

# Aptima HPV Assay

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Pouze pro export z USA.

<b>Obecné informace</b> .....	<b>2</b>
Určené použití .....	2
Souhrn a vysvětlení testu .....	2
Principy metody .....	3
Varování a bezpečnostní opatření .....	4
Požadavky na skladování reagensů a manipulaci s nimi .....	6
Odběr a uchování vzorku .....	7
<b>Postupy kontroly kvality</b> .....	<b>30</b>
<b>Interpretace testu</b> .....	<b>31</b>
<b>Omezení</b> .....	<b>32</b>
<b>Účinnost testů systémů DTS</b> .....	<b>34</b>
<b>Očekávané výsledky testů systému Tigris DTS: Prevalence vysoce rizikové mRNA HPV</b> .....	<b>43</b>
<b>Uspořádání klinické studie Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep</b> .....	<b>44</b>
<b>Účinnost testů systému Tigris DTS</b> .....	<b>46</b>
<b>Očekávané výsledky testů systému Panther: Prevalence vysoce rizikové mRNA HPV</b> .....	<b>75</b>
<b>Uspořádání klinické studie Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep</b> .....	<b>76</b>
<b>Účinnost testů systému Panther</b> .....	<b>78</b>
<b>Bibliografie</b> .....	<b>102</b>

## Systémy DTS™

<b>Systémy DTS</b> .....	<b>9</b>
Dodávané reagensie a materiály .....	9
Potřebný materiál, který se dodává zvlášť .....	10
Volitelné materiály .....	11
<b>Testovací postup systémů DTS</b> .....	<b>11</b>
Poznámky k postupům .....	16

## Systém Tigris™ DTS

<b>Systém Tigris DTS</b> .....	<b>18</b>
Dodávané reagensie a materiály .....	18
Potřebný materiál, který se dodává zvlášť .....	19
Volitelné materiály .....	20
<b>Testovací postup systému Tigris DTS</b> .....	<b>20</b>
Poznámky k postupům .....	22

## Systém Panther™

<b>Systém Panther</b> .....	<b>24</b>
Dodávané reagensie a materiály .....	24
Potřebný materiál, který se dodává zvlášť .....	25
Volitelné materiály .....	25
<b>Testovací postup systému Panther</b> .....	<b>26</b>
Poznámky k postupům .....	28

## Obecné informace

### Určené použití

Aptima HPV Assay (Test Aptima HPV) je cílový amplifikační test sondy nukleové kyseliny pro *in vitro* kvalitativní detekci E6/E7 virové mediátorové RNA (mRNA) ze 14 vysoce rizikových typů lidského papillomaviru (HPV) (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68). Aptima HPV Assay nerozlišuje mezi 14 vysoce rizikovými typy.

- Aptima HPV Assay je indikován k použití při screeningu pacientek s výsledkem Pap testu ASC-US (atypické dlaždicové buňky neurčeného významu) k určení, zda je potřebné kolposkopické vyšetření. Výsledky testu nejsou určeny ke zjištění nepotřebnosti kolposkopie pro ženy.
- Aptima HPV Assay lze použít jako adjuvantní vyšetření (kombinované testování „co-testing“) k cervikální cytologii pro posouzení přítomnosti nebo nepřítomnosti vysoce rizikových typů HPV. Tyto informace spolu s lékařovým posouzením historie cytologie, dalších rizikových faktorů a oborových předpisů lze použít jako vodítko při terapii pacientky.
- Aptima HPV Assay lze použít jako prvotní screeningový test, ve spojení s cervikální cytologií či bez ní, k určení žen se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny děložního čípku nebo ohrožených jiným závažným onemocněním. Tyto informace spolu s lékařovým posouzením historie screeningu pacientky, dalších rizikových faktorů a oborových předpisů lze použít jako vodítko při terapii pacientky.

Cervikální vzorky pro Pap test odebrané do lahviček ThinPrep™ obsahujících roztok PreservCyt™ lze analyzovat pomocí Aptima HPV Assay před zpracováním Pap i po něm, což platí i pro cervikální vzorky odebrané pomocí soupravy pro odběr a přepravu vzorků Aptima. Tento test lze použít k testování vzorků systémy přímého odběru do zkumavek (Direct Tube Sampling – DTS), a to buď systémem Tigris DTS, nebo systémem Panther. Cervikální vzorky odebrané s použitím konzervačního roztoku SurePath lze testovat pomocí Aptima HPV Assay v systému Tigris DTS nebo Panther.

### Souhrn a vysvětlení testu

Rakovina děložního čípku je jedním z nejčastějších druhů rakoviny u žen na světě. HPV je patogenní agens, které je zodpovědné za více než 99% všech případů rakoviny děložního čípku.<sup>1, 2, 3</sup> HPV je běžný pohlavně přenosný DNA virus skládající se z více než 100 genotypů.<sup>4</sup>

Virový genom HPV je dvojřetězcová kruhová DNA v délce přibližně 7900 párů. Genom má osm překrývajících se otevřených čtecích rámců. Skládá se ze šesti raných genů (E), dvou pozdních genů (L) a jedné dlouhé kontrolní oblasti bez translace. Geny L1 a L2 kódují hlavní a vedlejší proteinové kapsidy. Rané geny regulují replikaci viru HPV. Geny E6 a E7 z vysoce rizikových genotypů HPV jsou známé onkogeny. Proteiny z E6/E7 polycistronické mRNA mění funkce buněčného proteinu p53 a proteinu retinoblastomu, což vede k narušení kontrolních bodů buněčného cyklu a nestabilitě genomu buňky.<sup>5, 6</sup>

Čtrnáct HPV genotypů je považováno za patogenní nebo vysoce rizikové pro onemocnění děložního čípku.<sup>7</sup> Několik studií propojilo genotypy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68 s progresí onemocnění.<sup>2, 5, 8</sup> U pacientek s přetrvávající infekcí některým z těchto typů hrozí zvýšené riziko rozvoje závažné dysplazie nebo cervikálního karcinomu.<sup>7, 9</sup>

Infekce HPV jsou velmi časté a většina žen se zbaví infekcí HPV do 6 až 12 měsíců.<sup>8, 10</sup> Přítomnost nukleové kyseliny HPV ještě neznamená přítomnost cervikální dysplazie nebo

rakoviny děložního čípku. Účinný přístup k detekci cervikálního onemocnění však znamená zaměřit tyto onkogenní elementy HPV, které napomáhají přetrvávající virové infekci a buněčné transformaci.<sup>3</sup>

### **Klinická účinnost Aptima HPV Assay při primárním screeningu rakoviny děložního čípku**

Klinická účinnost Aptima HPV Assay při použití v primární screeningové modalitě byla zkoumána v několika studiích nezávislými výzkumníky. Třináct recenzovaných publikací<sup>11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23</sup> z deseti samostatných klinických studií informuje o účinnosti Aptima HPV Assay při primárním screeningu u žen v devíti zemích (Čína, Kanada, Francie, Mexiko, Anglie, Dánsko, Nizozemsko, USA a Německo). Data z těchto studií ukazují, že Aptima HPV Assay dosahuje srovnatelné klinické účinnosti jako jiné klinicky ověřené testy HPV použité při primárním screeningu prekarcinomu a karcinomu děložního čípku.

### **Principy metody**

Aptima HPV Assay se skládá ze tří hlavních kroků, které probíhají v jedné zkumavce: technologie záchytu cíle, amplifikace cíle pomocí transkripce mediované amplifikace (TMA),<sup>24</sup> a detekce produktů amplifikace (amplikon) pomocí testu ochrany hybridizací (HPA).<sup>25</sup> Test zahrnuje vnitřní kontrolu (IC) pro sledování zachycení, amplifikaci a detekci nukleové kyseliny a rovněž chyb operátora nebo přístroje.

Vzorky jsou odebrány nebo přeneseny do zkumavky obsahující roztok pro přepravu vzorků (STM), která lyzuje buňky, uvolňuje mRNA a chrání před degradací během skladování. Při Aptima HPV Assay se ze vzorku izoluje cílová mRNA pomocí záchytových oligomerů, které jsou spojeny s magnetickými mikročásticemi. Záchytové oligomery obsahují sekvence komplementární ke konkrétním oblastem cílových molekul mRNA HPV, stejně jako řetězec deoxyadenosinových zbytků. Během kroku hybridizace se oblasti specifické pro sekvence záchytových oligomerů váží na specifické oblasti cílové molekuly mRNA HPV. Komplex záchytový oligomer:cíl je potom z roztoku vychytáván snížením teploty reakce na pokojovou teplotu. Toto snížení teploty umožňuje hybridizaci mezi deoxyadenosinovou oblastí na záchytových oligomerech a polydeoxythimidinovými molekulami, které jsou kovalentně připojeny k magnetickým částicím. Mikročástice včetně zachycených cílových molekul mRNA HPV, které jsou na ně navázané, jsou pomocí magnetů zataženy ke straně zkumavky, kde dojde k odsání supernatantu. Částice se promyjí, aby se odstranila rezidua matrice vzorku, která mohou obsahovat inhibitory amplifikace.

Po dokončení zachycení cíle je mRNA HPV amplifikována pomocí TMA (metody amplifikace nukleové kyseliny založené na transkripci), která využívá dva enzymy, reverzní MMLV transkriptázu a T7 polymerázu RNA. Reverzní transkriptáza se používá k vytvoření kopie DNA sekvence cílové mRNA obsahující sekvenci promotoru pro RNA polymerázu T7. RNA polymeráza T7 produkuje více kopií RNA amplikonu z kopie DNA templátu.

Detekce amplikonu je dosaženo metodou HPA využívající jednořetězcové sondy nukleové kyseliny s chemoluminiscenčním značením, které jsou komplementární k amplikonu. Značené sondy nukleové kyseliny hybridizují specificky k amplikonu. Selektivní reagencie diferencují mezi hybridizovanými a nehybridizovanými sondami pomocí inaktivace značení na nehybridizovaných sondách. V průběhu detekce se světlo vyzařované z označených hybridů RNA:DNA měří v luminometru jako fotonové signály zvané relativní světelné jednotky (Relative Light Units – RLU). Konečné výsledky testu se interpretují na základě poměru signálu analytu ku cutoff (S/CO).

Ke každé reakci se přidává vnitřní kontrola (IC) prostřednictvím reagentie pro zachycení cíle. IC monitoruje zachycení cíle, amplifikaci a detekční kroky testu. Signál IC je při každé reakci odlišen od signálu HPV podle odlišné kinetiky emise světla ze sond s různým značením.<sup>26</sup> Amplikon specifický pro IC je detekován sondou s rychlou emisí světla (flasher). Amplikon specifický pro HPV je detekován pomocí sond s relativně pomalejší kinetikou emise světla (glower). Dvojitý kinetický test (DKA) je metoda používaná k rozlišení mezi signály značek flasherů a glowerů.<sup>26</sup>

## Varování a bezpečnostní opatření

- A. Pro diagnostické použití *in vitro*.
- B. Další specifická varování a bezpečnostní opatření najdete v návodech k obsluze systémů DTS, systému Tigris DTS a systému Panther.

## Související s laboratoří

- C. Používejte pouze dodané nebo specifikované jednorázové laboratorní materiály.
- D. Dodržujte běžná laboratorní bezpečnostní opatření. V určených pracovních prostorech nejzte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagentiemi soupravy používejte jednorázové rukavice bez talku, ochranu očí a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a s reagentiemi soupravy si důkladně umyjte ruce.
- E. **Varování: Dráždivé látky a žiraviny:** Zamezte styku reagentií Auto Detect 1 a Auto Detect 2 s kůží, očima a sliznicemi. Pokud se tyto kapaliny dostanou do styku s kůží nebo očima, omyjte postiženou oblast vodou. Dojde-li k rozliti těchto kapalin, zředte rozlité kapaliny vodou a pak je vytřete dosucha.
- F. Pracovní povrchy, pipety a jiné vybavení musí být pravidelně dekontaminovány pomocí 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného. Více informací viz *Testovací postup systémů DTS*, *Testovací postup systému Tigris DTS* nebo *Testovací postup systému Panther DTS*.

