

ČINIDLA

cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit

Souprava pro přípravu vzorků pro systém cobas[®] 4800
(P/N: 05235782190)

c4800 SMPL PREP


240 testů

MGP


(Magnetické skleněné částice pro systém cobas[®] 4800)

10 x 4,5 ml

Magnetické skleněné částice
93 % Isopropanol

Xi  93 % (hm.) Isopropanol

Dráždivý

F  93 % (hm.) Isopropanol

Vysoce hořlavý

R: 11-36-67, S: 7-16-24/25-26

EB

(Eluční pufr pro systém cobas[®] 4800)

10 x 18 ml

Pufr Tris-HCl
0,09 % azid sodný

cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit

Souprava pro přípravu vzorků pro systém cobas[®] 4800
(P/N: 05235804190)

c4800 SMPL PREP


960 testů

MGP


(Magnetické skleněné částice pro systém cobas[®] 4800)

10 x 13,5 ml

Magnetické skleněné částice
93 % Isopropanol

Xi  93 % (hm.) Isopropanol

Dráždivý

F  93 % (hm.) Isopropanol

Vysoce hořlavý

R: 11-36-67, S: 7-16-24/25-26

EB

(Eluční pufr pro systém cobas[®] 4800)

10 x 18 ml

Pufr Tris-HCl
0,09 % azid sodný

cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit

Souprava promývacího pufru pro systém cobas[®] 4800
(P/N: 05235863190)

c4800 WB

240 testů

WB

(Promývací pufr pro systém cobas[®] 4800)

10 x 55 ml

Dihydrát citrátu sodného
0,05 % N-metylizotiazolon HCl

cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit

Souprava promývacího pufru pro systém cobas[®] 4800
(P/N: 05235871190)

c4800 WB

960 testů

WB

(Promývací pufr pro systém cobas[®] 4800)

10 x 200 ml

Dihydrát citrátu sodného
0,05 % N-metylizotiazolon HCl

cobas® 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit

Souprava pro přípravu kapalných cytologických vzorků
pro systém **cobas® 4800**

(P/N: 05235812190)


c4800 LIQ CYT

240 testů

PK

(Proteináza K **cobas® 4800**)

Pufr Tris-HCl
< 0,05 % EDTA
Glycerol
Chlorid vápenatý
Octan vápenatý
< 2 % proteináza K

Xn  < 2 % (hm.) proteináza K

Zdraví škodlivý

10 x 0,9 ml

SDS

(SDS činidlo pro systém **cobas® 4800**)


Pufr Tris-HCl
0,2 % SDS
0,09 % azid sodný

10 x 3 ml

LYS


(Lytický pufr pro systém **cobas® 4800**)

Pufr Tris-HCl
37 % guanidin HCl
< 5 % polydokanol

Xn  37 % (hm) guanidin HCl

Zdraví škodlivý

R: 22-36/38, S: 13-26-36-46

N  < 5 % (hm.) polydokanol

Nebezpečný pro životní prostředí

R: 22-41-50, S: 26-39-61

10 x 10 ml

cobas® 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit

Souprava pro přípravu kapalných cytologických vzorků
pro systém **cobas® 4800**

(P/N: 05235839190)


c4800 LIQ CYT

960 testů

PK

(Proteináza K **cobas® 4800**)

Pufr Tris-HCl
< 0,05 % EDTA
Glycerol
Chlorid vápenatý
Octan vápenatý
< 2 % proteináza K

Xn  < 2 % (hm.) proteináza K

Zdraví škodlivý

20 x 1,2 ml

SDS

(SDS činidlo pro systém **cobas® 4800**)

Pufr Tris-HCl
0,2 % SDS
0,09 % azid sodný


10 x 9 ml

LYS(Lytický pufr pro systém **cobas**[®] 4800)

Pufr Tris-HCl


37 % guanidin HCl

< 5 % polydokanol

Xn  37 % (hm) guanidin HCl

Zdraví škodlivý

R: 22-36/38, S: 13-26-36-46

N  < 5 % (hm.) polydokanol

Nebezpečný pro životní prostředí

R: 22-41-50, S: 26-39-61

10 x 36 ml

cobas[®] 4800 HPV Amplification/Detection KitSouprava pro amplifikaci/detekci HPV pro systém **cobas**[®] 4800

(P/N: 05235901190)

c4800 HPV AMP/DET**240 testů****HPV MMX**(Master Mix HPV pro **cobas**[®] 4800)

Tricinový pufr

Octan draselný

Hydroxid draselný

Glycerol

< 0,13 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP

< 0,01 % Upstream a downstream HPV primery

< 0,01 % Upstream a downstream β-globin primery

< 0,01 % fluorescenční HPV sondy

< 0,01 % fluorescenční β-globin sondy

< 0,10 % EagleZ05[®] DNA polymeráza (mikrobiální)

< 0,10 % AmpErase (uracil-N-glykozyláza) enzym (mikrobiální)

0,09 % azid sodný

10 x 0,5 ml

HPV Mg/Mn(Roztok HPV Mg/Mn pro **cobas**[®] 4800)

Octan hořečnatý

Octan manganatý

< 0,02 % ledová kyselina octová

0,09 % azid sodný

10 x 1,0 ml

cobas[®] 4800 HPV Amplification/Detection KitSouprava pro amplifikaci/detekci HPV pro systém **cobas**[®] 4800

(P/N: 05235910190)

c4800 HPV AMP/DET**960 testů****HPV MMX**(Master Mix HPV pro **cobas**[®] 4800)

Tricinový pufr

Octan draselný

Hydroxid draselný

Glycerol

< 0,13 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP

< 0,01 % Upstream a downstream HPV primery

< 0,01 % Upstream a downstream β-globin primery

< 0,01 % fluorescenční HPV sondy

< 0,01 % fluorescenční β-globin sondy

< 0,10 % EagleZ05[®] DNA polymeráza (mikrobiální)

< 0,10 % AmpErase (uracil-N-glykozyláza) enzym (mikrobiální)

0,09 % azid sodný

20 x 1,0 ml

HPV Mg/Mn(Roztok HPV Mg/Mn pro **cobas**[®] 4800)

Octan hořečnatý

Octan manganatý

< 0,02 % ledová kyselina octová

0,09 % azid sodný

10 x 1,0 ml

cobas® 4800 HPV Controls Kit

Kontrolní souprava HPV pro systém **cobas® 4800**
(P/N: 05235855190)

c4800 HPV CTL5

10 sad**HPV (+) C**(Pozitivní kontrola HPV **cobas® 4800**)

10 x 0,5 ml

Pufr Tris-HCl

EDTA

0,05 % azid sodný

< 0,002 % poly rA RNA (syntetická)

< 0,001 % neinfekční plasmid DNA (mikrobiální) obsahující HPV sekvence 16, 18, 39

< 0,001 % neinfekční plasmid DNA (mikrobiální) obsahující sekvence lidského β-globinu

(-) C(Negativní kontrola pro systém **cobas® 4800**)

10 x 0,5 ml

Pufr Tris-HCl

EDTA

0,05 % azid sodný

< 0,002 % poly rA RNA (syntetická)

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ**A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY IN VITRO.**

- B. Tento test je určen pro cervikální vzorky odebrané pomocí PCR buněčného odběrového média **cobas®**, roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a prostředek pro ochranu očí. Po práci se vzorky a zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Zamezte mikrobiální a DNA kontaminaci činidel.
- F. Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- G. Nepoužívejte po uplynutí data expirace.
- H. Činidla nemíchejte.
- I. Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- J. Je nutné nosit rukavice. Aby nedošlo ke kontaminaci, musí se rukavice vyměnit mezi manipulací se vzorky a manipulací s činidly pro **cobas® 4800**.
- K. Manipulace se vzorky se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*²⁹ a v dokumentu CLSI č. M29-A3³⁰.
- L. **LYS** obsahuje guanidin-hydrochlorid. **Nesmí dojít k přímému kontaktu guanidin-hydrochloridu a chlornanu sodného (bělicí prostředek) nebo jiných vysoce reaktivních činidel jako jsou kyseliny nebo zásady. Z těchto směsí by se mohl uvolňovat škodlivý plyn.** Pokud se kapalina obsahující guanidin-hydrochlorid rozlije, postižené místo vyčistěte vodou s vhodným laboratorním detergentem. Jestliže dojde k rozliti potenciálně infekčních látek, vyčistěte místo **NEJPRVE** vodou s vhodným laboratorním detergentem a potom 0,5% chlornanem sodným.
- M. **MGP** obsahuje isopropanol a je vysoce hořlavý. Uchovávejte mimo otevřený oheň a prostředí, ve kterém se mohou vytvářet jiskry.
- N. **EB, SDS, HPV MMX, HPV Mg/Mn, (-) C a HPV (+) C** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím studené vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- O. Při práci s jakýmkoliv činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. 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 by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Pokud dojde k rozliti, zředte je před vytřením dosucha vodou.
- P. Všechny položky k jednorázovému použití použijte jen jednou. Pufr znovu nepoužívejte.
- Q. K čištění zařízení **cobas x 480** nebo analyzátoru **cobas z 480** nepoužívejte roztok chlornanu sodného (bělidlo). Dojde-li k rozliti na zařízení **cobas x 480** nebo na analyzátor **cobas z 480**, postupujte podle pokynů v příručce obsluhy pro systém **cobas® 4800**.
- R. Další varování, upozornění a postupy pro snížení nebezpečí kontaminace zařízení **cobas x 480** nebo analyzátoru **cobas z 480** najdete v příručce obsluhy pro systém **cobas® 4800**.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

A. **Činidla nezmrazujte.**

B. **MGP, EB, PK, SDS, LYS, HPV MMX, HPV Mg/Mn, HPV (+) C a (-) C** uchovávejte při 2–8 °C. Tato činidla jsou stabilní do vyznačeného data expirace.