## Specifické pro systémy DTS

- G. Chcete-li zabránit kontaminaci laboratorní oblasti amplikonem, musí být laboratorní prostory uspořádány v jednosměrném průběhu práce: od přípravy reagentie po detekci. Vzorky, zařízení ani reagentie se nesmí vracet do oblastí, kde byly provedeny předchozí kroky. Také personál se nesmí vracet do předchozích pracovních oblastí bez řádných opatření bránících kontaminaci. Důrazně doporučujeme vyhradit samostatný prostor pro detekci.

## Související se vzorkem

- H. Během přepravy a skladování vzorků udržujte správné teplotní podmínky, abyste zaručili neporušenost vzorků. Stabilita vzorků za přepravních a skladovacích podmínek jiných než doporučených nebyla vyhodnocena.
- I. Data expirace uvedené na soupravách a zkumavkách pro odběr/transport vzorků se vztahují na místo odběru/transportu, a nikoli na testovací zařízení. Vzorky odebrané/přenesené kdykoli před datem expirace jsou platné pro testování, pokud byly přepravovány a skladovány podle příslušné příbalové informace, a to i v případě, že uplynula uvedená doba expirace.

- J. Vzorky mohou být infekční. Při provádění tohoto testu dodržujte obecná bezpečnostní opatření. Vedoucí laboratoře stanovuje náležitě metody manipulace a likvidace. Tento postup směřuje provádět pouze osoby náležitě vyškolené v nakládání s infekčními materiály.
- K. Během manipulace se vzorkem zamezte zkřížené kontaminaci. Zajistěte, aby se nádoby se vzorky vzájemně nedotýkaly, a použité materiály zlikvidujte, aniž byste je přenášeli nad otevřenými nádobami. Vyměňte si rukavice, pokud se dostanou do styku se vzorky.
- L. Při propíchnutí může za určitých podmínek z víčka zkumavky uniknout kapalina. Více informací viz *Testovací postup systémů DTS*, *Testovací postup systému Tigris DTS* nebo *Testovací postup systému Panther DTS*.
- M. Vzorky odebrané s použitím konzervačního roztoku ThinPrep nebo soupravy pro odběr a přepravu vzorků (CSCT) je nutno odmítnout, pokud byl ve zkumavce na vzorky ponechán odběrový prostředek.
- N. Vzorky odebrané s použitím konzervačního roztoku SurePath je nutno odmítnout, pokud byl v lahvičce ponechán odběrový prostředek.

### Související s testem

- O. Skladujte reagenty při stanovených teplotách. Účinnost testu může být ovlivněna použitím nesprávně skladovaných reagentů.
- P. Vyhněte se mikrobiální a ribonukleázové kontaminaci reagentů.
- Q. Soupravu nepoužívejte po datu expirace.
- R. Nezaměňujte, nemíchejte ani nekombinujte reagenty nebo kalibrátory testu ze souprav s různými čísly šarží.
- S. Kapaliny testu Aptima, reagenty Auto Detect Aptima, konzervační roztoky systému Aptima (pouze systémy DTS a systém Tigris DTS) a kontroly Aptima HPV Assay (pouze systémy DTS a systém Tigris DTS) nejsou součástí hlavní šarže; lze použít libovolnou šarží.
- T. K dosažení přesných výsledků testu je nezbytné důkladné promíchání reagentů testu.
- U. Je nutno použít špičky s hydrofobními zátkami.

### Specifické pro systémy DTS

- V. Pro použití s tímto testem je třeba vyhradit minimálně dva opakovací pipetory – jeden pro použití v krocích **záchytu cíle** a **amplifikace** a jeden pro použití v krocích **po amplifikaci**.
- W. Při použití opakovacích pipetorů pro přidání reagentů se špičkou pipety nedotýkejte zkumavky, abyste zabránili přenosu z jedné zkumavky do druhé.
- X. Všechny pipetory se musí pravidelně čistit podle návodu v *Poznámky k postupům*.
- Y. Jsou nutné nejméně dvě samostatné třepačky SB100™, jedna pro zachycení cíle/ amplifikaci a jednu pro kroky po amplifikaci.
- Z. Uzavírací karty NEPOUŽÍVEJTE opakovaně. Pro každý krok je třeba použít nové uzavírací karty.

**Požadavky na skladování reagensů a manipulaci s nimi**

Nepoužívejte reagensy po datu expirace uvedeném na lahvičkách. Níže naleznete další pokyny pro skladování.

- A. Následující reagensy jsou stabilní při uchovávání po přijetí při teplotě 2 až 8 °C (v chladničce):
- Amplifikační reagensy HPV
  - Enzymová reagensy HPV
  - Reagensy sondy HPV
  - Reagensy vnitřní kontroly HPV
  - Pozitivní kalibrátory a negativní kalibrátory HPV
  - Pozitivní kontroly a negativní kontroly HPV (pouze systémy DTS a systém Tigris DTS)
- B. Následující reagensy jsou stabilní při uchovávání při teplotě 15 až 30 °C (pokožové teplotě):
- Rekonstituční roztok pro amplifikaci HPV
  - Rekonstituční roztok pro enzymy HPV
  - Rekonstituční roztok pro sondy HPV
  - Reagensy pro zachycení cíle HPV
  - Selekční reagensy HPV
  - Promývací roztok
  - Olejová reagensy
  - Pufr pro deaktivaci kapaliny
  - Reagensy Auto Detect 1
  - Reagensy Auto Detect 2
  - Konzervační roztoky systému Aptima (pouze systém Tigris DTS)
- C. Po rekonstrukci jsou následující reagensy stabilní po dobu 30 dnů, pokud jsou uchovávány při teplotě 2 až 8 °C:
- Amplifikační reagensy HPV
  - Enzymová reagensy HPV
  - Reagensy sondy HPV
- D. Pracovní reagensy zachycení cíle (wTCR) je stabilní po dobu 30 dnů, pokud je uchovávána při teplotě 15 až 30 °C. Neukládejte do chladničky.
- E. Veškeré nepoužité rekonstituované reagensy a wTCR zlikvidujte po 30 dnech nebo po uplynutí doby použitelnosti hlavní šarže, dle toho, co nastane dříve.
- F. Reagensy Aptima HPV Assay skladované uvnitř systému Tigris DTS jsou stabilní po kumulativní dobu 48 hodin.
- G. Reagensy Aptima HPV Assay skladované uvnitř systému Panther jsou stabilní po kumulativní dobu 72 hodin.
- H. Reagensy sondy i rekonstituované reagensy sondy jsou fotosenzitivní. Reagensy uchovávejte chráněné před světlem.
- I. Reagensy nezmrazujte.

## Odběr a uchování vzorku

### A. Odběr a zpracování vzorku

#### *Vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep*

1. Cervikální vzorky pro Pap test odebírejte do lahviček ThinPrep s roztokem PreservCyt pomocí odběrových prostředků typu štěteček nebo cytobrush/spatula podle pokynů výrobce.
2. Před zpracováním pomocí ThinPrep 2000 Systému, ThinPrep 3000 Systému, ThinPrep 5000 procesoru nebo ThinPrep 5000 procesoru s automatickým dávkovačem Autoloader, případně po něm, přeneste 1 ml vzorku odebraného s použitím konzervačního roztoku ThinPrep do transferové zkumavky na vzorek Aptima dle pokynů v příbalové informaci soupravy pro transport vzorků Aptima.

#### *Vzorky v konzervačním roztoku SurePath (pouze systém Tigris DTS a systém Panther)*

1. Pomocí konzervačního roztoku SurePath odebírejte vzorek podle návodu k použití Pap testu SurePath nebo systému PrepStain.
2. Vzorek odebraný pomocí konzervačního roztoku SurePath přeneste do transferové zkumavky na vzorek Aptima dle pokynů v příbalové informaci soupravy pro transport vzorků Aptima.

#### *Vzorky v soupravě pro odběr a transport cervikálních vzorků Aptima*

Vzorek odeberte podle návodu k použití soupravy Aptima CSCT.

### B. Přeprava a skladování před testováním

#### *Vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep*

1. Vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep transportujte při teplotě 2 až 30 °C.
2. Vzorky je nutno přenést do transferové zkumavky na vzorek Aptima do 105 dnů od odběru.
3. Před přenesením je nutno vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep skladovat při teplotě 2 až 30 °C, při teplotách nad 8 °C maximálně 30 dnů.
4. Vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep přenesené do transferové zkumavky na vzorek Aptima lze skladovat při teplotě 2 až 30 °C po dobu 60 dnů.
5. Pokud je zapotřebí delší skladování, vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep nebo vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep rozpuštěné v transferové zkumavce na vzorek lze skladovat při teplotě -20 °C nebo nižší po dobu 24 měsíců.

#### *Vzorky v konzervačním roztoku SurePath (pouze systém Tigris DTS a systém Panther)*

1. Vzorky v konzervačním roztoku SurePath transportujte při teplotě 2 až 25 °C.
2. Vzorky je nutno přenést do transferové zkumavky na vzorek Aptima do 7 dnů od odběru.
3. Před přenosem je nutno vzorky v konzervačním roztoku SurePath skladovat při teplotě 2 až 25 °C.
4. Vzorky v konzervačním roztoku SurePath přenesené do transferové zkumavky na vzorek Aptima lze skladovat při teplotě 2 až 25 °C po dobu 7 dnů.

#### *Vzorky v soupravě pro odběr a transport cervikálních vzorků Aptima*

1. Vzorky transportujte a skladujte při teplotě 2 až 30 °C po dobu 60 dní.
2. Pokud je zapotřebí delší skladování, vzorky v transportní soupravě lze skladovat při teplotě -20 °C nebo nižší po dobu 24 měsíců.

### C. Ošetření vzorků v konzervačním roztoku SurePath (pouze systém Tigris DTS a systém Panther)

**Poznámka:** Před testováním pomocí Aptima HPV Assay je třeba vzorky v konzervačním roztoku SurePath ošetřit pomocí transportního roztoku Aptima.

1. Transportní roztok Aptima (pouze systém Tigris DTS a systém Panther)

Ošetřené vzorky lze před testováním pomocí Aptima HPV Assay skladovat při teplotě 2 až 8 °C po dobu 17 dnů. Více podrobností najdete v příbalovém letáku soupravy pro transport vzorků Aptima.

D. Uchování vzorků po testování

1. Vzorky musí být po proběhnutí testu uloženy vertikálně ve stojanu.
2. Zkumavky se vzorky musí být zakryty novou čistou plastovou nebo fóliovou bariérou.
3. Pokud je třeba testované vzorky zmrazit nebo přepravit, odstraňte ze zkumavky na vzorek propichovací uzávěr a nahraďte jej novým nepropichovacím uzávěrem. Pokud je třeba vzorky přepravit k testování v jiném zařízení, musí být zachovány specifikované teploty. Před odzátkováním dříve testovaných a znovu uzavřených vzorků je třeba zkumavku na vzorek odstředovat po dobu 5 minut při relativní odstředivé síle (RCF) 420, aby veškerá kapalina stekla až na dno zkumavky.

**Poznámka:** Vzorky musí být přepravovány v souladu s příslušnými národními a mezinárodními předpisy o přepravě.



## Systémy DTS

Reagencie pro Aptima HPV Assay pro systémy DTS jsou uvedeny níže. Vedle jednotlivých názvů reagentů jsou také uvedeny identifikační symboly reagentů.

### Dodávané reagenty a materiály

**Poznámka:** Informace o H-větech a P-větech, které mohou být spojeny s reagenty, naleznete v knihovně bezpečnostních listů (Safety Data Sheet Library) na adrese [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

**Souprava Aptima HPV Assay**, 100 testů, kat. č. 302610 (4 krabice)

Kalibrátory a kontroly lze zakoupit samostatně. Viz katalogová čísla jednotlivých krabic níže.

#### Chladicí box Aptima HPV

(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>A</b>	<b>Amplifikační reagenty HPV</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% objemového činidla.</i>	1 lahvička
<b>E</b>	<b>Enzymová reagenty HPV</b> <i>Reverzní transkriptáza a RNA polymeráza vysušená v HEPES pufovaném roztoku s obsahem &lt; 10% objemové reagenty.</i>	1 lahvička
<b>P</b>	<b>Reagenty sondy HPV</b> <i>Neinfekční chemoluminiscenční DNA sondy (&lt; 500 ng/lahvičku) vysušené v sukcinátem pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička
<b>IC</b>	<b>Reagenty vnitřní kontroly HPV</b> <i>Neinfekční transkripce RNA pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička

#### Box s pokojovou teplotou Aptima HPV

(po přijetí skladujte při teplotě 15 až 30 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>AR</b>	<b>Rekonstituční roztok pro amplifikaci HPV</b> <i>Vodný roztok obsahující konzervační látky.</i>	1 lahvička
<b>ER</b>	<b>Rekonstituční roztok pro enzymy HPV</b> <i>Roztok pufovaný HEPES obsahující surfaktant a glycerol.</i>	1 lahvička
<b>PR</b>	<b>Rekonstituční roztok pro sondy HPV</b> <i>Sukcinátem pufovaný roztok s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička
<b>S</b>	<b>Selekční reagenty HPV</b> <i>600 mM boritanem pufovaného roztoku s obsahem surfaktantu.</i>	1 lahvička
<b>TCR</b>	<b>Reagenty pro zachycení cíle HPV</b> <i>Neinfekční nukleová kyselina v pufovaném roztoku s obsahem pevné fáze (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1 lahvička
	<b>Uzavírací karty</b>	1 balení
	<b>Rekonstituční objímky</b>	3

**Krabice s kalibrátory Aptima HPV (kat. č. 302554)**  
(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>PCAL</b>	<b>Pozitivní kalibrátor HPV</b> <i>Neinfekční HPV 16 in vitro transkript při 1000 kopiích/ml v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček
<b>NCAL</b>	<b>Negativní kalibrátor HPV</b> <i>Pufovaný roztok s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček

**Krabice s kontrolami Aptima HPV (kat. č. 302556)**  
(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>PC</b>	<b>Pozitivní kontrola HPV</b> <i>Lyzované, inaktivované HPV negativní a HPV pozitivní kultivované buňky při 25 buňkách na ml v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček
<b>NC</b>	<b>Negativní kontrola HPV</b> <i>Lyzované, inaktivované HPV negativní kultivované buňky v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček

**Potřebný materiál, který se dodává zvlášť**

***Poznámka:** Materiály dostupné u společnosti Hologic mají uvedeno katalogové číslo, není-li specifikováno jinak.*

	<u>Kat. č.</u>
Luminometr Leader™ HC+	104747
Systém zachycení cíle Hologic (TCS)	104555
2 třepačky se suchým teplem/vortexové třepačky SB100	105524F
Souprava Aptima Auto Detect	301048C
Souprava kapalin pro test Aptima	302002C
Mikropipetor, 1000 µl RAININ PR1000	104216
2 opakovací pipetory eppendorf Repeater Plus	105725
Špičky pro opakovací pipetory (2,5 ml, 5,0 ml, 25,0 ml)	–
Špičky, 1000 µl P1000	105049
<i>Špičky se speciálním průměrem jsou k dispozici pouze u Hologic</i>	
Jednotky deseti zkumavek (TTU)	TU0022
Stojan na TTU	104579
Kazety s deseti špičkami (TTC)	104578
Souprava pro transport vzorků Aptima	301154C
Souprava pro odběr a transport cervikálních vzorků Aptima	302657
Bělidlo, minimálně 5% nebo 0,7 M roztok chlornanu sodného	–
Jednorázové rukavice	–
Propichovací uzávěry Aptima	105668
Náhradní nepropichovací uzávěry	103036A

**Volitelné materiály**

	<u>Kat. č.</u>
Nástroj TECAN Freedom EVO 100/4	900932
Sestava podložky Aptima, DTS 800	105200
Špičky, 1000 µl vodivé, detekující kapalinu	10612513 (Tecan)
Nádržka na reagentie (40 ml čtvrtkový modul)	104765
Rozdělená nádržka na reagentie (19 ml × 2 čtvrtkový modul)	901172
Přídavek do bělidla pro čištění	302101

**Testovací postup systémů DTS****A. Příprava pracovní plochy/zařízení**

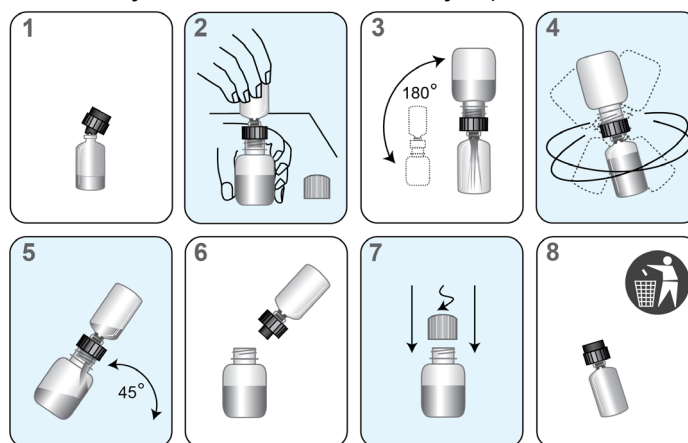
1. Před zahájením testu otřete pracovní povrchy a pipety 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte v kontaktu s povrchy a pipety po dobu minimálně 1 minuty a pak opláchněte vodou. Tento roztok nenechte zaschnout. Pracovní plochu, na níž bude test proveden, pokryjte čistým absorpčním laboratorním potahem na pracovní desky, který je na spodní straně potažen plastem.
2. Do systému pro zachycení cíle (TCS) umístěte dostatečný počet kazet s deseti špičkami. Ujistěte se, že je promývací láhev TCS naplněna promývacím roztokem a že je aspirační potrubí připojeno k vakuovému čerpadlu. Viz *Návod k obsluze systému pro zachycení cíle*.
3. Přístroj TECAN Freedom EVO připravte podle pokynů v návodu k obsluze a aplikačním listu HPV.
4. Preamplifikační přístroj SB100 připravte podle pokynů v návodu k obsluze a aplikačním listu HPV. Zapněte přístroj a spusťte protokol „APTIMA HPV PREAMP“, aby se přístroj zahřál na teplotu 62 °C.
5. Po dokončení kroku amplifikace připravte postamplifikační přístroj SB100 podle pokynů v návodu k obsluze a aplikačním listu HPV. Zapněte přístroj a spusťte protokol „APTIMA HPV PSTAMP“, aby se přístroj zahřál na teplotu 62 °C.
6. Po dokončení kroku amplifikace připravte luminometr Leader HC+ podle pokynů v návodu k obsluze po přidání reagentie sondy, jak je popsáno v krocích po amplifikaci.

**B. Rekonstituce reagentií/Příprava nové soupravy**

**Poznámka:** *Rekonstituce reagentie musí být provedena před zahájením přenosu vzorku.*

1. Chcete-li rekonstituovat Aptima HPV amplifikační, enzymatické reagentie a reagentie sondy, zkombinujte lahvičky lyofilizované reagentie s rekonstitučním roztokem. V případě uložení v chladničce nechte rekonstituované roztoky před použitím dosáhnout pokojové teploty:
  - a. Příslušný rekonstituční roztok spárujte s lyofilizovanou reagentií. Před připevněním rekonstituční objímky zkontrolujte, že rekonstituční roztok i lyofilizovaná reagentie mají shodné barevné kódy.
  - b. Otevřete lahvičku s lyofilizovanou reagentií a pevně zasuňte konec rekonstituční objímky s drážkou do otvoru v lahvičce (obrázek 1, krok 1).
  - c. Otevřete odpovídající lahvičku rekonstitučního roztoku a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch.
  - d. Držte lahvičku s rekonstitučním roztokem na pracovní desce a pevně zasuňte druhý konec rekonstituční objímky do láhve (obrázek 1, krok 2).

- e. Sestavenou láhev a lahvičku pomalu převraťte. Nechte roztok vytéct z láhve do skleněné lahvičky (obrázek 1, krok 3).
- f. Jemně roztokem v lahvičce zakružte, aby se promíchal. Při kroužení lahvičkou zamezte vzniku pěny (obrázek 1, krok 4).
- g. Počkejte, až se lyofilizovaná reagensie rozpustí v roztoku, a pak převraťte sestavenou láhev s lahvičkou ještě jednou nakloněním v úhlu 45°, aby se minimalizoval vznik pěny (obrázek 1, krok 5). Veškerou kapalinu nechte natéct zpět do láhve.
- h. Odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (obrázek 1, krok 6).
- i. Plastovou láhev znovu uzavřete. Zaznamenejte iniciály laboranta a datum rekonstituce na lahvičce s rekonstituovanými reagensii (obrázek 1, krok 7).
- j. Rekonstituční objímku a lahvičku zlikvidujte (obrázek 1, krok 8).



**Obrázek 1. Rekonstituční proces v systémech DTS**

2. Příprava pracovní reagensie zachycení cíle (wTCR)
  - a. Spárujte odpovídající lahvičky s TCR a IC.
  - b. Otevřete odpovídající lahvičku TCR a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch.
  - c. Otevřete lahvičku IC a celý obsah nalijte do láhve TCR. V láhvi IC může zůstat malé množství kapaliny.
  - d. Uzavřete lahvičku TCR a roztokem jemně kroužte, aby se obsah důkladně promíchal. Během tohoto kroku zamezte vzniku pěny.
  - e. Na štítek zaznamenejte iniciály laboranta a aktuální datum.
  - f. Lahvičku IC a uzávěr zlikvidujte.
  - g. Ve wTCR se mohou vytvořit precipitáty. Precipitát lze rozpustit zahříváním wTCR při teplotě mezi 42 a 60 °C po dobu až 90 minut. Před použitím wTCR vyčkejte, dokud se jeho teplota nevyrovná s pokojovou teplotou.
3. Příprava selekční reagensie

Pokud selekční reagensie obsahuje precipitát, zahřívajte selekční reagensii při teplotě  $60 \pm 1$  °C po dobu až 45 minut, abyste usnadnili rozpuštění precipitátu. Lahvičku jemně promíchejte každých 5 až 10 minut. Před použitím selekční reagensie vyčkejte, dokud se její teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nebo zakalení nezmizí.

### C. Příprava reagensií pro dříve rekonstituované reagensie

1. Dříve rekonstituované amplifikační a enzymatické reagensie a reagensie sondy musí před zahájením testu dosáhnout pokojové teploty (15 až 30 °C).
2. Pokud rekonstituovaná reagensie sondy obsahuje precipitát, který se při pokojové teplotě nevrací do roztoku, zahřívějte ji při teplotě, která nepřekročí 60 °C, po dobu 1 až 2 minut. Každou reagensii po opětovném rozpuštění promíchejte jemným převrácením. Nepoužívejte, pokud je přítomen precipitát nebo zakalení.
3. Pokud wTCR obsahuje precipitát, zahřívějte wTCR při teplotě 42 až 60 °C po dobu až 90 minut. Před použitím wTCR vyčkejte, dokud se jeho teplota nevyrovná s pokojovou teplotou.
4. Pokud selekční reagensie obsahuje precipitát, zahřívějte selekční reagensii při teplotě  $60 \pm 1$  °C po dobu až 45 minut, abyste usnadnili rozpuštění precipitátu. Lahvičku jemně promíchejte každých 5 až 10 minut. Před použitím selekční reagensie vyčkejte, dokud se její teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nebo zakalení nezmizí.
5. Každou reagensii před použitím důkladně promíchejte jemným převrácením. Při převrácení reagensií zabraňte vzniku pěny.

### D. Příprava stojanu

1. Před zpracováním nechte vzorky (kalibrátory, kontroly a vzorky) dosáhnout pokojové teploty.
2. Vzorky nemíchejte ve vortexové třepačce.
3. Než propíchnete zkumavky se vzorky, zkontrolujte je. Pokud zkumavka se vzorkem obsahuje bubliny nebo má vzorek menší objem než obvykle, odstředějte zkumavku po dobu 5 minut při 420 RCF, abyste zajistili, že v uzávěru není žádná kapalina.

**Poznámka:** Pokud nedodržíte krok 3, může to způsobit únik tekutiny z uzávěru zkumavky se vzorkem.

4. Do stojanu TTU umístěte dostatek jednotek TTU pro kalibrátory, kontroly a vzorky.
5. (Volitelné) Pokud je potřebný pracovní seznam, vytvořte ho pomocí softwaru Aptima Worklist Editor. Konkrétní pokyny najdete v části Worklist Editor v *návodu k obsluze softwaru testu Aptima*.