C. **WB** uchovávejte při 15–25 °C. Činidlo je stálé do vyznačeného data expirace.

DODÁVANÝ MATERIÁL

A. cobas® 4800 System Sample Preparation Kit Souprava pro přípravu vzorků pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235782190) MGP (Magnetické skleněné částice pro systém cobas® 4800) EB (Eluční pufr pro systém cobas® 4800)	c4800 SMPL PREP	240 testů
B. cobas® 4800 System Sample Preparation Kit Souprava pro přípravu vzorků pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235804190) MGP (Magnetické skleněné částice pro systém cobas® 4800) EB (Eluční pufr pro systém cobas® 4800)	c4800 SMPL PREP	960 testů
C. cobas® 4800 System Wash Buffer Kit Souprava promývacího pufru pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235863190) WB (Promývací pufr pro systém cobas® 4800)	c4800 WB	240 testů
D. cobas® 4800 System Wash Buffer Kit Souprava promývacího pufru pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235871190) WB (Promývací pufr pro systém cobas® 4800)	c4800 WB	960 testů
E. cobas® 4800 HPV Amplification/Detection Kit Souprava pro amplifikaci/detekci HPV pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235901190) HPV MMX (Master Mix HPV pro cobas® 4800) HPV Mg/Mn (Roztok HPV Mg/Mn pro cobas® 4800)	c4800 HPV AMP/DET	240 testů
F. cobas® 4800 HPV Amplification/Detection Kit Souprava pro amplifikaci/detekci HPV pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235910190) HPV MMX (Master Mix HPV pro cobas® 4800) HPV Mg/Mn (Roztok HPV Mg/Mn pro cobas® 4800)	c4800 HPV AMP/DET	960 testů
G. cobas® 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit Souprava pro přípravu kapalných cytologických vzorků pro systém cobas® 4800 (P/N: 05235812190) PK (Proteináza K cobas® 4800) SDS (SDS činidlo pro systém cobas® 4800) LYS (Lytický pufr pro systém cobas® 4800)	c4800 LIQ CYT	240 testů

H. cobas® 4800 System Liquid Cytology Preparation Kit

Souprava pro přípravu kapalných cytologických vzorků pro systém cobas® 4800
(P/N: 05235839190)

c4800 LIQ CYT

960 testů

PK

(Proteináza K cobas® 4800)

SDS

(SDS činidlo pro systém cobas® 4800)

LYS

(Lytický pufr pro systém cobas® 4800)

I. cobas® 4800 HPV Controls Kit

Kontrolní souprava HPV pro systém cobas® 4800

(P/N: 05235855190)

c4800 HPV CTLS

10 sad

HPV (+) C

(Pozitivní kontrola HPV cobas® 4800)

(-) C

(Negativní kontrola pro systém cobas® 4800)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Manipulace se vzorky a činidly

- PCR buněčné odběrové médium cobas® (Roche P/N 5619637190, nepovinné)
- Špičky CO-RE, 1000 µl, stojan na 96 (Roche P/N 04639642001 nebo Hamilton P/N 235905)
- Zásobník na činidla 50 ml (Roche P/N 05232732001)
- Zásobník na činidla 200 ml (Roche P/N 05232759001)
- Extrakční destička pro systém cobas® 4800 (s hlubokými jamkami) (Roche P/N 05232716001)
- Mikrotitrační destička a zalepovací fólie pro systém cobas® 4800 0,3 ml (Roche P/N 05232724001)
- Pevný odpadový pytel [Roche P/N 05530873001 (malý) nebo 04691989001 (velký)]
- Plastová skluzavka na odpad Hamilton STAR (Roche P/N 04639669001)
- Zkumavky 13 ml s kulatým dnem, (Sarstedt P/N 60.541.122) pro použití jako sekundární zkumavky na vzorky
- Víčka neutrální barvy (Sarstedt P/N 65.176.026) pro uzavření 13 ml zkumavek Sarstedt s kulatým dnem po cyklu
- Rukavice na jedno použití bez pudru

Vybavení a software

- Zařízení cobas x 480
- Analyzátor cobas z 480
- Kontrolní jednotka systému cobas® 4800 se softwarem systému verze 1.0 nebo vyšší
- cobas® 4800 Work Order Editor verze 0.2.9.0912 nebo vyšší

Volitelné vybavení a materiály

- Pipety: možný objem pipetování 1000 µl
- Špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky bez DNázy: možný objem 1000 µl
- Centrifuga s kyvnou nádobou rotoru s min. otáčkami 1500
- Samostatná magnetická destička (Roche P/N 05440777001)
- Vortex mixer (pro jednu zkumavku)
- Vortex mixer pro více zkumavek [např. VWR P/N 58816-116]

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

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

A. Odběr vzorků

Cervikální vzorky odebrané pomocí PCR buněčného odběrového média cobas®, roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath byly validovány pro použití s testem HPV cobas® 4800. Při odběru cervikálních vzorků postupujte podle pokynů výrobce.

B. Přeprava vzorků

Cervikální vzorky odebrané pomocí PCR buněčného odběrového média cobas®, roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath lze přepravovat při teplotách 2–30 °C. Cervikální vzorky odebrané do konzervačního roztoku SurePath je nutné zmrazit do 24 hodin od odebrání. Při přepravě vzorků HPV je třeba dodržovat celostátní resp. místní předpisy o přepravě etiologických agens³¹.

C. Uchovávání vzorků

Cervikální vzorky odebrané do PCR buněčného odběrového média cobas® a roztoku PreservCyt je možné uchovávat při teplotě 2–30 °C až 6 měsíců od data odebrání. V konzervačním roztoku SurePath je možno vzorky cervikálních buněk uchovávat při teplotě 2–8 °C po dobu až 4 týdnů od data odebrání.

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: Všechna činidla kromě HPV MMX a HPV Mg/Mn musí mít před vložením do zařízení cobas x 480 okolní teplotu laboratoře. HPV MMX a HPV Mg/Mn je možné vzít přímo z místa skladování o teplotě 2–8 °C, protože se budou vyrovnávat na teplotu v zařízení cobas x 480 do doby, než se použijí v procesu.

POZN.: Vzorky v PCR buněčném odběrovém médiu cobas[®], roztoku PreservCyt a konzervačním roztoku SurePath musí mít před vložením do přístroje cobas x 480 okolní teplotu laboratoře.

POZN.: Viz provozní příručka pro systém cobas[®] 4800, kde najdete podrobné postupy.

Množství pro jeden cyklus:

Systém cobas[®] 4800 je navržen tak, aby dokázal pracovat s testy HPV cobas[®] 4800, s množstvím 1 až 22 vzorky plus kontroly (až 24 testů/cyklus) a 1 až 94 vzorky plus kontroly (až 96 testů/cyklus). Každá souprava pro přípravu vzorků pro systém cobas[®] 4800, souprava pro přípravu kapalných cytologických vzorků pro systém cobas[®] 4800, souprava promývacího pufu pro systém cobas[®] 4800 a souprava pro amplifikaci a detekci HPV pro systém cobas[®] 4800 obsahuje množství činidel dostatečné pro 10 cyklů po 24 testech (240 testů v sadě) nebo 96 testů (960 testů v sadě). Souprava kontrol HPV pro systém cobas[®] 4800 obsahuje dostatečné množství činidel pro celkem 10 cyklů, buď s 24 testy nebo 96 testy (10 sad na soupravu). Minimální množství pro jedno měření (cyklus) v systému cobas[®] 4800 je 1 vzorek plus kontroly. Jeden replikát systému cobas[®] 4800 negativní kontroly [(-) C] a jeden replikát cobas[®] 4800 HPV pozitivní kontroly [HPV (+) C] jsou nutné k provedení každého cyklu (viz oddíl „Kontrola kvality“).

Pracovní postup:

POZN.: Pro cyklus s 24 vzorky lze použít i soupravu s 960 testy, i když činidla nebudou v takovém případě optimálně využita.

POZN.: Pro maximální výkon systému by měl být celkový počet vzorků pacientů včetně kontrol dělitelný osmi.

Při spuštění testu HPV cobas[®] 4800 si lze v softwaru cobas[®] 4800 vybrat jeden ze dvou pracovních postupů: „Full workflow“ (Úplný pracovní postup) a „PCR only workflow“ (Pouze PCR).

Úplný pracovní postup HPV:

„Úplný pracovní postup HPV“ se skládá z přípravy vzorku na zařízení cobas x 480 a poté následuje amplifikace a detekce na analyzátoru cobas z 480. Velikost cyklu může být ve formátu s 24 testy (1 až 22 vzorků plus 2 kontroly) nebo ve formátu s 96 testy (1 až 94 vzorků plus 2 kontroly). Viz oddíl „Provedení úplného pracovního postupu“ níže a příručka obsluhy k systému cobas[®] 4800, kde najdete podrobnosti.