#### Volitelné ruční pipetování

1. Důkladně promíchejte wTCR (TCR s IC). Do každé reakční zkumavky přidejte pomocí opakovacího pipetoru 100 µl wTCR.
2. Pomocí mikropipetoru propíchněte uzávěr zkumavky se vzorkem a dávejte pozor, abyste špičkou mikropipetoru nenarazili do dna zkumavky.
3. Pro každý kalibrátor, vzorek a kontrolu používejte novou pipetovací špičku.
4. Do prvních tří zkumavek v první TTU přidejte 400 µl negativního kalibrátoru.
5. Do 4. až 6. zkumavky v první TTU přidejte 400 µl pozitivního kalibrátoru.
6. Do 7. zkumavky v první TTU přidejte 400 µl negativní kontroly.
7. Do 8. zkumavky v první TTU přidejte 400 µl pozitivní kontroly.
8. Do zbývajících zkumavek přidejte po 400 µl vzorku.
9. Po dokončení pipetování všech vzorků zakryjte všechny TTU uzavíracími kartami a pokračujte zachycením cíle.

#### Volitelný přístroj TECAN Freedom EVO

Specifické pokyny k přidání wTCR a vzorků pomocí tohoto přístroje najdete v dokumentu *Aplikační list přístroje TECAN Freedom EVO 100/4 pro Aptima HPV Assay*.

## E. Zachycení cíle

Podrobné informace o použití třepačky SB100 s Aptima HPV Assay najdete v dokumentu *Aplikační list třepačky se suchým teplem/vortexové třepačky SB100 pro Aptima HPV Assay*.

Informace o použití systému záchytu cíle Hologic najdete v *návodu k obsluze systému Target Capture (zachycení cíle)*.

**Poznámka:** *Opakovací pipetor používaný k zachycení cíle a amplifikaci musí být vyhrazen pro použití pouze v těchto krocích. Další informace viz část Testovací postup systému Tigris DTS.*

1. Uzavírací karty zakryjte pomocí rámu SB100.
2. Jakmile třepačka SB100 dosáhne teploty 62 °C, uchopte společně rám a stojan, abyste zaručili zajištění TTU na místě ve stojanu, a vložte stojan do ohřívacího bloku. Dbejte, aby obsah nepotřísnil uzavírací karty. Otáčejte černými knoflíky, dokud ložiska nezapadnou do otvorů v rámu.
3. Program spusťte stisknutím příslušného tlačítka.
4. Po dokončení poslední inkubace na výzvu na displeji třepačky SB100 jemně vyjměte stojan z ohřívacího bloku. Dbejte, aby obsah nepotřísnil uzavírací karty.
5. Stojan umístěte na magnetickou základnu systému zachycení cíle (TCS) po dobu 5 až 10 minut. Proveďte následující kroky promývání:
  - a. Naplňte čerpadlo stanice k vydání vzorku načerpáním promývacího roztoku do dávkovacího potrubí. Načerpejte do celého systému dostatek kapaliny, aby se v potrubí nevytvořily žádné vzduchové bubliny a aby všech 10 trysek dodávalo stabilní proud kapaliny.
  - b. Zapněte vakuové čerpadlo a odpojte aspirační potrubí na prvním konektoru mezi potrubím a záchytnou láhví. Ujistěte se, že měřič podtlaku splňuje specifikaci zkoušky těsnosti. Dosažení této hodnoty může trvat 15 sekund. Potrubí znovu spojte a ujistěte se, že měřič podtlaku splňuje specifikaci úrovně vakua. Nechte podtlakové čerpadlo zapnuté, dokud nejsou dokončeny všechny kroky zachycení cíle a dokud není aspirační potrubí suché.
  - c. Pevně připojte aspirační potrubí k první soupravě špiček. Aspirujte veškerou kapalinu spuštěním špiček do první TTU, dokud nedojde ke krátkému kontaktu špiček se dny zkumavek. Špičky držte tak, aby se nedotýkaly dna zkumavek.
  - d. Po dokončení aspirace vysuňte špičky do jejich původní kazety na špičky. Kroky aspirace opakujte pro ostatní TTU, pro každý vzorek použijte samostatnou špičku.
  - e. Umístěte dávkovací potrubí nad každou TTU a pomocí čerpadla stanice k vydání vzorku naplňte každou zkumavku v TTU 1,0 ml promývacího roztoku.
  - f. Zkumavky zakryjte uzavírací kartou a vyjměte zásobník z TCS.
6. Uzavírací karty zakryjte rámem SB100 a ten umístěte na ohřívací blok SB100. Stisknutím příslušného tlačítka spusťte protřepání zkumavek. Po dokončení protřepání stojan vyjměte.
7. Stisknutím příslušného tlačítka na třepačce SB100 pokračujte předehrátím bloku.
8. Postavte stojan zpět na TCS a opakujte kroky aspirace v bodech 5c a 5d výše.
9. Po poslední aspiraci vyjměte stojan z magnetické základny TCS, vizuálně zkontrolujte zkumavky a ujistěte se, že byla aspirována veškerá kapalina a že všechny zkumavky obsahují pelety magnetických částic. Pokud je viditelná jakákoli kapalina, umístěte stojan zpět na základnu TCS po dobu 2 minut a opakujte aspiraci pro danou TTU pomocí stejných špiček použitých dříve pro každý vzorek.
10. Pokračujte krokem amplifikace.

## F. Amplifikace

1. Přidejte amplifikační reagensii a olejovou reagensii.

## Volitelné ruční pipetování

- a. Do každé reakční zkumavky přidejte pomocí opakovacího pipetoru 75 µl rekonstituované amplifikační reagensie. Všechny reakční směsi ve stojanu by měly být červené.
- b. Opakovacím pipetorem přidejte 200 µl olejové reagensie.
- c. Zkumavky zakryjte uzavíracími kartami.
- d. Přejděte k bodu 2.

## Volitelný přístroj TECAN Freedom EVO

Specifické pokyny k přidání amplifikační a olejové reagensie pomocí tohoto přístroje najdete v dokumentu *Aplikační list přístroje TECAN Freedom EVO 100/4 pro Aptima HPV Assay*.

2. Uzavírací karty zakryjte rámem SB100 a stojan umístěte na ohřívací blok.
3. Inkubaci spustíte stisknutím příslušného tlačítka.
4. Na výzvu vyjměte rám SB100. Odeberte a zlikvidujte uzavírací karty a pomocí opakovacího pipetoru přidejte 25 µl rekonstituované enzymové reagensie, zatímco stojan je stále v ohřívacím bloku.
5. Zkumavky zakryjte novými uzavíracími kartami a pomocí rámu SB100.
6. Inkubaci amplifikace spustíte stisknutím příslušného tlačítka.
7. Po dokončení kroku inkubace vyjměte stojan z třepačky SB100 a pokračujte poamplifikačním krokem.

## G. Po amplifikaci

Zapněte poamplifikační třepačku SB100 a spustíte protokol „APTIMA HPV PSTAMP“, aby se přístroj zahřál na teplotu 62 °C.

Specifické informace o použití nástroje SB100 s Aptima HPV Assay najdete v dokumentu *Aplikační list třepačky se suchým teplem/vortexové třepačky SB100 pro Aptima HPV Assay*.

**Poznámka:** Opakovací pipetor používaný k detekci musí být vyhrazen pro použití pouze v těchto krocích. Viz část *Varování a bezpečnostní opatření*.

**Poznámka:** Kroky po amplifikaci je třeba provést na jiném místě, než kde probíhají přípravy reagensie a kroky před amplifikací. Viz část *Poznámky k postupům*.

1. Sejměte a zlikvidujte uzavírací karty.
2. Do každé reakční zkumavky přidejte pomocí opakovacího pipetoru 100 µl rekonstituované reagensie sondy. Všechny reakční směsi by měly být žluté.
3. Zkumavky zakryjte uzavíracími kartami a rámem SB100 a stojan umístěte na ohřívací blok.
4. Kroky protřepání/inkubace spustíte stisknutím příslušného tlačítka.
5. Po dokončení kroku inkubace vyjměte stojan a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Nezapomeňte stisknutím příslušné klávesy na klávesnici SB100 spustit dobu inkubace.
6. Po uplynutí 5 minut, jak je zobrazeno na displeji SB100, pomocí opakovacího pipetoru přidejte do každé reakční zkumavky 250 µl selekční reagensie. Všechny reakční směsi by měly být růžové.

7. Zkumavky zakryjte uzavíracími kartami a rámem SB100 a stojan umístěte na ohřívací blok. Kroky protřepání/inkubace spusťte stisknutím příslušného tlačítka.
8. Po dokončení kroku inkubace vyjměte stojan z třepačky SB100 a pokračujte krokem detekce.

#### H. Detekce

1. Krok detekce musí být proveden při teplotě 18 až 28 °C.
2. Ujistěte se, že máte k dispozici dostatečný objem reagentů Auto Detect 1 a Auto Detect 2 k dokončení testů.
3. Připravte luminometr Leader HC+ umístěním jedné prázdné TTU do pozice kazety číslo 1 a provedením protokolu promývání. Specifické pokyny najdete v *návodu k obsluze luminometru Leader HC+*.
4. Vložte TTU do luminometru.
5. Přihlaste se do softwaru testu Aptima pro HPV. Pokud byl vytvořen pracovní seznam, ujistěte se, že je příslušná cesta aktivní, aby mohl software Aptima HPV Assay vyhledat správný pracovní seznam.
6. Klepněte na **NOVÝ CYKLUS**. Pokud nebyl pracovní seznam vytvořen, zadejte počet zkumavek (kalibrátorů, kontrol a vzorků). Cyklus spusťte klepnutím na **DALŠÍ**.

**Poznámka:** *Cyklus musí být dokončen do 2 hodin od konce inkubace selekčního kroku.*

7. Připravte deaktivující kapalinu smícháním stejných objemů 5% až 7% (0,7 M až 1,0 M) roztoku chlornanu sodného a pufru Aptima pro deaktivující kapalinu v plastové nádobě s velkým uzávěrem. Na plastovou nádobu přilepte štítek a zapište datum expirace. Deaktivující kapalina je stabilní 4 týdny při pokojové teplotě.
8. Po vyjmutí použitých TTU z luminometru umístěte tyto TTU do nádoby s deaktivující kapalinou. Před likvidací nechte TTU uložené v nádobě po dobu 15 minut. Vedoucí laboratoře stanovuje náležitě metody manipulace a likvidace.

### Poznámky k postupům

#### A. Kalibrátory

Každý cyklus až se 100 testy musí obsahovat po třech replikátech negativního kalibrátoru a pozitivního kalibrátoru. Pro správné fungování se softwarem Aptima HPV Assay musí být tři replikáty negativního kalibrátoru následované třemi replikáty pozitivního kalibrátoru umístěny v prvních šesti pozicích první TTU. Umístění v nesprávné pozici způsobí selhání cyklu.

#### B. Kontroly

Každý cyklus až se 100 testy musí obsahovat po jednom replikátu negativního kalibrátoru a pozitivního kalibrátoru. Negativní kontrola musí být ve zkumavce na sedmé pozici následovaná pozitivní kontrolou ve zkumavce na osmé pozici. Umístění v nesprávných pozicích způsobí selhání cyklu.

#### C. Pipetování vzorků

1. Objem vzorku přidaného do reakční zkumavky má být 400  $\mu\text{l}$   $\pm$  100  $\mu\text{l}$ . Je doporučena vizuální kontrola objemu pipetovaného do TTU, která zajistí přenos správného objemu. Správný objem vzorků je nutný k dosažení přesných výsledků. Pokud nebyl pipetován správný objem, opakujte pipetování pracovní reagentie zachycení cíle a vzorku do nové reakční zkumavky.
2. Pečlivě vložte vzorky do každé zkumavky – vyhýbejte se kontaktu s okrajem, abyste minimalizovali možnost přenosu mezi zkumavkami.



## D. Teplota

1. Pokojová teplota je definována jako 15 až 30 °C.
2. Detekce je citlivá na teplotu. Laboratorní teplota v oblasti detekce musí být 18 až 28 °C.

## E. Čas

Reakce zachycení cíle, amplifikace, hybridizace a detekce jsou všechny závislé na čase. Dodržujte časy specifikované v části *Testovací postup systémů DTS*.

## F. Prášek na rukavice

Podobně jako u jiných systémů reagentů může nadbytek talku z některých rukavic způsobit kontaminaci otevřených zkumavek. Doporučují se rukavice bez talku.

## G. Dekontaminace

1. Laboratorní pracovní povrchy a pipetory musí být pravidelně dekontaminovány pomocí 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného. Roztok nechte v kontaktu s povrchy po dobu minimálně 1 minuty a pak opláchněte vodou. Tento roztok nenechte zaschnout. Chlorové roztoky mohou způsobit na zařízení a kovu důlkovou korozi. Důkladně opláchněte zařízení vodou, abyste předešli vzniku koroze.
2. Dekontaminujte přístroj TECAN Freedom EVO podle pokynů v příručce obsluhy.
3. Přístroje SB100 dekontaminujte podle pokynů v dokumentu *Aplikační list třepačky se suchým teplem/vortexové třepačky SB100 pro Aptima HPV Assay*.
4. Systém zachycení cíle dekontaminujte podle pokynů v *návodu k obsluze systému Target Capture (zachycení cíle)*.
5. Povrchy jednotky TCS a špičky ejektoru promývacího pufru otřete papírovými utěrkami navlhčenými v 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného. Následně je opláchněte vodou a potom povrchy důkladně osušte papírovými utěrkami.
6. Stojany TTU ponořte do 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztoku chlornanu sodného, abyste měli jistotu, že jsou zcela pokryté roztokem. Stojany nechte ponořené po dobu 10 minut. Delší působení by mohlo stojany poškodit. Stojany důkladně opláchněte vodou, položte je na čistou absorpční utěrku a nechte je důkladně vyschnout na vzduchu. Chcete-li prodloužit životnost stojanů, nenechte je schnout vzhůru nohama.
7. TTU musí být dekontaminována deaktivací kapalinou podle popisu v kroku Detekce. TTU nepoužívejte opakovaně.

## Systém Tigris DTS

Reagencie pro Aptima HPV Assay pro systém Tigris DTS jsou uvedeny níže. Vedle jednotlivých názvů reagentů jsou také uvedeny identifikační symboly reagentů.

### Dodávané reagenty a materiály

**Souprava Aptima HPV Assay, 250 testů, kat. č. 302611 (4 krabice)**

Kalibrátory a kontroly lze zakoupit samostatně. Viz katalogová čísla jednotlivých krabic níže.

#### Chladicí box Aptima HPV

(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>A</b>	<b>Amplifikační reagenty HPV</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufrovaném roztoku s obsahem &lt; 5% objemového činidla.</i>	1 lahvička
<b>E</b>	<b>Enzymová reagenty HPV</b> <i>Reverzní transkriptáza a RNA polymeráza vysušené v HEPES pufrovaném roztoku s obsahem &lt; 10% objemové reagenty.</i>	1 lahvička
<b>P</b>	<b>Reagenty sondy HPV</b> <i>Neinfekční chemoluminiscenční DNA sondy (&lt; 500 ng/lahvičku) vysušené v sukcinátem pufrovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička
<b>IC</b>	<b>Reagenty vnitřní kontroly HPV</b> <i>Neinfekční transkripcí RNA pufrovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička

#### Box s pokojovou teplotou Aptima HPV

(po přijetí skladujte při teplotě 15 až 30 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>AR</b>	<b>Rekonstituční roztok pro amplifikaci HPV</b> <i>Vodný roztok obsahující konzervační látky.</i>	1 lahvička
<b>ER</b>	<b>Rekonstituční roztok pro enzymy HPV</b> <i>Roztok pufrovaný HEPES obsahující surfaktant a glycerol.</i>	1 lahvička
<b>PR</b>	<b>Rekonstituční roztok pro sondy HPV</b> <i>Sukcinátem pufrovaný roztok s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička
<b>S</b>	<b>Selekční reagenty HPV</b> <i>600 mM boritanem pufrovaného roztoku s obsahem surfaktantu.</i>	1 lahvička
<b>TCR</b>	<b>Reagenty pro zachycení cíle HPV</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny v pufrovaném roztoku s obsahem pevné fáze (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1 lahvička
	<b>Rekonstituční objímky</b>	3
	<b>List s čárovým kódem hlavní šarže</b>	1 list

**Krabice s kalibrátory Aptima HPV (kat. č. 302554)**  
(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
PCAL	<b>Pozitivní kalibrátor HPV</b> <i>Neinfekční HPV 16 in vitro transkript při 1000 kopiích/ml v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček
NCAL	<b>Negativní kalibrátor HPV</b> <i>Pufovaný roztok s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček

**Krabice s kontrolami Aptima HPV (kat. č. 302556)**  
(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
PC	<b>Pozitivní kontrola HPV</b> <i>Lyzované, inaktivované HPV negativní a HPV pozitivní kultivované buňky při 25 buňkách na ml v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček
NC	<b>Negativní kontrola HPV</b> <i>Lyzované, inaktivované HPV negativní kultivované buňky v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček

**Potřebný materiál, který se dodává zvlášť**

*Poznámka: Materiály dostupné u Hologic mají uvedeno katalogové číslo, není-li specifikováno jinak.*

	<u>Kat. č.</u>
Systém Tigris DTS	105118
Souprava kapalin pro test Aptima <i>(Promývací roztok Aptima, pufr Aptima pro deaktivční kapalinu a olejová reagentie Aptima)</i>	302382
Souprava Aptima Auto Detect	301048
Souprava konzervačních roztoků systému Aptima	302380
Špičky, 1000 µl vodivé, detekující kapalinu	10612513 (Tecan)
Souprava cyklu systému Tigris DTS	301191
<i>Jednotky pro více zkumavek (MTU)</i>	104772-02
<i>Odpadní vak na mikrošpičky MTU</i>	900907
<i>Odvaděče odpadu MTU</i>	900931
<i>Kryty pro odpadní MTU</i>	105523
Souprava pro transport vzorků Aptima	301154C
Souprava pro odběr a transport cervikálních vzorků Aptima	302657
Propichovací uzávěry Aptima	105668
Náhradní nepropichovací uzávěry	103036A
Náhradní uzávěry pro rekonstituční roztoky amplifikační reagentie a reagentií sondy	CL0041
Náhradní uzávěry pro rekonstituční roztoky enzymových reagentií	501616
Náhradní uzávěry pro TCR a selekční reagentie	CL0040
Bělidlo, minimálně 5% nebo 0,7 M roztok chlornanu sodného	–
Voda pro systém Tigris DTS	–
<i>Specifikace jsou uvedeny v návodu k použití systému Tigris DTS</i>	

Jednorázové rukavice	–
Souprava přepravního roztoku Aptima (pouze pro vzorky SurePath)	303658

## Volitelné materiály

	<u>Kat. č.</u>
Přídavek do bělidla pro čištění	302101

## Testovací postup systému Tigris DTS

**Poznámka:** Další informace o postupech v systému Tigris DTS najdete v návodu k obsluze systému Tigris DTS.

### A. Příprava pracovní plochy

Očistěte pracovní plochy, kde bude probíhat příprava reagensů a vzorků. Pracovní plochy otřete 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte v kontaktu s povrchy po dobu minimálně 1 minuty a pak opláchněte vodou. Roztok chlornanu sodného nenechte zaschnout. Pracovní plochu, na níž bude probíhat příprava reagensů a vzorků, pokryjte čistým absorpčním laboratorním potahem na pracovní desky, který je na spodní straně potažen plastem.

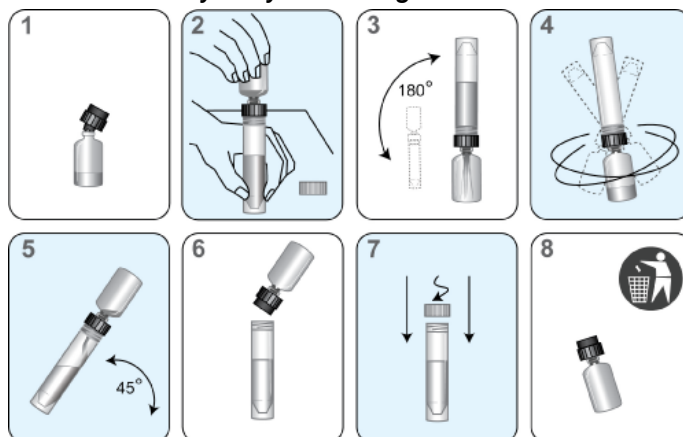
### B. Příprava reagensie nové soupravy

**Poznámka:** Před zahájením veškerých prací se systémem Tigris DTS se musí provést rekonstituce reagensie.

1. Chcete-li rekonstituovat amplifikační reagensie, enzymatické reagensie a reagensie sondy, zkombinujte lahvičky lyofilizované reagensie s rekonstitučním roztokem. V případě uložení v chladničce nechte rekonstituované roztoky před použitím dosáhnout pokojové teploty:
  - a. Příslušný rekonstituční roztok spárujte s lyofilizovanou reagensií. Před připevněním rekonstituční objímky zkontrolujte, že rekonstituční roztok i lyofilizovaná reagensie mají shodné barevné kódy.
  - b. Zkontrolujte čísla šarží na listu s čárovým kódem hlavní šarže a zajistěte, aby byly odpovídající reagensie spárovány.
  - c. Otevřete lahvičku s lyofilizovanou reagensií a pevně zasuňte konec rekonstituční objímky s drážkou do otvoru v lahvičce (Obrázek 2, krok 1).
  - d. Otevřete odpovídající rekonstituční roztok a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch.
  - e. Držte lahvičku s rekonstitučním roztokem na pracovní desce a pevně zasuňte druhý konec rekonstituční objímky do hrdla láhve (Obrázek 2, krok 2).
  - f. Sestavenými lahvemi pomalu otáčejte. Nechte roztok vytéct z láhve do skleněné lahvičky (Obrázek 2, krok 3).
  - g. Jemně roztokem v lahvi zakružte, aby se promíchal. Při kroužení lahví zamezte vzniku pěny (Obrázek 2, krok 4).
  - h. Počkejte, až se lyofilizovaná reagensie rozpustí v roztoku, a pak převraťte sestavené lahve ještě jednou nakloněním v úhlu 45°, aby se minimalizoval vznik pěny (Obrázek 2, krok 5). Veškerou kapalinu nechte natéct zpět do plastové láhve.
  - i. Odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 2, krok 6).
  - j. Plastovou láhev znovu uzavřete. Zaznamenejte iniciály laboranta a datum rekonstituce na všech lahvičkách s rekonstituovanou reagensií (Obrázek 2, krok 7).

k. Rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku zlikvidujte (Obrázek 2, krok 8).

**Varování:** Při provádění rekonstituce reagensů zabraňte tvorbě pěny. Pěna narušuje mechanismus detekce hladiny v systému Tigris DTS.



**Obrázek 2. Rekonstituční proces v systému Tigris DTS**

2. Připravte pracovní reagensii zachycení cíle (wTCR):
  - a. Spárujte odpovídající lahvičky s TCR a IC.
  - b. Zkontrolujte čísla šarží reagensie na listu s čárovým kódem hlavní šarže a zajistěte, aby byly odpovídající reagensie v soupravě spárovány.
  - c. Otevřete odpovídající lahvičku TCR a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch.
  - d. Otevřete lahvičku IC a celý obsah nalijte do lahve TCR. Očekávejte, že v lahvi IC může zůstat malé množství kapaliny.
  - e. Uzavřete lahvičku TCR a roztokem jemně kružte, aby se obsah promíchal. Během tohoto kroku zamezte vzniku pěny.
  - f. Na štítek zaznamenejte iniciály laboranta a aktuální datum.
  - g. Lahvičku IC a uzávěr zlikvidujte.
  - h. Ve wTCR se mohou vytvořit precipitáty, které mohou vést k neplatným výsledkům způsobeným chybami ověřování objemu. Precipitát lze rozpustit zahříváním wTCR při teplotě 42 až 60 °C po dobu až 90 minut. Před použitím wTCR vyčkejte, dokud se jeho teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nezmizí.
3. Připravte selekční reagensii:
  - a. Zkontrolujte číslo šarže reagensie na listu s čárovým kódem hlavní šarže a ověřte, že patří do soupravy.
  - b. Pokud selekční reagensie obsahuje precipitát, zahřívajte selekční reagensii při teplotě 60 ± 1 °C po dobu až 45 minut, abyste usnadnili rozpuštění precipitátu. Lahvičku jemně promíchejte každých 5 až 10 minut. Před použitím selekční reagensie vyčkejte, dokud se její teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nebo zakalení nezmizí.

**Poznámka:** Všechny reagensie před založením do systému důkladně promíchejte jemným převrácením. Při převrácení reagensů zabraňte vzniku pěny.