Pracovní postup HPV pouze PCR:

„Pracovní postup HPV pouze PCR“ se skládá z amplifikace a detekce na analyzátoru cobas z 480. Množství vzorků pro jeden cyklus může být 1 až 94 plus 2 kontroly. Viz oddíl „Provedení pracovního postupu Pouze PCR“ níže a příručka obsluhy k systému cobas[®] 4800, kde najdete podrobnosti.

Vzorky:

Testem HPV cobas[®] 4800 je možné vyhodnotit tři typy cervikálních vzorků: a) cervikální vzorky v roztoku PreservCyt, b) cervikální vzorky v PCR buněčném odběrovém médiu cobas[®] a c) cervikální vzorky v konzervačním roztoku SurePath. Vzorky v roztoku PreservCyt a PCR buněčném odběrovém médiu cobas[®] je možné zpracovat přímo z jejich 20 ml primární nádoby s příslušným čárovým kódem nebo z řádně čárovým kódem označené 13 ml kulaté zkumavky Sarstedt v zařízení cobas x 480. Vzorky v konzervačním roztoku SurePath je nutno přenést do řádně čárovým kódem označené 13 ml kulaté zkumavky Sarstedt a poté zpracovat v zařízení cobas x 480. Prostudujte si příručku obsluhy pro systém cobas[®] 4800, kde najdete příslušné postupy správného označování pomocí čárového kódu a seznam přípustných čárových kódů pro systém cobas[®] 4800.

POZN.: Minimální požadovaný objem v PCR buněčném odběrovém médiu cobas[®] PCR a v primárních nádobách s roztokem PreservCyt 3,0 ml. Při použití 13 ml kulatých sekundárních zkumavek je minimální požadovaný objem 1,0 ml a maximální objem 10 ml.

POZN.: Používejte pouze PCR buněčné odběrové médium cobas[®], roztok PreservCyt a konzervační roztok SurePath k odběru cervikální vzorků pro test cobas[®] 4800 HPV. Test HPV cobas[®] 4800 nebyl validován s jinými zařízeními pro odběr výtěrů nebo jinými typy médií. Užívání testu HPV cobas[®] 4800 s jinými odběrovými zařízeními nebo typy médií by mohlo vést k falešně negativním, falešně pozitivním nebo neplatným výsledkům.

POZN.: Před zpracováním vzorků v zařízení cobas x 480 může být nutné vzorky rozdělit na alikvotní podíly do čárovým kódem označených 13 ml kulatých zkumavek Sarstedt. K manipulaci se vzorky používejte pipetory se špičkami s aerosolovou bariérou nebo s přímým vypuzováním. Aby nedošlo ke křížové kontaminaci zpracovaných vzorků, je nutné po zpracování vzorků použít pro uzavření těchto zkumavek další víčka jiné barvy (neutrální, viz oddíl POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY).

POZN.: Při přenosu vzorků z primárních nádob do 13 ml kulatých sekundárních zkumavek postupujte opatrně. Před přenosem zamíchejte primární vzorky na vortexu. Po každém vzorku vyměňte pipetovací špičky.

POZN.: Nepracovávají vzorky, které nesou známky krve nebo mají tmavě hnědou barvu.

V jednom cyklu může být jakákoli kombinace vzorků (PCR buněčné odběrové médium cobas[®], roztok PreservCyt nebo konzervační roztok SurePath) a každý vzorek lze testovat s genotypizací testem HPV High Risk, nebo HPV High Risk Plus.

Pracovní postupy

Provedení úplného pracovního postupu

- A. Test HPV **cobas**[®] 4800 je možné použít pro cykly s 1 až 22 vzorky a jednou negativní kontrolou systému **cobas**[®] 4800 a jednou HPV pozitivní kontrolou **cobas**[®] 4800 (ve formátu s 24 testy) a cykly s 1 až 94 vzorky a jednou negativní kontrolou systému **cobas**[®] 4800 a jednou HPV pozitivní kontrolou **cobas**[®] 4800 (ve formátu s 96 testy).
- B. Podle pokynů v příručce obsluhy pro systém **cobas**[®] 4800 v části „Provoz“ zapněte systém a proveďte údržbu.
- C. Podle pokynů v příručce obsluhy pro systém **cobas**[®] 4800 vytvořte soubor objednávek pro celý cyklus. Soubor objednávek není nutný, jestliže používáte LIS.
- D. Pro každý vzorek zvolte typ média.
- Pro roztok PreservCyt zvolte v souboru objednávek „PreservCyt“ nebo vzorky v PCR buněčném odběrovém médiu **cobas**[®].
 - Pro objednávku vzorků v konzervačním roztoku SurePath zvolte v souboru objednávek „SurePath“.
- E. Pro zprávu s výsledky testů zvolte podtyp testu „HPV High Risk Panel“ a kterýkoli vysoce rizikový typ HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 nebo jejich kombinaci.
- F. Pro zprávu s výsledky testů zvolte podtyp testu „HPV High Risk Panel Plus Genotyping“ a kterýkoli vysoce rizikový typ HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 nebo jejich kombinaci popř. pro oddělenou zprávu s typem HPV16 a vysoce rizikovým typem HPV18.
- G. Pomocí softwarového průvodce spusťte nový cyklus. Zvolte typ testu „HPV workflow“.
- H. Pomocí softwarového průvodce vložte vzorky a soubor objednávek.

POZN.: Vzorky lze vložit v primárních nebo sekundárních zkumavkách s čárovým kódem v jakémkoli pořadí, pokud jejich čárové kódy odpovídají čárovým kódům v objednávce.

POZN.: Jestliže se zpracovávají primární nádoby se vzorky v PCR buněčném odběrovém médiu cobas[®] nebo roztoku PreservCyt, před vložením je zamíchejte na vortexu.

I. Při vkládání spotřebního materiálu postupujte podle softwarového průvodce.

J. Při vkládání všech činidel postupujte podle softwarového průvodce.

POZN.: Kontroly [HPV (+) C a (-) C] se nevkládají spolu se vzorky. Vkládají se na nosič činidel v průběhu vkládání činidel. Dvě pozice (A1 a B1) na každé extrakční destičce a destičce Microwell jsou rezervovány pro kontroly HPV (+) a (-).

POZN.: Systém cobas[®] 4800 má vnitřní hodiny, které monitorují čas, po který jsou činidla umístěna v přístroji. Jakmile je WB naskenováno, je k dispozici 1 hodina na dokončení vkládání a kliknutí na tlačítko „Start“. Na záložce „Workplace“ se zobrazí ubíhající čas.

POZN.: Aby transfer MGP proběhl správně, před dávkováním do zásobníku na činidla lahvičku s MGP vortexujte nebo s ní silně zatřepejte.

K. Vložte činidla pro přípravu vzorků (WB, MGP, EB, SDS a LYS) do zásobníků na činidla označených čárovým kódem pomocí metody „sken-sken-nalít-umístit“:

- Naskenujte čárový kód lahvičky s činidlem.
- Naskenujte čárový kód zásobníku na činidla.
- Nalijte činidlo do zásobníku na činidla.
- Vložte naplněný zásobník na činidla na určenou pozici do nosiče činidel.

L. Zásobníky na činidla jsou k dispozici ve dvou velikostech: 200 ml a 50 ml. Při výběru příslušné velikosti zásobníku na činidla postupujte podle softwarového průvodce. Čárové kódy zásobníků na činidla musí směřovat na pravou stranu nosiče.

POZN.: Amplifikační/detekční činidla (HPV MMX a HPV Mg/Mn), kontroly [HPV (+) C a (-) C] a PK se vkládají přímo na nosič činidel a zařízení cobas x 480 je automaticky skenuje.

POZN.: Veškerá činidla a zásobníky na činidla jsou označena čárovým kódem a jsou určena pro jedno použití. Software zařízení cobas[®] 4800 sleduje použití činidel a zásobníků na činidla a vyřazuje již dříve použitá činidla nebo zásobníky na činidla. Software rovněž kontroluje, aby byla do přístroje vložena činidla z příslušně velkých souprav, tj. zamezuje, aby souprava činidel pro 240 testů byla použita pro cyklus s více než 22 vzorky pacientů.

POZN.: Software cobas[®] 4800 sleduje data expirace všech činidel. Činidla, která překročí datum expirace, systém cobas[®] 4800 nepřijme.

M. Kliknutím na „Start Run“ spusťte přípravu vzorků.

N. Po úspěšném dokončení přípravy vzorku kliknutím na „*Unload“ uvolníte/vyjmete nosič destiček.

** V tomto bodě lze před kliknutím na „Unload“ zkontrolovat stav přípravy vzorku. Viz příručka obsluhy pro systém **cobas**[®] 4800.

O. Postupujte podle pokynů v příručce obsluhy pro systém **cobas**[®] 4800 a zalepte mikrotitrační destičku, přeneste destičku do analyzátoru **cobas z 480** a spusťte cyklus amplifikace a detekce.

POZN.: Systém cobas[®] 4800 má vnitřní hodiny, které monitorují čas po přidání připravených vzorků do pracovního Master mixu. Amplifikaci a detekci je nutné spustit co jak nejdříve, ale ne později než 90 minut po dokončení cyklu zařízení cobas x 480. Na záložce „Workplace“ se zobrazí ubíhající čas.

P. Po dokončení cyklu amplifikace a detekce vyjměte mikrotitrační destičku z analyzátoru **cobas z 480**.

Q. Postupujte podle pokynů v příručce obsluhy k systému **cobas**[®] 4800 a zkontrolujte a přijměte výsledky.

POZN.: Pracovní postup „Pouze PCR“ je k dispozici jako možnost obnovení v případě, že úplný pracovní postup nelze dokončit kvůli okolnostem mimo kontrolu uživatele (např. výpadek proudu během amplifikace/detekce).