### C. Příprava reagensů pro dříve rekonstituované reagensie

1. Dříve rekonstituované amplifikační a enzymatické reagensie a reagensie sondy musí před zahájením testu dosáhnout pokojové teploty (15 až 30 °C).

2. Pokud rekonstituovaná reagencie sondy obsahuje precipitát, který se při pokojové teplotě nevrací do roztoku, zahřívejte ji při teplotě, která nepřekročí 60 °C, po dobu 1 až 2 minut. Nepoužívejte, pokud je přítomen precipitát nebo zakalení.
3. Pokud wTCR obsahuje precipitát, zahřívejte wTCR při teplotě 42 až 60 °C po dobu až 90 minut. Před použitím wTCR vyčkejte, dokud se jeho teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nezmizí.
4. Pokud selekční reagencie obsahuje precipitát, zahřívejte selekční reagencii při teplotě  $60 \pm 1$  °C po dobu až 45 minut, abyste usnadnili rozpuštění precipitátu. Lahvičku jemně promíchejte každých 5 až 10 minut. Před použitím selekční reagencie vyčkejte, dokud se její teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nebo zakalení nezmizí.
5. Každou reagencii před založením do systému důkladně promíchejte jemným převrácením. Při převrácení reagencí zabraňte vzniku pěny.
6. Láhve s reagenciami nedoplňujte. Systém Tigris DTS rozpozná láhve, které byly doplněny, a zamítne je.

#### D. Manipulace se vzorky

1. Před zpracováním nechte vzorky (kalibrátory, kontroly a vzorky) dosáhnout pokojové teploty.
2. **Vzorky nemíchejte ve vortexové třepačce.**
3. Před testováním pomocí testu Aptima HV je třeba vzorky v konzervačním roztoku SurePath ošetřit pomocí proteinázy K podle pokynů v části *Odběr a uchování vzorku C*.
4. Zkumavky na vzorky před založením do stojanů zkontrolujte. Pokud zkumavka se vzorkem obsahuje bubliny nebo má vzorek menší objem než obvykle, odstředujte zkumavku po dobu 5 minut při 420 RCF, abyste zajistili, že v uzávěru není žádná kapalina.

**Poznámka:** Pokud nedodržíte krok 4, může to způsobit únik tekutiny z uzávěru zkumavky se vzorkem.

#### E. Příprava systému

Nastavte přístroj a pracovní seznam podle pokynů v *návodu k obsluze systému Tigris DTS* a v části *Poznámky k postupům* níže.

## Poznámky k postupům

#### A. Kalibrátory

1. Každý pracovní seznam musí obsahovat po 3 replikátech negativního kalibrátoru a pozitivního kalibrátoru. Pokud má negativní kalibrátor se softwarem Aptima HPV Assay správně fungovat, musí být ve zkumavce na první pozici v prvním stojanu pracovního seznamu a pozitivní kalibrátor musí být ve zkumavce na druhé pozici v prvním stojanu pracovního seznamu.
2. Snaha odpipetovat více než tři replikáty ze zkumavky s kalibrátorem může způsobit chyby v důsledku nedostatečného objemu.

**B. Kontroly**

1. Software Aptima HPV Assay vyžaduje kontroly začátku a konce cyklu. Negativní kontrola musí být ve zkumavce na třetí pozici v prvním stojanu a ve zkumavce na předposlední pozici v posledním stojanu pracovního seznamu. Pozitivní kontrola musí být ve zkumavce na čtvrté pozici v prvním stojanu a ve zkumavce na poslední pozici v posledním stojanu pracovního seznamu.
2. Pokusy o více než jedno pipetování z kontrolní zkumavky mohou způsobit chyby v důsledku nedostatečného objemu.

**C. Teplota**

Pokožová teplota je definována jako 15 až 30 °C.

**D. Prášek na rukavice**

Podobně jako u jiných systémů reagensů může nadbytek talku z některých rukavic způsobit kontaminaci otevřených zkumavek. Doporučují se rukavice bez talku.

## Systém Panther

Reagencie pro Aptima HPV Assay pro systém Panther jsou uvedeny níže. Vedle jednotlivých názvů reagentů jsou také uvedeny identifikační symboly reagentů.

### Dodávané reagenty a materiály

**Aptima HPV Assay**, 250 testů, kat. č. 303093 (3 krabice)

**Aptima HPV Assay**, 100 testů, kat. č. 302929 (3 krabice)

Kalibrátory lze zakoupit samostatně. Viz katalogová čísla jednotlivých krabic níže.

#### Chladicí box Aptima HPV

(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>A</b>	<b>Amplifikační reagenty HPV</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny vysušené v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% objemového činidla.</i>	1 lahvička
<b>E</b>	<b>Enzymová reagenty HPV</b> <i>Reverzní transkriptáza a RNA polymeráza vysušená v HEPES pufovaném roztoku s obsahem &lt; 10% objemové reagenty.</i>	1 lahvička
<b>P</b>	<b>Reagenty sondy HPV</b> <i>Neinfekční chemoluminiscenční DNA sondy (&lt; 500 ng/lahvičku) vysušené v sukcinátem pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička
<b>IC</b>	<b>Reagenty vnitřní kontroly HPV</b> <i>Neinfekční transkripcí RNA v pufovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1 lahvička

#### Box s pokojovou teplotou Aptima HPV

(po přijetí skladujte při pokojové teplotě, 15 až 30 °C)

Symbol	Složka	Množství
<b>AR</b>	<b>Rekonstituční roztok pro amplifikaci HPV</b> <i>Vodný roztok obsahující konzervační látky.</i>	1
<b>ER</b>	<b>Rekonstituční roztok pro enzymy HPV</b> <i>Roztok pufovaný HEPES obsahující surfaktant a glycerol.</i>	1
<b>PR</b>	<b>Rekonstituční roztok pro sondy HPV</b> <i>Sukcinátem pufovaný roztok s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	1
<b>S</b>	<b>Selektivní reagenty HPV</b> <i>600 mM boritanem pufovaného roztoku s obsahem surfaktantu.</i>	1
<b>TCR</b>	<b>Reagenty pro zachycení cíle HPV</b> <i>Neinfekční nukleové kyseliny v pufovaném roztoku s obsahem pevné fáze (&lt; 0,5 mg/ml).</i>	1
	<b>Rekonstituční objímky</b>	3
	<b>List s čárovým kódem hlavní šarže</b>	1 list



**Krabice s kalibrátory Aptima HPV (kat. č. 302554)**  
(po přijetí skladujte při teplotě 2 až 8 °C)

Symbol	Složka	Množství
PCAL	<b>Pozitivní kalibrátor HPV</b> <i>Neinfekční HPV 16 in vitro transkript při 1000 kopiích/ml v pufrovaném roztoku s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček
NCAL	<b>Negativní kalibrátor HPV</b> <i>Pufrovaný roztok s obsahem &lt; 5% detergentu.</i>	5 lahviček

**Potřebný materiál, který se dodává zvlášť**

*Poznámka: Materiály dostupné u Hologic mají uvedeno katalogové číslo, není-li specifikováno jinak.*

	<u>Kat. č.</u>
Systém Panther	303095
Souprava cyklu systému Panther	303096
<i>Souprava kapalin pro test Aptima</i>	303014
<i>(Promývací roztok Aptima, pufr Aptima pro deaktivční kapalinu a olejová reagentie Aptima)</i>	
<i>Souprava Aptima Auto Detect</i>	303013
<i>Jednotky pro více zkumavek (MTU)</i>	104772-02
<i>Souprava odpadních vaků Panther</i>	902731
<i>Kryt odpadkového koše Panther</i>	504405
Špičky, 1000 µl vodivé, detekující kapalinu	10612513 (Tecan)
Souprava pro transport vzorků Aptima	301154C
Souprava pro odběr a transport cervikálních vzorků Aptima	302657
Propichovací uzávěry Aptima	105668
Náhradní nepropichovací uzávěry	103036A
Náhradní uzávěry pro 250 testovacích souprav:	
<i>Rekonstituční roztoky amplifikačních reagentií a reagentií sondy</i>	CL0041
<i>Rekonstituční roztok enzymových reagentií</i>	501616
<i>TCR a selekční reagentie</i>	CL0040
Náhradní uzávěry pro 100 testovacích souprav:	
<i>Rekonstituční roztoky amplifikačních reagentií a reagentií sondy</i>	CL0041
<i>Rekonstituční roztok enzymových reagentií</i>	CL0041
<i>TCR a selekční reagentie</i>	501604
Bělidlo, minimálně 5% nebo 0,7 M roztok chlornanu sodného	–
Jednorázové rukavice	–
Souprava přepravního roztoku Aptima (pouze pro vzorky SurePath)	303658

**Volitelné materiály**

	<u>Kat. č.</u>
Přídavek do bělidla pro čištění	302101

## Testovací postup systému Panther

**Poznámka:** Další informace o postupech v systému Panther najdete v návodu k obsluze systému Panther.

### A. Příprava pracovní plochy

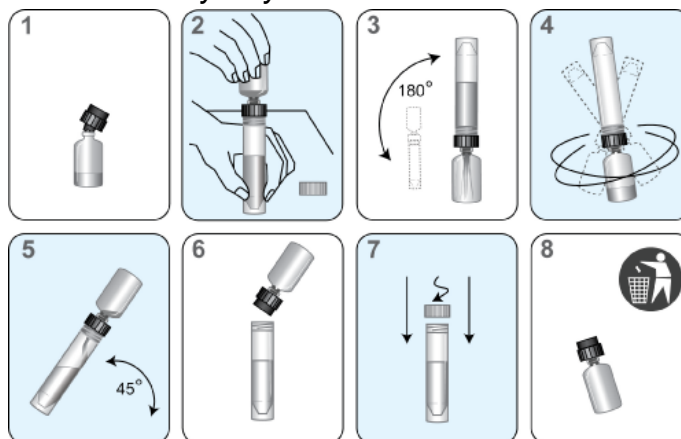
Očistěte pracovní plochy, kde bude probíhat příprava reagensů a vzorků. Pracovní plochy otřete 2,5% až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) roztokem chlornanu sodného. Roztok chlornanu sodného nechte v kontaktu s povrchy po dobu minimálně 1 minuty a pak opláchněte vodou. Roztok chlornanu sodného nenechte zaschnout. Pracovní plochu, na níž bude probíhat příprava reagensů a vzorků, pokryjte čistým absorpčním laboratorním potahem na pracovní desky, který je na spodní straně potažen plastem.

### B. Příprava reagensie nové soupravy

**Poznámka:** Rekonstituce reagensie musí být provedena před zahájením veškerých prací se systémem Panther.

1. Chcete-li rekonstituovat amplifikační reagensie, enzymatické reagensie a reagensie sondy, zkombinujte lahvičky lyofilizované reagensie s rekonstitučním roztokem. V případě uložení v chladničce nechte rekonstituované roztoky před použitím dosáhnout pokojové teploty:
  - a. Příslušný rekonstituční roztok spárujte s lyofilizovanou reagensií. Před připevněním rekonstituční objímky zkontrolujte, že rekonstituční roztok i reagensie mají shodné barevné kódy.
  - b. Zkontrolujte čísla šarží na listu s čárovým kódem hlavní šarže a zajistěte, aby byly odpovídající reagensie spárovány.
  - c. Otevřete lahvičku s lyofilizovanou reagensií a pevně zasuňte konec rekonstituční objímky s drážkou do otvoru v lahvičce (Obrázek 3, krok 1).
  - d. Otevřete odpovídající rekonstituční roztok a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch.
  - e. Lahvičku s rekonstitučním roztokem držte na pracovní desce a pevně zasuňte druhý konec rekonstituční objímky do láhve (Obrázek 3, krok 2).
  - f. Sestavenými lahvemi pomalu otáčejte. Nechte roztok vytéct z láhve do skleněné lahvičky (Obrázek 3, krok 3).
  - g. Jemně roztokem v lahvi zakružte, aby se promíchal. Při kroužení lahví zamezte vzniku pěny (Obrázek 3, krok 4).
  - h. Počkejte, až se lyofilizovaná reagensie rozpustí v roztoku, a pak převraťte sestavené lahve ještě jednou nakloněním v úhlu 45°, aby se minimalizoval vznik pěny (Obrázek 3, krok 5). Veškerou kapalinu nechte natéct zpět do plastové láhve.
  - i. Odstraňte rekonstituční objímku a skleněnou lahvičku (Obrázek 3, krok 6).
  - j. Plastovou láhev znovu uzavřete. Zaznamenejte iniciály laboranta a datum rekonstituce na všechny lahvičky s rekonstituovanou reagensií (Obrázek 3, krok 7).
  - k. Rekonstituční objímku a lahvičku zlikvidujte (Obrázek 3, krok 8).

**Varování:** Při provádění rekonstituce reagentů zabraňte tvorbě pěny. Pěna narušuje mechanismus detekce hladiny v systému Panther.



**Obrázek 3. Rekonstituční proces v systému Panther**

2. Připravte pracovní reagentii zachycení cíle (wTCR):
  - a. Spárujte odpovídající lahvičky s TCR a IC.
  - b. Zkontrolujte čísla šarží reagentie na listu s čárovým kódem hlavní šarže a zajistěte, aby byly odpovídající reagentie v soupravě spárovány.
  - c. Otevřete odpovídající lahvičku TCR a umístěte uzávěr na čistý zakrytý pracovní povrch.
  - d. Otevřete lahvičku IC a celý obsah nalijte do lahve TCR. Očekávejte, že v lahvi IC může zůstat malé množství kapaliny.
  - e. Uzavřete lahvičku TCR a roztokem jemně kružte, aby se obsah promíchal. Během tohoto kroku zamezte vzniku pěny.
  - f. Na štítek zaznamenejte iniciály laboranta a aktuální datum.
  - g. Lahvičku IC a uzávěr zlikvidujte.
  - h. Ve wTCR se mohou vytvořit precipitáty, které mohou vést k neplatným výsledkům způsobeným chybami ověřování objemu. Precipitát lze rozpustit zahříváním wTCR při teplotě 42 až 60 °C po dobu až 90 minut. Před použitím wTCR vyčkejte, dokud se jeho teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nezmizí.
3. Připravte selekční reagentii:
  - a. Zkontrolujte číslo šarže reagentie na listu s čárovým kódem hlavní šarže a ověřte, že patří do soupravy.
  - b. Pokud selekční reagentie obsahuje precipitát, zahřívajte selekční reagentii při teplotě 60 ± 1 °C po dobu až 45 minut, abyste usnadnili rozpuštění precipitátu. Lahvičku jemně promíchejte každých 5 až 10 minut. Před použitím selekční reagentie vyčkejte, dokud se její teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nebo zakalení nezmizí.

**Poznámka:** Všechny reagentie před založením do systému důkladně promíchejte jemným převrácením. Při převrácení reagentů zabraňte vzniku pěny.

## C. Příprava reagensí pro dříve rekonstituované reagensie

1. Dříve rekonstituované amplifikační a enzymatické reagensie a reagensie sondy musí před zahájením testu dosáhnout pokojové teploty (15 až 30 °C).
2. Pokud rekonstituovaná reagensie sondy obsahuje precipitát, který se při pokojové teplotě nevrací do roztoku, zahřívajte ji při teplotě, která nepřekročí 60 °C, po dobu 1 až 2 minut. Nepoužívejte, pokud je přítomen precipitát nebo zakalení.
3. Pokud wTCR obsahuje precipitát, zahřívajte wTCR při teplotě 42 až 60 °C po dobu až 90 minut. Před použitím wTCR vyčkejte, dokud se jeho teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nezmizí.
4. Pokud selekční reagensie obsahuje precipitát, zahřívajte selekční reagensii při teplotě  $60 \pm 1$  °C po dobu až 45 minut, abyste usnadnili rozpuštění precipitátu. Lahvičku jemně promíchejte každých 5 až 10 minut. Před použitím selekční reagensie vyčkejte, dokud se její teplota nevyrovná s pokojovou teplotou. Nepoužívejte, pokud precipitát nebo zakalení nezmizí.
5. Každou reagensii před založením do systému důkladně promíchejte jemným převrácením. Při převrácení reagensí zabraňte vzniku pěny.
6. Láhve s reagensii nedoplňujte. Systém Panther rozpozná láhve, které byly doplněny, a zamítne je.

## D. Manipulace se vzorky

1. Před zpracováním nechte vzorky (kalibrátory vzorky) dosáhnout pokojové teploty.
2. **Vzorky nemíchejte ve vortexové třepačce.**
3. Zkumavky na vzorky před založením do stojanů zkontrolujte. Pokud zkumavka se vzorkem obsahuje bubliny nebo má vzorek menší objem než obvykle, odstředujte zkumavku po dobu 5 minut při 420 RCF, abyste zajistili, že v uzávěru není žádná kapalina.

**Poznámka:** Pokud nedodržíte krok 3, může to způsobit únik tekutiny z uzávěru zkumavky se vzorkem.

## E. Příprava systému

1. Systém nastavte podle pokynů v *návodu k obsluze systému Panther* a v části *Poznámky k postupům* níže. Ujistěte se, že používáte stojany na reagensie a adaptéry TCR vhodné velikosti.
2. Založte vzorky.

**Poznámky k postupům**

## A. Kalibrátory

1. Ke správné činnosti softwaru Aptima HPV Assay v systému Panther jsou zapotřebí tři replikáty pozitivního kalibrátoru a tři replikáty negativního kalibrátoru. V systému Panther lze vložit po jedné lahvičce každého kalibrátoru do libovolné pozice v libovolné řadě v nosiči vzorků. Pipetování vzorků započne, jakmile bude splněna jedna z následujících dvou podmínek:
  - a. Systém momentálně zpracovává pozitivní a negativní kalibrátor.
  - b. V systému jsou zaregistrovány platné výsledky kalibrátorů.
2. Po dokončení pipetování zkumavek s kalibrátorem a jejich zpracovávání pro konkrétní soupravu reagensí lze vzorky použít s přiřazenou soupravou reagensí pro test po dobu až 24 hodin, pokud nenastane některá z následujících podmínek:
  - a. Kalibrátory jsou neplatné.

- b. Přiřazená souprava reagensů analýzy je vyjmuta ze systému.
  - c. Uplynula doba stability přiřazené soupravy reagensů pro test.
3. Snaha odpipetovat více než tři replikáty ze zkumavky s kalibrátorem může způsobit chyby zpracování.
- B. Teplota  
Pokožová teplota je definována jako 15 až 30 °C.
- C. Prášek na rukavice  
Podobně jako u jiných systémů reagensů může nadbytek talku z některých rukavic způsobit kontaminaci otevřených zkumavek. Doporučují se rukavice bez talku.

## Postupy kontroly kvality

### A. Kritéria platnosti cyklu

Platnost cyklu určuje software automaticky. Software označí cyklus za neplatný, pokud nastane některá z následujících podmínek:

- Více než jeden neplatný replikát negativního kalibrátoru.
- Více než jeden neplatný replikát pozitivního kalibrátoru.
- Neplatná negativní kontrola (pouze systémy DTS a systém Tigris DTS).
- Neplatná pozitivní kontrola (pouze systémy DTS a systém Tigris DTS).

Laborant může označit cyklus za neplatný, pokud při provádění testu pozoruje a zdokumentuje technické potíže nebo potíže způsobené obsluhou či přístrojem.

Neplatný cyklus je nutno opakovat. Zrušený cyklus je nutno opakovat.

### B. Kritéria pro přijetí kalibrátoru

Následující tabulka definuje kritéria RLU pro replikáty negativního a pozitivního kalibrátoru.

<b>Negativní kalibrátor</b>	
IC	$\geq 0$ a $\leq 45\ 000$ RLU
analyt	$\geq 75\ 000$ a $\leq 400\ 000$ RLU
<b>Pozitivní kalibrátor</b>	
IC	$\geq 480\ 000$ a $\leq 1\ 850\ 000$ RLU
analyt	$\leq 450\ 000$ RLU

### C. Výpočet cutoff pro IC

Cutoff IC se určí podle signálu IC (flasher) z platných replikátů negativního kalibrátoru.

$$\text{Cutoff IC} = 0,5 \times [\text{střední RLU IC platných replikátů negativního kalibrátoru}]$$

### D. Výpočet cutoff pro analyt

Cutoff analytu se určí podle signálu analytu (flasher) z platných replikátů negativního kalibrátoru a také ze signálu analytu z platných replikátů pozitivního kalibrátoru.

$$\text{Cutoff analytu} = \frac{[\text{střední RLU analytu platných replikátů negativního kalibrátoru}] + [0,09 \times \text{střední RLU analytu platných replikátů pozitivního kalibrátoru}]}{2}$$

### E. Výpočet intervalu od signálu analytu ku cutoff (S/CO)

Hodnota S/CO analytu se určí z RLU analytu zkušební vzorku a cutoff analytu pro daný cyklus.

$$\text{S/CO analytu} = \frac{\text{RLU analytu zkušební vzorku}}{\text{cutoff analytu}}$$

### F. Kritéria přijetí kontroly (pouze systémy DTS a systém Tigris DTS)

Negativní kontrola musí mít platný negativní výsledek (RLU IC  $\geq$  cutoff IC a S/CO analytu  $<$  0,50). Pozitivní kontrola musí mít platný pozitivní výsledek (S/CO analytu  $\geq$  0,50).

## Interpretace testu

Výsledky testu se automaticky určují pomocí softwaru testu. Výsledek testu může být negativní, pozitivní nebo neplatný, jak je určeno podle RLU IC a S/CO analytu. Výsledek testu může být také neplatný kvůli jiným parametrům (abnormální tvar kinetické křivky), které překročily normální očekávané rozsahy. Počáteční neplatné výsledky je třeba opakovat.

Vzorky soupravy Aptima CSCT lze zředit, aby se potlačily případné inhibiční látky. Zředte 1 díl neplatného vzorku na 8 dílů transportního roztoku vzorku (roztok ve zkumavkách soupravy CSCT); tj. 560 µl vzorku do nové zkumavky soupravy CSCT, která obsahuje 4,5 ml roztoku pro přepravu vzorku. Zředěný vzorek zamíchejte opatrným převrácením; zabraňte tvorbě pěny. Zředěný vzorek testujte podle standardního postupu testu.

**Poznámka:** K testu 1 alikvotu vzorku je zapotřebí minimální objem 1,7 ml. Neředte neplatný zředěný vzorek. Pokud zředěný vzorek vede k neplatnému výsledku, je třeba od pacientky získat nový vzorek.

Výsledek Aptima HPV Assay	Kritéria
<b>Negativní</b>	<i>S/CO analytu &lt; 0,50 IC ≥ cutoff IC IC ≤ 2 000 000 RLU</i>
<b>Pozitivní</b>	<i>S/CO analytu ≥ 0,50 IC ≤ 2 000 000 RLU Analyt ≤ 13 000 000 RLU</i>
<b>Neplatné</b>	<i>IC &gt; 2 000 000 RLU nebo S/CO analytu &lt; 0,50 a IC &lt; cutoff IC nebo analyt &gt; 13 000 000 RLU</i>

## Omezení

- A. Typy vzorků, které nejsou uvedeny v části Určené použití, nebyly hodnoceny.
- B. Účinnost Aptima HPV Assay nebyla hodnocena u osob očkovaných proti HPV.
- C. Aptima HPV Assay nebyl hodnocen v případech podezření z pohlavního zneužívání.
- D. Účinnost může ovlivnit prevalence infekce HPV v populaci. Pozitivní prediktivní hodnoty se sníží při testování populace s nízkou prevalencí nebo jednotlivců bez rizika infekce.
- E. Vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep obsahující po přípravě sklíčka ThinPrep Pap testu méně než 1 ml se považují za nedostatečné pro Aptima HPV Assay.
- F. Po odebrání 1 ml vzorku v konzervačním roztoku SurePath před cytologickým zpracováním nebyl hodnocen dopad na výsledek cytologie.
- G. Výsledky testu mohou být ovlivněny nesprávným odběrem vzorků, skladováním nebo zpracováním vzorků.
- H. Vnitřní kontrolou se sledují kroky zachycení cíle, amplifikace a detekce; není určena ke kontrole přiměřenosti odběru cervikálních vzorků.
- I. Negativní výsledek Aptima HPV Assay nevylučuje možnost cytologických abnormalit ani budoucí či skryté CIN2, CIN3 nebo rakoviny.
- J. Účinnost testu mohou narušit osobní lubrikanty obsahující Polyquaternium 15, pokud jsou přítomné v koncentraci vyšší než 0,025% (v/v nebo w/v) testovaného vzorku.
- K. Účinnost testu mohou narušit antimykotika s obsahem tiokonazolu, pokud jsou přítomné v koncentracích vyšších než 0,075% (w/v) testovaného vzorku.
- L. Aptima HPV Assay poskytuje kvalitativní výsledky. Proto nelze vyvozovat korelaci mezi mírou signálu pozitivního testu a hladinou exprese mRNA ve vzorku.
- M. Detekce mRNA vysoce rizikového HPV je závislá na počtu kopií přítomných ve vzorku a mohou být ovlivněny metodami odběru vzorků, faktory pacientky, fáze infekce a přítomnosti interferujících látek.
- N. Infekce HPV není ukazatelem cytologické HSIL ani základem vysoce závažných CIN, ani to neznámá, že se rozvine CIN2, CIN3 nebo rakovina. U většiny žen infikovaných jedním nebo více vysoce rizikovými typy HPV se nevyvinou CIN2, CIN3 ani rakovina.
- O. Účinky jiných potenciálních okolností, jako je vaginální výtok, použití tamponů, sprchování apod., a okolností odběru vzorků nebyly hodnoceny.
- P. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v používání Aptima HPV Assay.
- Q. Zkřížená kontaminace vzorků může způsobit falešně pozitivní výsledky. Poměr přenosu Aptima HPV Assay v systému Tigris DTS byla zjištěna v neklinické studii na úrovni 0,3 %.
- R. Aptima HPV Assay je třeba interpretovat v kombinaci s jinými laboratorními a klinickými údaji, které má lékař k dispozici.