POZN.: Pomocí cyklu Pouze PCR lze amplifikovat/detekovat pouze vzorky, které byly úspěšně zpracovány na zařízení cobas x 480. Kontrola činidel a spotřebního materiálu je během cyklu Pouze PCR omezená. Během pracovního postupu Pouze PCR není k dispozici sledování pozice vzorku – uživatel musí zajistit, aby skutečná pozice vzorku na mikrotitrační destičce odpovídala pozici určené v souboru objednávek. Při přípravě mikrotitračních destiček a nastavení PCR je nutné pracovat velice pečlivě, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci.

POZN.: Vzorky zpracované na zařízení cobas x 480 mají omezenou stabilitu. Amplifikaci/detekci pomocí pracovního postupu Pouze PCR je nutné provést do 24 h v případě skladování při teplotě od 15 °C do 30 °C a do 7 dní v případě skladování při teplotě 2 °C až 8 °C.

POZN.: Postupujte podle pokynů v příručce obsluhy pro systém cobas® 4800 v případě, že potřebujete přejmenovat čárové kódy pozitivních a negativních kontrol.

- A. Podle pokynů v příručce obsluhy pro systém cobas® 4800 vytvořte soubor objednávek pro pracovní cyklus Pouze PCR.
- Na výtisku s výsledky nebo v souboru s exportem výsledků naleznete čárové kódy vzorků, typy médií, typy podtestů a pozice na extrakční destičce cobas® 4800 pro cyklus, který vyžaduje opakovanou amplifikaci/detekci.
 - V případě pozitivní a negativní kontroly úpravou 4 posledních číslic můžete identifikovat pracovní postup opětného použití čárových kódů kontrol pro amplifikaci a detekci. Postupujte podle pokynů v příručce obsluhy k systému cobas® 4800.
- B. Připravte pracovní HPV Master mix pro cobas® 4800:
- Pro cyklus do 24 testů přidejte 240 µl HPV Mg/Mn do jedné lahvičky HPV MMX (0,5 ml lahvička ze soupravy pro 240 testů).
 - Pro cyklus do 96 testů přidejte 450 µl HPV Mg/Mn do každé ze dvou lahviček HPV MMX (1,0 ml lahvičky ze soupravy pro 960 testů).

POZN.: Cyklus Pouze PCR musí být spuštěn do 90 minut od přidání HPV Mg/Mn do HPV MMX. Systém nemonitoruje délku času po přidání připravených vzorků do pracovního Master Mixu v postupu Pouze PCR. Je na uživateli, aby zajistil, že amplifikace a detekce začne v určeném čase.

- C. Opatrným obrácením lahvičky (lahviček) dobře zamíchejte pracovní master mix. K promísení pracovního master mixu nepoužívejte víření.
- D. Přeneste 25 µl pracovního master mixu do příslušných jamek na mikrotitrační destičce.
- E. Položte extrakční destičku opakovaného cyklu na samostatnou magnetickou destičku.
- F. Manuálně přeneste 25 µl eluátu z jamek extrakční destičky do odpovídajících jamek na mikrotitrační destičce. Ujistěte se, že pozice jamek jsou vzájemně zachovány (např. eluát v jamce A1 na extrakční destičce je přenesen do jamky A1 na mikrotitrační destičce). Ujistěte se, že na mikrotitrační destičku nebyly přeneseny magnetické skleněné částice (MGP).
- G. Postupujte podle pokynů v příručce obsluhy k systému cobas® 4800 a zalepte mikrotitrační destičku.
- H. Centrifugujte mikrotitrační destičku pomocí rotoru s kyvnou nádobou alespoň 5 sekund při 1500 RCF.
- I. Přeneste destičku do analyzátoru cobas z 480 a spusťte cyklus amplifikace a detekce.
- J. Po dokončení cyklu amplifikace a detekce vyjměte mikrotitrační destičku z analyzátoru cobas z 480.
- K. Postupujte podle pokynů v příručce obsluhy k systému cobas® 4800 a zkontrolujte a přijměte výsledky.

Interpretace výsledků

POZN.: Veškerou validaci testů a cyklů provádí software cobas® 4800.

POZN.: Platný cyklus může zahrnovat jak platné tak i neplatné výsledky vzorků.

Jestliže je měření platné, lze výsledky vzorků interpretovat způsobem, který je uveden v tabulkách 1 a 2:

Tabulka 1
Interpretace výsledků testu HPV cobas® 4800 na přítomnost HPV DNA

Test HPV cobas® 4800	Výsledkový protokol a interpretace
Podtest „HPV High Risk Panel“:	
HR HPV POS	Vysoce rizikový HPV pozitivní Vzorek je pozitivní na DNA jednoho typu nebo kombinace následujících vysoce rizikových typů HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
HR HPV NEG	Vysoce rizikový HPV negativní* Typy HPV DNA 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 byly nedetekovatelné nebo pod nastavenou prahovou hodnotou.
Invalid	Vysoce rizikový HPV neplatný Výsledky jsou neplatné. Pro získání platného výsledku je nutné původní vzorek testovat znovu.
Failed	Pro tento vzorek nejsou žádné výsledky Přečtěte si pokyny v příručce obsluhy k systému cobas® 4800 a zkontrolujte příznaky cyklu a doporučené kroky. Pro získání platného výsledku je nutné původní vzorek testovat znovu.
Podtest „HPV High Risk Panel Plus Genotyping“:	
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 POS	Pozitivní na jiný vysoce rizikový HPV, pozitivní na HPV 16, pozitivní na HPV 18. Vzorek je pozitivní na DNA typu 16 a 18 a DNA jednoho následujícího typu nebo kombinace následujících vysoce rizikových typů HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
Other HR HPV POS, HPV16 POS, HPV18 NEG	Pozitivní na jiný vysoce rizikový HPV, pozitivní na HPV 16, negativní na HPV 18*. Vzorek je pozitivní na DNA typu 16 a DNA jednoho následujícího typu nebo kombinace následujících vysoce rizikových typů HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. HPV DNA typu 18 byla nedetekovatelná nebo pod nastavenou prahovou hodnotou.
Other HR HPV POS, HPV16 NEG, HPV18 POS	Pozitivní na jiný vysoce rizikový HPV, negativní na HPV 16*, pozitivní na HPV 18. Vzorek je pozitivní na DNA typu 18 a DNA jednoho následujícího typu nebo kombinace následujících vysoce rizikových typů HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. HPV DNA typu 16 byla nedetekovatelná nebo pod nastavenou prahovou hodnotou.
Other HR HPV POS, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Pozitivní na jiný vysoce rizikový HPV, negativní na HPV 16*, negativní na HPV 18*. Vzorek je pozitivní na DNA jednoho následujícího typu nebo kombinace následujících vysoce rizikových typů HPV: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. HPV DNA typu 16 a 18 byla nedetekovatelná nebo pod nastavenou prahovou hodnotou.
Other HR HPV NEG, HPV16 POS, HPV18 POS	Jiný vysoce rizikový HPV negativní*, pozitivní na HPV 16, pozitivní na HPV 18. Typy HPV DNA 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 byly nedetekovatelné nebo pod nastavenou prahovou hodnotou. Vzorek je pozitivní na HPV DNA typu 16 a 18.
Other HR HPV NEG, HPV16 NEG, HPV18 POS	Jiný vysoce rizikový HPV negativní*, negativní na HPV 16*, pozitivní na HPV 18. Typy HPV DNA 16, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 byly nedetekovatelné nebo pod nastavenou prahovou hodnotou. Vzorek je pozitivní na HPV DNA typu 18.
Other HR HPV NEG, HPV16 POS, HPV18 NEG	Jiný vysoce rizikový HPV negativní*, pozitivní na HPV 16, negativní na HPV 18*. Typy HPV DNA 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 byly nedetekovatelné nebo pod nastavenou prahovou hodnotou. Vzorek je pozitivní na HPV DNA typu 16.
Other HR HPV NEG, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Jiný vysoce rizikový HPV negativní*, negativní na HPV 16*, negativní na HPV 18*. Typy HPV DNA 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 byly nedetekovatelné nebo pod nastavenou prahovou hodnotou.
Invalid	Neplatný. Výsledky jsou neplatné. Pro získání platných výsledků je nutné původní vzorek testovat znovu.
Failed	Pro tento vzorek nejsou žádné výsledky Přečtěte si pokyny v příručce obsluhy k systému cobas® 4800 a zkontrolujte příznaky cyklu a doporučené kroky. Pro získání platných výsledků je nutné původní vzorek testovat znovu.

* Negativní výsledek nevylučuje přítomnost HPV infekce, protože výsledky závisí na adekvátním odběru vzorku, absenci inhibitorů a dostatečném množství DNA k detekci.

Tabulka 2
Interpretace výsledků testu HPV cobas® 4800 u pacientek s cytologickými abnormalitami

Výsledky	Interpretace
Other HR HPV* NEG, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Velmi nízká pravděpodobnost nálezu s gradingem \geq CIN2.
Other HR HPV* POS, HPV16 NEG, HPV18 NEG	Zvýšená pravděpodobnost, že nález s gradingem \geq CIN2 bude při kolposkopii detekován.
HPV16 POS a/nebo HPV18 POS	Nejvyšší pravděpodobnost, že nález s gradingem \geq CIN2 bude při kolposkopii detekován ^{32, 33} .

*Jiná HR HPV DNA zahrnuje následující typy: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

POZN.: *Negativní výsledky HPV nemají zabránit ženám v provedení kolposkopie.*

POZN.: *Kromě výsledků uvedených v tabulce výše jsou možné neplatné výsledky jedné nebo více kombinací. V případě takového výsledku, např.:*

Other HR HPV NEG, HPV16 POS, HPV18 Invalid

Pozitivní a negativní výsledky je nutné interpretovat podle tabulky 1. V tomto příkladu jsou výsledky HPV 18 neplatné. Pro získání platných výsledků je nutné původní vzorek testovat znovu.

POZN.: *Negativní výsledky znamenají, že koncentrace HPV DNA jsou nedetekovatelné nebo pod nastavenou prahovou hodnotou.*

POZN.: *Pozitivní výsledky testů znamenají přítomnost jednoho nebo více vysoce rizikových typů, ale protože pacientky jsou často koinfikovány nízkou rizikovými typy, nevylučuje to přítomnost nízkou rizikových typů u pacientek se smíšenými infekcemi.*

POZN.: *Výsledky tohoto testu je nutné interpretovat ve spojení s informacemi získanými na základě klinického hodnocení a anamnézy pacientky.*

KONTROLA KVALITY

Jedna sada pozitivních a negativních kontrol testu HPV **cobas® 4800** je zařazena do každého cyklu. U každého cyklu musí mít jak pozitivní, tak i negativní kontrola platný výsledek v softwaru **cobas® 4800**, aby bylo možné zobrazit výsledky testu HPV **cobas® 4800** z daného cyklu.

Pozitivní kontrola

Výsledek kontroly HPV (+) musí být „Valid“. Pokud jsou výsledky testu kontroly HPV (+) soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Negativní kontrola

Výsledek kontroly (-) musí být „Valid“. Pokud jsou výsledky testu kontroly (-) soustavně neplatné, 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 citlivosti testu je třeba dbát opatrnosti, aby mezi činidly a amplifikačními směsmi nedošlo ke kontaminaci.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Test **cobas® 4800** HPV detekuje DNA vysoce rizikových typů 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68. Tento test nedetekuje DNA nízkou rizikových typů HPV (tj. 6, 11, 42, 43, 44), protože neexistuje klinická použitelnost testování nízkou rizikových typů HPV³⁴.
2. Test **cobas® 4800** HPV pro detekci lidského papilloma viru typu 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 se nedoporučuje k hodnocení při podezření na sexuální zneužívání.
3. Výkonnost testu **cobas® 4800** HPV nebyla patřičně stanovena pro jedince očkované proti HPV³⁵.
4. Na test může mít vliv i prevalence infekce HPV v dané populaci. Při testování populace s nízkou prevalencí nebo osob bez rizika infekce pozitivní prediktivní hodnoty klesají.
5. Infekce HPV neindikuje cytologickou diagnózu HSIL nebo nález vysokého stupně cervikální dysplazie CIN, ani neimplikuje, že CIN2-3 nebo karcinom vznikne. U většiny žen infikovaných jedním nebo více vysoce rizikovými typy HPV nedojde ke vzniku CIN2-3 nebo karcinomu.
6. Negativní výsledek vysoce rizikového HPV nevylučuje možnost budoucí cytologické diagnózy HSIL nebo nálezu CIN2-3 nebo karcinomu.
7. Testujte pouze indikované typy vzorků. Tento test HPV **cobas® 4800** byl validován pouze pro cervikální vzorky odebrané pomocí PCR buněčného odběrového média **cobas®**, roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath.
8. Detekce vysoce rizikového HPV závisí na tom, kolik kopií je ve vzorku přítomno, a vliv mohou mít i metody odběru vzorku, faktory pacienta, stádium infekce a přítomnost interferenčních látek.
9. Amplifikace a detekce beta-globinu je součástí testu **cobas® 4800** HPV, aby bylo možné odlišit HPV negativní vzorky od těch, které nevykazují signál HPV kvůli nedostatečnému množství buněk ve vzorku. Všechny HPV negativní vzorky musí mít platný signál beta-globinu s předdefinovaným rozsahem, aby byly systémem **cobas® 4800** identifikovány jako platné negativní vzorky.
10. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy odběru, transportu, skladování a zpracování vzorků. Dodržujte postupy uvedené v tomto příbalovém letáku, příbalovém letáku pro PCR buněčné odběrové médium **cobas®** a v příručce obsluhy k systému **cobas® 4800**.

11. Přidání enzymu AmpErase k činidlu Master Mix HPV **cobas**[®] 4800 umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy, jenž jsou v tomto příbalovém letáku uvedeny.
12. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas**[®] 4800.
13. Pouze zařízení **cobas x 480** a analyzátor **cobas z 480** byly validovány pro použití s tímto produktem. S tímto produktem se nesmí používat žádné jiné zařízení na přípravu vzorků nebo jiný systém PCR.
14. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem od jedné technologie k druhé provedli v jejich laboratoři studie pro stanovení rozdílů mezi těmito technologiemi.
15. Rovněž nebyly hodnoceny vlivy dalších potenciálních proměnných, jako je vaginální výtok, používání tamponů, sprchování apod., a proměnných odběru vzorku.
16. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech genomické DNA lidského papilloma viru pokryté primery a/nebo sondami testu **cobas**[®] 4800 HPV mohou vést k selhání detekce DNA viru.
17. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
18. Cervikální vzorky často vykazují zřetelně detekovatelné hladiny plné krve ve formě růžového nebo slabě hnědého zbarvení. Takové vzorky se normálně zpracují v systému **cobas**[®] 4800. Jestliže koncentrace plné krve překročí 2 %, (tmavě červené nebo hnědé zbarvení) v buněčném odběrovém médiu **cobas**[®] PCR nebo roztoku PreservCyt solution, je zde pravděpodobnost získání falešně negativních výsledků.
19. Použití vaginálního zvlhčovače Replens[®] je spojeno s falešně negativními výsledky u vzorků v konzervačním roztoku SurePath.

VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

Srovnání účinnosti s komparačním testem HPV se značkou CE

Klinická senzitivita a specifita na stav onemocnění (\geq CIN2) byla stanovena pro test HPV **cobas**[®] 4800 a komparační HPV test se značkou CE v populaci žen ve věku minimálně 21 let s cytologickými výsledky ASC-US stanovenými na základě rutinního screeningu cervikálního karcinomu. Všechny testy byly provedeny na cervikálních vzorcích v roztoku PreservCyt. Kolposkopii podstoupilo celkem 855 pacientek s počátečními cytologickými výsledky ASC-US. Stav onemocnění pacientek zjistila Ústřední patologická znalecká komise na základě vzorků získaných pomocí biopsie během kolposkopie. Výsledky populace ASC-US shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3*

Odhad citlivosti a specifity testu HPV cobas[®] 4800 HPV a komparačního testu HPV se značkou CE na cervikální onemocnění (\geq CIN2 dle Ústřední patologické komise) v populaci s ASC-US

Parametr	Test HPV cobas [®] 4800		Komparační HPV test se značkou CE	
	Odhad (%)	95 % CI	Odhad (%)	95 % CI
Citlivost (N = 42)	92,9	(81,0; 97,5)	83,3	(69,4; 91,7)
Specifita (N = 813)	71,0	(67,8; 74,0)	72,0	(68,8; 74,9)

* Data pacientek v tabulce 3 jsou připravena na základě podskupiny populace pacientek z klinické zkoušky HPV v USA (Evaluation of the **cobas**[®] 4800 HPV Test for the Detection of High-Grade Cervical Disease in Women Undergoing Routine Cervical Cancer Screening).

U žen \geq 30 let s normální cytologií je riziko cervikálního onemocnění (\geq CIN2) 7,9krát vyšší s High Risk pozitivním výsledkem testu HPV **cobas**[®] 4800, než s negativním výsledkem testu HPV **cobas**[®] 4800. Odhady relativního rizika a jejich 95 % intervaly spolehlivosti jsou uvedeny v tabulce 4.

U žen ve věku 30 let a starších lze test **cobas**[®] 4800 HPV využít ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti genotypů HPV 16 a 18. Riziko cervikálního onemocnění (\geq CIN2) je 14,4krát vyšší s testem HPV **cobas**[®] 4800 pozitivním na HPV 16 nebo HPV 18 ve srovnání s negativním výsledkem a riziko je 2,4krát vyšší s testem HPV **cobas**[®] 4800 pozitivním na HPV 16 nebo HPV 18 ve srovnání s testem HPV **cobas**[®] 4800 pozitivním na 12 jiných vysoko rizikových typů. Ve všech případech dolní mez 95 % intervalu spolehlivosti překračuje 1, což označuje statisticky vyšší riziko cervikálního onemocnění v případě pozitivního výsledku testu HPV.

Tabulka 4

Relativní riziko cervikálního onemocnění (\geq CIN2 dle Ústřední patologické komise) u žen \geq 30 let s normální cytologií**

HPV výsledek	Bootstrap odhady		
	Odhad relativního rizika	95 % CI LL	95 % CI UL
Poz vs. neg	7,9	3,6	136,2
16+/18+ vs. neg	14,4	6,0	240,0
16+/18+ vs. 12 jiných HR+	2,4	1,4	3,8

** Data pacientek v tabulce 4 jsou připravena na základě podskupiny populace pacientek z klinické zkoušky HPV v USA (Evaluation of the **cobas**[®] 4800 HPV Test for the Detection of High-Grade Cervical Disease in Women Undergoing Routine Cervical Cancer Screening).

Mez detekce

Byla stanovena mez detekce (LOD) vysoce rizikových HPV genotypů HPV16, HPV18 a HPV31 pro test **cobas**[®] 4800 HPV. Meze detekce byly určeny pomocí 1) plazmidů HPV31, HPV16 a HPV18 na pozadí směsi HPV negativních vzorků pacientů odebraných do roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath a 2) HPV pozitivních buněčných řad SiHa (HPV16) HeLa (HPV18) v roztoku PreservCyt a konzervačním roztoku SurePath, které na pozadí obsahovaly HPV negativní buněčnou řadu (HTC-15). Plazmidy a buněčné řady byly rozředěny na níže uvedené koncentrace, nad a na očekávané hladiny LOD. Bylo testováno minimálně 60 replikátů každé hladiny plazmidů nebo buněčné řady jak v roztoku PreservCyt, tak v konzervačním roztoku SurePath s každou ze 3 šarží činidel. LOD je ta hladina HPV DNA ve vzorku, která vykazuje pozitivní výsledky testů alespoň v 95 %. Tabulky 5 a 6 obsahují výsledky šarže činidel, která dávala nejkonzervativnější (nejvyšší) LOD v analýze u roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath.

Tabulka 5
Hladiny meze detekce HPV typů 31, 16, 18 a buněčných řad SiHa (HPV16) a HeLa (HPV18) v roztoku PreservCyt

Typ HPV	Titr (kopií nebo buněk/ml)	Počet pozitivních/testovaných vzorků	% pozitivních	95 % interval spolehlivosti	
				Dolní	Horní
31	600	60/60	100 %	94 %	100 %
31	300	59/61	97 %	89 %	100 %
31	150	49/60	82 %	70 %	90 %
16	1500	60/60	100 %	94 %	100 %
16	600	60/60	100 %	94 %	100 %
16	300	55/61	90 %	80 %	96 %
18	1500	60/60	100 %	94 %	100 %
18	600	60/60	100 %	94 %	100 %
18	300	42/61	69 %	56 %	80 %
SiHa (HPV 16)	200	66/66	100 %	95 %	100 %
SiHa (HPV 16)	100	64/65	98 %	92 %	100 %
SiHa (HPV 16)	50	57/60	95 %	86 %	99 %
HeLa (HPV 18)	80	60/60	100 %	94 %	100 %
HeLa (HPV 18)	40	60/60	100 %	94 %	100 %
HeLa (HPV 18)	20	56/60	93 %	84 %	98 %

Tabulka 6
Hladiny meze detekce HPV typů 31, 16, 18 a buněčných řad SiHa (HPV16) a HeLa (HPV18)
v konzervačním roztoku SurePath

Typ HPV	Titr (kopíí nebo buněk/ml)	Počet pozitivních/ testovaných vzorků	% pozitivních	95 % interval spolehlivosti	
				Dolní	Horní
31	300	60/60	100 %	94 %	100 %
31	150	57/60	95 %	86 %	99 %
31	75	46/60	77 %	64 %	87 %
16	600	60/60	100 %	94 %	100 %
16	300	60/60	100 %	94 %	100 %
16	150	51/60	85 %	73 %	93 %
18	1,500	60/60	100 %	94 %	100 %
18	600	60/60	100 %	94 %	100 %
18	300	56/60	93 %	84 %	98 %
SiHa (HPV 16)	100	59/60	98 %	91 %	100 %
SiHa (HPV 16)	50	57/60	95 %	86 %	99 %
SiHa (HPV 16)	25	42/60	70 %	57 %	81 %
HeLa (HPV 18)	80	60/60	100 %	94 %	100 %
HeLa (HPV 18)	40	60/60	100 %	94 %	100 %
HeLa (HPV 18)	20	59/60	98 %	91 %	100 %

Ověření inkluзивity

Pro ověření, zda test HPV **cobas**[®] 4800 dokáže správně detekovat všechny HPV vysoce rizikové genotypy, byla stanovena mez detekce (LOD) (tabulky 7 a 8) pro genotypy 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68. Sensitivita testu HPV **cobas**[®] 4800 HPV na HPV genotypy 16, 18 a 31 byla stanovena ve studii meze detekce popsané výše v příbalovém letáku. Kvantifikovaný inventář plazmidů každého genotypu HPV byl rozředěn buď v roztoku PreservCyt, nebo konzervačním roztoku SurePath obsahující HPV negativní buňky HTC-15 na koncentraci pod, nad a na očekávanou LOD. Jedna šarže činidel byla použita pro vytvoření minimálně 48 replikátů pro každou pozitivní hladinu v každém médiu. Pro každý typ HPV uvedená LOD byla definována jako nejnižší testovací koncentrace s $\geq 95\%$ pozitivní mírou detekce a všemi vyššími koncentracemi, které měly alespoň 95% míru detekce.

Tabulka 7
Shrnutí míry detekce u genotypu s vysokým rizikem v testu HPV cobas[®] 4800
ve studii inkluзивity genotypu (roztok PreservCyt)

Typ HPV DNA	LOD (kopíí/ml)	Počet pozitivních/ testovaných vzorků	Míra detekce	95 % interval spolehlivosti	
				Dolní	Horní
33	190	46/48	96 %	86 %	99 %
35	480	48/48	100 %	93 %	100 %
39	80	48/48	100 %	93 %	100 %
45	190	46/48	96 %	86 %	99 %
51	100	46/48	96 %	86 %	99 %
52	2400	48/48	100 %	93 %	100 %
56	1400	48/48	100 %	93 %	100 %
58	480	47/48	98 %	89 %	100 %
59	190	46/48	96 %	86 %	99 %
66	640	48/48	100 %	93 %	100 %
68	450	48/48	100 %	93 %	100 %

Tabulka 8
Shrnutí míry detekce u genotypu s vysokým rizikem v testu HPV cobas® 4800
ve studii inkluzivity genotypu (konzervační roztok SurePath)

Typ HPV DNA	LOD (kopii/ml)	Počet pozitivních/ testovaných vzorků	Míra detekce	95 % interval spolehlivosti	
				Dolní	Horní
33	480	47/49	96 %	93 %	100 %
35	1400	48/48	100 %	93 %	100 %
39	190	53/53	100 %	93 %	100 %
45	480	49/49	100 %	93 %	100 %
51	100	47/48	98 %	89 %	100 %
52	7200	51/51	100 %	93 %	100 %
56	1400	50/50	100 %	93 %	100 %
58	1400	49/49	100 %	93 %	100 %
59	480	46/48	96 %	86 %	99 %
66	640	47/48	98 %	89 %	100 %
68	1100	48/48	100 %	93 %	100 %

Přesnost

Vlastní přesnost na místě byla stanovena pomocí položek panelu připravených pro studii meze detekce popsané v tomto příbalovém letáku. Pro analýzu přesnosti byly použity hladiny na a nad mezi detekce. Panely byly připraveny přidáním plazmidů HPV31, HPV16 a HPV18 na pozadí směsi HPV negativních vzorků pacientů odebraných do roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath.

Pozitivní míry detekce položek panelu (v roztoku PreservCyt a konzervačním roztoku SurePath) na a nad LOD jsou uvedeny v tabulce 9 a 10. U všech hladin plazmidů na panelu byla míra detekce nad 95 %. Byla analyzována variace hodnoty Ct testu a byly vypočítány náhodné faktory způsobené šarží činidel, systémy, rozdily mezi testy a v rámci testu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 pro roztok PreservCyt a v tabulce 12 pro konzervační roztok SurePath. Tabulka 13 ukazuje Ct hodnotu SD a %CV složek variace v roztoku PreservCyt. Tabulka 14 ukazuje Ct hodnotu SD a %CV složek variace v konzervačním roztoku SurePath.

Tabulka 9
Shrnutí míry detekce studie přesnosti HPV cobas® 4800 HPV na nebo nad LOD
(v roztoku PreservCyt)

Cíl	Hladina panelu	Koncentrace (kopii nebo buněk/ml)	Počet testů	Počet poz.	Míra detekce	95 % CI pro míru detekce	
						Dolní	Horní
HPV 31	> LOD	600	186	186	100 %	98 %	100 %
	= LOD	300	187	184	98 %	95 %	100 %
HPV 16	> LOD	1500	186	186	100 %	98 %	100 %
	= LOD	600	186	186	100 %	98 %	100 %
HPV 18	> LOD	1500	186	186	100 %	98 %	100 %
	= LOD	600	186	186	100 %	98 %	100 %

Tabulka 10
Shrnutí míry detekce studie přesnosti HPV cobas® 4800 HPV na nebo nad LOD
(v konzervačním roztoku SurePath)

Cíl	Hladina panelu	Koncentrace (kopii nebo buněk/ml)	Počet testů	Počet poz.	Míra detekce	95 % CI pro míru detekce	
						Dolní	Horní
HPV 31	> LOD	300	180	180	100 %	98 %	100 %
	= LOD	150	180	175	97 %	94 %	99 %
HPV 16	> LOD	600	180	180	100 %	98 %	100 %
	= LOD	300	180	180	100 %	98 %	100 %
HPV 18	> LOD	1500	180	180	100 %	98 %	100 %
	= LOD	600	180	180	100 %	98 %	100 %

Tabulka 11
Analýza hodnoty Ct složek variace studie přesnosti HPV cobas® 4800
na hladinách panelu připravených v roztoku PreservCyt

Cíl	Hladina panelu	N	Průměrná hodnota ohybu	Složky variace/procentuální příspěvek				
				Šarže činidel	Systém	Cyklus	Náhodně	Celkem
HPV 16	> LOD	186	36,3	0,038 17 %	0 0 %	0,111 49 %	0,079 35 %	0,228 100 %
	= LOD	186	37,5	0,025 11 %	0 0 %	0,042 18 %	0,161 71 %	0,228 100 %
HPV 18	> LOD	186	36,6	0,043 16 %	0 0 %	0,149 58 %	0,067 26 %	0,259 100 %
	= LOD	186	37,8	0,027 10 %	0 0 %	0,050 19 %	0,184 71 %	0,261 100 %
HPV 31	> LOD	186	36,5	0,003 1 %	0,002 1 %	0,105 35 %	0,187 63 %	0,297 100 %
	= LOD	187	37,6	0,020 3 %	0 0 %	0,157 24 %	0,489 73 %	0,666 100 %

Tabulka 12
Analýza hodnoty Ct složek variace studie přesnosti HPV cobas® 4800
na hladinách panelu připravených v konzervačním roztoku SurePath

Cíl	Hladina panelu	N	Průměrná hodnota ohybu	Složky variace/procentuální příspěvek				
				Šarže činidel	Systém	Cyklus	Náhodně	Celkem
HPV 16	> LOD	180	37,2	0,014 7 %	0 0 %	0,039 18 %	0,157 75 %	0,209 100 %
	= LOD	180	38,2	0 0 %	0 0 %	0,090 22 %	0,316 78 %	0,405 100 %
HPV 18	> LOD	180	36,3	0,011 5 %	0 0 %	0,119 58 %	0,073 36 %	0,204 100 %
	= LOD	180	37,7	0 0 %	0 0 %	0,148 40 %	0,219 60 %	0,366 100 %
HPV 31	> LOD	180	37,2	0 0 %	0 0 %	0,099 20 %	0,393 80 %	0,493 100 %
	= LOD	180	38,1	0,026 3 %	0,015 2 %	0,038 5 %	0,684 90 %	0,764 100 %

Tabulka 13
Analýza hodnoty Ct SD a %CV studie přesnosti HPV cobas® 4800
na hladinách panelu připravených v roztoku PreservCyt

Cíl	Hladina panelu	N	Průměrná hodnota ohybu	Složky SD/ %CV				
				Šarže činidel	Systém	Cyklus	Náhodně	Celkem
HPV 16	> LOD	186	36,3	0,19 0,50 %	0 0,00 %	0,33 0,90 %	0,28 0,80 %	0,48 1,30 %
	= LOD	186	37,5	0,16 0,40 %	0 0,00 %	0,20 0,50 %	0,40 1,10 %	0,48 1,30 %
HPV 18	> LOD	186	36,6	0,21 0,60 %	0 0,00 %	0,39 1,10 %	0,26 0,70 %	0,51 1,40 %
	= LOD	186	37,8	0,16 0,40 %	0 0,00 %	0,22 0,60 %	0,43 1,10 %	0,51 1,30 %
HPV 31	> LOD	186	36,5	0,05 0,10 %	0,05 0,10 %	0,32 0,90 %	0,43 1,20 %	0,54 1,50 %
	= LOD	187	37,6	0,14 0,40 %	0 0,00 %	0,40 1,10 %	0,70 1,90 %	0,82 2,20 %

Tabulka 14
Analyza hodnoty Ct SD a %CV studie přesnosti HPV cobas® 4800
na hladinách panelu připravených v konzervačním roztoku SurePath

Cíl	Hladina panelu	N	Průměrná hodnota ohybu	Složky SD/ %CV				
				Šarže činidel	Systém	Cyklus	Náhodně	Celkem
HPV 16	> LOD	180	37,2	0,12	0	0,20	0,40	0,46
				0,30 %	0,00 %	0,50 %	1,10 %	1,20 %
	= LOD	180	38,2	0	0	0,30	0,56	0,64
				0,00 %	0,00 %	0,80 %	1,50 %	1,70 %
HPV 18	> LOD	180	36,3	0,11	0	0,34	0,27	0,45
				0,30 %	0,00 %	1,00 %	0,70 %	1,20 %
	= LOD	180	37,7	0	0	0,38	0,47	0,61
				0,00 %	0,00 %	1,00 %	1,20 %	1,60 %
HPV 31	> LOD	180	37,2	0	0,02	0,32	0,63	0,70
				0,00 %	0,10 %	0,80 %	1,70 %	1,90 %
	= LOD	180	38,1	0,16	0,12	0,20	0,83	0,87
				0,40 %	0,30 %	0,50 %	2,20 %	2,30 %

Analytická specificita

Byl testován panel bakterií, plísňů a virů, včetně těch, které se běžně vyskytují v ženském urogenitálním traktu, dále několika typů lidských papilloma virů s nízkým a neurčitým rizikem pomocí testu HPV **cobas® 4800** pro stanovení analytické specificity. Tyto organizmy uvedené v tabulce 15 byly přidány ve vysokých koncentracích ($\geq 1 \times 10^3$ jednotek/reakce) do HPV negativního vzorku v roztoku PreservCyt a do HPV negativního vzorku v roztoku PreservCyt s přidaným plasmidem DNA HPV31, HPV16 a HPV18 v množství 3krát překračujícím LOD. Výsledky ukazují, že žádný z těchto organizmů neinterferoval s detekcí plasmidu DNA HPV 31, HPV 16 a HPV 18, ani nevytvořil falešně negativní výsledek v HPV negativním vzorku.

Tabulka 15
Mikroorganismy testované na analytickou specificitu

<i>Achromobacter xerosis</i>	Virus Herpes simplex 1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Virus Herpes simplex 2	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Virus selhání lidské imunity (HIV-1)	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Acinetobacter sp. genospecies 3</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae ss ozaenae</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
Adenovirus	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SV40
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Lactobacillus crispus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii s. lactis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Mobiluncus curtisii s. curtisii</i>	HPV 6
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	HPV 11
<i>Candida albicans</i>	<i>Morganella morganii</i>	HPV 26
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	HPV 40
<i>Chromobacter violaceum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	HPV 42
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	HPV 54
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	HPV 55B
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HPV 61
Cytomegalovirus	<i>Neisseria meningitidis</i> Séroskupina A	HPV 62
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	HPV 64
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	HPV 67
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	HPV 69
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	HPV 70
Virus Epstein-Barrové	<i>Proteus mirabilis</i>	HPV 71

<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	HPV 72
<i>Escherichia coli</i>	<i>Providencia stuartii</i>	HPV 73
<i>Ewingella americana</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HPV 81
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Ruminococcus productus</i>	HPV 82
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Salmonella minnesota</i>	HPV 83
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>	HPV 84
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	HPV 89 (CP6108)
Virus hepatitidy B (HBV)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	

Interferenční látky

HPV pozitivní a HPV negativní cervikální vzorky stejně jako upravené vzorky byly použity k vyhodnocení účinků endogenních a exogenních interferenčních látek, které mohou být potenciálně přítomné v cervikálních vzorcích. Testovací materiály použité v těchto studiích jsou popsány v tabulce 16. Koncentrace testovaných endogenních a exogenních látek představují podmínky, které mohou objevit při odběru vzorků.

Jako potenciální endogenní interferenční látky nalézané cervikálních vzorcích byly testovány plná krev, mononukleární buňky periferní krve (PBMC) a cervikální hlen. Hladiny každé testované potenciálně interferenční látky a zjištění výkonu jsou uvedeny v tabulce 17. Nebyla zjištěna žádná interference u PBMC nebo cervikálního hlenu ve všech hladinách. Plná krev nevykázala žádnou interferenci, pokud byla přítomná ve vizuálně zjištěných množstvích do 2 %.

Tabulka 16
Popis vzorků pro testování interference

Typ vzorku	Popis
HPV pozitivní cervikální vzorky	Na alikvotní podíly bylo rozděleno 10 jednotlivých HPV pozitivních vzorků v roztoku PreservCyt a testováno s endogenními interferenčními látkami a bez nich
HPV negativní cervikální vzorky	Na alikvotní podíly bylo rozděleno 10 jednotlivých HPV negativních vzorků v roztoku PreservCyt a testováno s endogenními interferenčními látkami a bez nich
Upravené HPV pozitivní cervikální vzorky	HPV pozitivní (kanál 1) vzorky v roztoku PreservCyt byly rozředěny HPV negativním vzorkem na koncentraci přibližně 3x LOD. Poté byly přidány plazmidy HPV typu 16 (kanál 2) a 18 (kanál 3) v koncentraci přibližně 3x LOD.
Směsi 3x LOD roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath	Plazmidy HPV typu 31, 16 a 18 byly každý rozředěny na 3x LOD ve směsích negativního vzorku a roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath.

Tabulka 17
Výsledky testování interference s endogenními interferenčními látkami

Testovaná interferenční látka	Testované koncentrace	Pozorovaná interference
Plná krev	1 %, 1,5 %, 2 %, 3 % obj.	Nad 2 %
PBMC	10 ⁴ , 10 ⁵ , 10 ⁶ buněk/ml	Žádná
Cervikální hlen	Hlen získaný při standardním cervikálním čisticím postupu	Žádná

Jako potenciálně interferenční látky bylo testováno celkem 18 volně prodejných prostředků pro ženskou hygienu a antikoncepčních prostředků. Typy potenciálně interferenčních prostředků a zjištění výkonu v roztoku PreservCyt a konzervačním roztoku SurePath ve směsích 3x LOD jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18
Výsledky testování interference s exogenními interferenčními látkami

Popis interferenční látky	Pozorovaná interference
Antikoncepční gely, pěny	Žádná
Vaginální lubrikanty	*Ano
Výplach dělohy	Žádná
Protiplišňové krémy obsahující 1 % klotrimazol, fenazopyridin hydrochlorid, 1 % hydrokortizon, 2 % mikonazol nitrát, 6,5 % tiokonazol mast, 20 % benzokain	Žádná

* Replens® (topický gel proti vysoušení) vykázal negativní výsledky ve směsi konzervačního roztoku SurePath 3 x LOD.

Porovnatelnost základní látky

Celkem bylo vyšetřeno 1752 pacientek, kterým byly odebrány cervikální vzorky do roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath. Každý pár cervikálních vzorků byl vyhodnocen testem HPV **cobas**[®] 4800, tak aby bylo dosaženo shody výsledků. V tabulce 19 vzorky s pozitivními výsledky v jakémkoli HPV detekčním kanále byly považovány za pozitivní; vzorky s negativními výsledky ve všech HPV detekčních kanálech byly považovány za negativní. Shoda mezi pozitivními vzorky v konzervačním roztoku SurePath a vzorky v roztoku PreservCyt byla 96,4 %; shoda mezi negativními vzorky byla 95,1 % a celková shoda byla 95,4 %.

Tabulka 19
Shrnutí výsledků testu HPV cobas[®] 4800 pro spoluodebrané vzorky pomocí roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath pomocí výsledku testu „HPV High Risk Panel“

Páry cervikálních vzorků N = 1752		Roztok PreservCyt (20 ml)		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Konzervační roztok SurePath (10 ml)	Pozitivní	407	65	472
	Negativní	15	1265	1280
	Celkem	422	1330	1752

Shoda pozitivních = $407/422 = 96,4 \%$ (95 % CI 94,2 %, 98,0 %)

Shoda negativních = $1265/1330 = 95,1 \%$ (95 % CI 93,8 %, 96,2 %)

Celková shoda = $1672/1752 = 95,4 \%$ (95 % CI 94,3 %, 96,4 %)

Výsledky studie těchto 1752 pacientek byly rovněž analyzovány pomocí kombinace výsledků ze všech tří HPV detekčních kanálů. V této analýze (tabulka 20) byly výsledky každého kanálu 1–3 zkombinovány. Shoda mezi pozitivními vzorky v konzervačním roztoku SurePath a vzorky v roztoku PreservCyt byla 96,9 %; shoda mezi negativními vzorky byla 98,0 % a celková shoda byla 97,9 %.

Tabulka 20
Shrnutí výsledků testu HPV cobas[®] 4800 pro spoluodebrané vzorky pomocí roztoku PreservCyt a konzervačního roztoku SurePath pomocí výsledku testu „HPV High Risk Panel Plus Genotyping“

Páry cervikálních vzorků N = 5256		Roztok PreservCyt (20 ml)		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Konzervační roztok SurePath (10 ml)	Pozitivní	492	94	586
	Negativní	16	4654	4670
	Celkem	508	4748	5256

Shoda pozitivních = $492/508 = 96,9 \%$ (95 % CI 94,9 %, 98,2 %)

Shoda negativních = $4654/4748 = 98,0 \%$ (95 % CI 97,6 %, 98,4 %)

Celková shoda = $5146/5256 = 97,9 \%$ (95 % CI 97,5 %, 98,3 %)

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., Jacobs, Marcel V., Manos, M.M., et al. 1999. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. *Journal of Pathology*. **189**:12-19.
4. Bernard HU. Review: The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005; **32S**, S1-6.
5. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn, L. Review: Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005; **32S**:S43-51.
6. zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996; **122**:3-13.
7. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; **324**:17-27.
8. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999; **91**:506-511.
9. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*. 1992; **79**:328-37.
10. Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., et al. 1995. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 87, No. 11:796-802.
11. Bosch, F.X., A. Lorincz, N. Muñoz, C.J.L.M. Meijer, K.V. Shah (2002) "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer" *J Clin Path* **55**:244-265.
12. Muñoz N, F.X. Bosch, S. de Sanjosé, R. Herrero, X. Castellsagué, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, and Chris J.L.M. Meijer, for the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2003) "Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer" *N Engl J Med* **348(6)**:518-527.
13. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; **88**:63-73.
14. Koutsky, L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *American Journal of Medicine*. **102(5A)**:3-8.
15. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*. 2005;**191**:731-738.
16. Moscicki, A, Schiffman M, Kjaer S, Villa L. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; **24(S3)**; 42-51.
17. Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis*. 2004 Jul 1;**190(1)**:37-45.
18. Palmer Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Wacholder S, Tarone R, Burk RD. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005 Jun 1;**191(11)**:1808-16.
19. Zielinski GD, Snijders P.J.F, Rozendaal I, et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis; long term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol* 2001;**195**:300-306.
20. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix, *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**:252-58.
21. Nobbenhuis MA, Helmerhorst T.J, van den Brule A.J, Rozendaal L, Voorhorst F.J, Bezemer P.D, Verheijen R.H, Meijer C.J. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet*. 2001;**358(9295)**:1782-1783.
22. Myers, T.W. and Gelfand, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. **30**:7661-7666.
23. Davies, P., Kornegay, J., Iftner, T. 2001. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 15, No. 5:677-700.
24. Birch, D.E., et al. 1996. The use of a thermally activated DNA polymerase PCR gives improved specificity, sensitivity and product yield without additives or extra process steps. *Nature*. Vol 381, **No 6581**:445-446.
25. Meng, Q., et al. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *J Clin Microbiol*. Vol 39, **No 8**:2937-2945.
26. 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.
27. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* **10**:413-417.
28. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
29. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Villanova, PA:CLSI, 2005.
31. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 48th Edition. 2007.
32. Wheeler, C.M., Hunt, W.C., Joste, N.E., Key, C.R., Quint, W.G.V. and Castle, P.E. 2009. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in the United States. *J Natl Cancer Inst*. **101**:475-487.
33. Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G. and Schiffman, M. 2005. The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 and 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *J Natl Cancer Inst*. **97**:1072-1079.
34. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, and Solomon D. 2007. 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests, *Am J Obstet Gynecol* **197 (4)**; 346-355.
35. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki A-B, Smith RA, Eyre HJ, Cohen C. 2002, American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. *CA Can Jour Clin* **53**: 342-362.

Informace o revizi dokumentu

Doc Rev. 2.0
06/2010

Koncentrace dATP, dCTP, dGTP, dUTP ve směsích **HPV MMX** pro 240 a 960 testů se změnila z < 0,01 % na < 0,13 %, aby odražela přesné hladiny.

Do oddílu **VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ** byly přidány další bezpečnostní věty týkající se manipulace a čištění guanidin-hydrochloridu.

Oddíl **POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY** byl aktualizován a byly přidány popisy materiálů tak, aby odpovídaly názvům produktů.

Oddíl **Vzorky** byl aktualizován a uvádí minimální a maximální požadovaný objem vzorku při použití 13 ml kulatých sekundárních zkumavek.

Do oddílu **Provedení úplného pracovního postupu** byla přidána poznámka vysvětlující sledování data expirace činidla v systému **cobas[®] 4800**.

Do oddílu **Provedení pracovního postupu Pouze PCR** byla přidána rozšířená poznámka zdůrazňující, že uživatel odpovídá za zahájení amplifikace/detekce do 90 minut od přípravy HPV Master Mixu, aby nedošlo k překročení limitů stability.

K oddílu **PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ** bylo přidáno dalších šest poznámek (čísla 1-6) pro vyjasnění omezení testu HPV **cobas[®] 4800**.

K oddílu **LITERATURA** byly přidány další dvě reference (34 a 35) pro nová procedurální omezení 1 a 3.

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



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



Distributed by

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, Germany

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

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

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

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

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

ROCHE, COBAS, COBAS X, COBAS Z, EAGLEZ05 a AMPERASE jsou ochranné známky společnosti Roche.

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.

EPPENDORF MULTIPETTE a EPPENDORF COMBITIP jsou obchodní značky společností Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Německo.

PRESERVCYT je obchodní známka společnosti Cytoc Corporation.

REPLENS je obchodní známka společnosti Lil' Drug Store Products, Inc.

SUREPATH je obchodní známka společnosti TriPath Imaging, Inc.

Kyaninová barviva v tomto produktu podléhají patentovým právům GE Healthcare Bio-Sciences Corp. a Carnegie Mellon University a jsou licencovány společností Roche pouze za účelem výzkumu a jako součást diagnostických sad *in vitro*. Jakékoliv použití takových sad pro jiné účely než pro výzkum nebo *in vitro* diagnostiku vyžaduje poskytnutí sublicence od společnosti GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, U.S.A. a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.

Copyright 2010 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

06/2010

Doc Rev. 2.0

(05641225001-02ENGL)

05990289001-02



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