- S. U tohoto testu může dojít k falešné pozitivním výsledkům. Transkripty *in vitro* nízké rizikových genotypů HPV 26, 67, 70 a 82 vykazovaly vzájemnou reaktivitu s Aptima HPV Assay.
- T. Materiál pozitivních kontrol není určen ke sledování účinnosti při hraničních hodnotách testu.

## Účinnost testů systémů DTS

### Klinická účinnost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep

Bylo shromážděno více než 700 vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep od evropských žen, které byly pozvány na následnou schůzku z těchto důvodů: jeden nebo více abnormálních Pap testů, HPV infekce nebo jiný důvod. Jeden mililitr (1,0 ml) každého vzorku byl naředěn do 2,9 ml přepravního roztoku pro vzorky Aptima a jeden replikát byl otestován pomocí Aptima HPV Assay. Pro většinu vzorků byly k dispozici cytologie, histologie a výsledky z komerčně dostupného testu DNA HPV (HPV-DNA). Vysoce rizikový HPV status každého vzorku byl určen podle shody mezi testem Aptima a komerčně dostupným DNA HPV testem a pomocí dalších analýz vzorků s nesouhlasnými výsledky s použitím genotypizačního testu amplifikované DNA. Byla stanovena citlivost a specifická detekce nukleové kyseliny viru HPV. Byla rovněž vypočtena klinická citlivost a specifická detekce onemocnění definovaná jako cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) s histologickým výsledkem 2 nebo vyšším pro celou populaci vzorků, stejně jako konkrétní dílčí sady na základě cytologických výsledků.

Citlivost Aptima HPV Assay a specifická detekce vysoce rizikového HPV jsou uvedeny v Tabulka 1 pro 781 vzorků testovaných v systémech DTS. Citlivost testu dosáhla 92,6%, specifická 98,5% a pozitivní a negativní prediktivní hodnoty pro detekci vysoce rizikového HPV byly 98,8% a 90,9% v uvedeném pořadí.

**Tabulka 1:** Citlivost a specifická Aptima HPV Assay v systémech DTS pro detekci vysoce rizikového HPV

		Vysoce rizikový HPV		Celkem
		+	-	
Aptima HPV	+	412	5	417
	-	33	331	364
Celkem		445	336	781

Citlivost (95% CI) = 92,6% (89,8 – 94,7)  
 Specifická (95% CI) = 98,5% (96,6 – 99,4)  
 Pozitivní prediktivní hodnota = 98,8%  
 Negativní prediktivní hodnota = 90,9%

Klinická citlivost Aptima HPV Assay a specifická detekce  $\geq$ CIN2 jsou uvedeny v Tabulka 2a pro 753 vzorků s histologickými výsledky testovaných v systémech DTS. Klinická citlivost testu dosáhla 90,8%, specifická 55,7% a pozitivní a negativní prediktivní hodnoty pro detekci  $\geq$ CIN2 byly 32,1%, a 96,3% v uvedeném pořadí. Citlivost Aptima HPV Assay byla podobná testu HPV-DNA, který dosáhl 95,0% (Tabulka 2b), ale specifická Aptima HPV Assay byla výrazně vyšší než u testu HPV-DNA, která dosáhla pro detekci lézí  $\geq$ CIN2 v této populaci 47,4%. Ze 753 vzorků s výsledky histologie mělo 159 výsledků cytologie ASCUS. Citlivost a specifická Aptima HPV Assay v této populaci byly 92,3% a 41,4% pro detekci  $\geq$ CIN2 v uvedeném pořadí.

Podobné analýzy byly provedeny pomocí klinického koncového bodu  $\geq$ CIN3. Klinická citlivost Aptima HPV Assay a specifická detekce  $\geq$ CIN3 jsou uvedeny v Tabulka 3a pro 753 vzorků s histologickými výsledky testovaných v systémech DTS. Klinická citlivost testu dosáhla 97,7%, specifická 52,9% a pozitivní a negativní prediktivní hodnoty pro detekci  $\geq$ CIN3 byly 21,3% a 99,4% v uvedeném pořadí. I zde byla citlivost Aptima HPV Assay podobná testu HPV-DNA, který dosáhl citlivosti detekce  $\geq$ CIN3 98,9% (Tabulka 3b), ale specifická Aptima HPV Assay byla výrazně vyšší než u testu HPV-DNA, který dosáhl při detekci lézí  $\geq$ CIN3 v této populaci 44,4%. Ze 753 vzorků s výsledky histologie mělo 159 výsledků cytologie

ASCUS. Citlivost a specifická Aptima HPV Assay v této populaci byly 100% a 40,1% pro detekci  $\geq$ CIN3 v uvedeném pořadí.

Tyto výsledky, které přinesly podobnou citlivost a podstatně vyšší specifitu pro Aptima HPV Assay v případě detekce vysoce rizikové DNA, jsou podobné výsledkům získaným v jiných studiích.<sup>27, 28, 29, 30, 31</sup>

**Tabulka 2a:** Citlivost a specifická Aptima HPV Assay v systémech DTS pro detekci onemocnění ( $\geq$ CIN2)

		$\geq$ CIN2	<CIN2	Celkem
Aptima HPV	+	128	271	399
	-	13	341	354
	Celkem	141	612	753

Citlivost (95% CI) = 90,8% (84,9 – 94,5)

Specifická (95% CI) = 55,7% (51,8 – 59,6)

Pozitivní prediktivní hodnota = 32,1%

Negativní prediktivní hodnota = 96,3%

**Tabulka 2b:** Citlivost a specifická testu HPV-DNA pro detekci onemocnění ( $\geq$ CIN2)

		$\geq$ CIN2	<CIN2	Celkem
HPV-DNA	+	134	322	456
	-	7	290	297
	Celkem	141	612	753

Citlivost (95% CI) = 95,0% (90,1 – 97,6)

Specifická (95% CI) = 47,4% (43,5 – 51,4)

Pozitivní prediktivní hodnota = 29,4%

Negativní prediktivní hodnota = 97,6%

**Tabulka 3a:** Citlivost a specifická Aptima HPV Assay v systémech DTS pro detekci onemocnění ( $\geq$ CIN3)

		$\geq$ CIN3	<CIN3	Celkem
Aptima HPV	+	85	314	399
	-	2	352	354
	Celkem	87	666	753

Citlivost (95% CI) = 97,7% (92,0 – 99,4)

Specifická (95% CI) = 52,9% (49,1 – 56,6)

Pozitivní prediktivní hodnota = 21,3%

Negativní prediktivní hodnota = 99,4%

**Tabulka 3b:** Citlivost a specifická testu HPV-DNA pro detekci onemocnění ( $\geq$ CIN3)

		$\geq$ CIN3	<CIN3	Celkem
HPV-DNA	+	86	370	456
	-	1	296	297
	Celkem	87	666	753

Citlivost (95% CI) = 98,9% (93,8 – 99,8)

Specifická (95% CI) = 44,4% (40,7 – 48,2)

Pozitivní prediktivní hodnota = 18,9%

Negativní prediktivní hodnota = 99,7%

**Klinická účinnost Aptima HPV Assay při odběru cervikálních vzorků a jejich transportu**

Spárované vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep a vzorky soupravy Aptima CSCT byly odebrány od 728 subjektů. Jeden mililitr (1,0 ml) každého vzorku v konzervačním roztoku ThinPrep byl naředěn do 2,9 ml přepravního roztoku pro vzorky Aptima a jeden replikát byl otestován pomocí Aptima HPV Assay v systémech DTS. Jeden replikát každého vzorku CSCT byl rovněž testován pomocí Aptima HPV Assay. Byla určena procentuální shoda Aptima HPV Assay mezi vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep a vzorky CSCT, která je uvedena v Tabulka 4.

Procentuální pozitivní shoda dosáhla hodnoty 95,1% (95% CI: 91,6 – 97,2); procentuální negativní shoda dosáhla hodnoty 95,9% (95% CI: 93,7 – 97,3); celková shoda dosáhla hodnoty 95,6% (95% CI: 93,9 – 96,9). Byla pozorována silná korelace mezi kapalnými Pap vzorky a vzorky v transportní soupravě ( $\kappa = 0,90$ ).

**Tabulka 4:** Celkové výsledky shody Aptima HPV Assay mezi vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep a vzorky Aptima CSCT testovanými v systémech DTS

		Vzorek v konzervačním roztoku ThinPrep		Celkem
		+	-	
Vzorek soupravy Aptima CSCT	+	233	20	253
	-	12	463	475
	Celkem	245	483	728

Pozitivní shoda = 95,1% (91,6 – 97,2)  
 Negativní shoda = 95,9% (93,7 – 97,3)  
 Celková shoda = 95,6% (93,9 – 96,9)  
 koeficient kappa = 0,90

**Analytická citlivost**

Analytická citlivost Aptima HPV Assay pro detekci vysoce rizikového HPV byla určena testováním jednotlivých negativních klinických vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep obohacené o HPV transkripty *in vitro* nebo infikovanými buňkami v různých koncentracích. Třicet replikátů každé úrovně kopií bylo testováno s každou ze dvou šarží reagentů pro celkem 60 replikátů. Byla provedena probitová regresní analýza a předpovídaná 95% mez detekce určená pro každý typ HPV (Tabulka 5).

Výsledek probitové regresní analýzy ukazuje, že HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 56, 58, 59, 66 a 68 měly předpovídanou 95% detekční mez při méně než 100 kopiích/reakci a typy 51 a 52 měly předpovídanou 95% detekční mez při 100 až 300 kopiích/reakci.

**Tabulka 5:** Předpovídaná 95% detekční mez Aptima HPV Assay určená probitovou analýzou dat systémů DTS

Cíl	95% detekční mez* (95% mezí spolehlivosti)
HPV 16	74 (54 – 113)
HPV 18	52 (39 – 76)
HPV 31	19 (14 – 27)
HPV 33	24 (18 – 37)
HPV 35	27 (22 – 38)
HPV 39	32 (23 – 49)
HPV 45	28 (17 – 90)
HPV 51	198 (147 – 289)
HPV 52	239 (187 – 324)
HPV 56	48 (36 – 71)
HPV 58	99 (74 – 146)
HPV 59	89 (68 – 127)
HPV 68	27 (20 – 40)
HPV 66	68 (50 – 105)

\*počet kopií na reakci u transkriptů *in vitro* a buněk na reakci u buněčných linií

## Reprodukovatelnost testu

Reprodukovatelnost Aptima HPV Assay byla určena testováním s 16členným panelem v triplikátu ve 2 cyklech se 2 šaržemi reagensů na 3 přístrojích 3 laboranty. Testování bylo prováděno více než 20 dní na jednom místě. Členy panelu jsou popsány v Tabulka 6. Šest členů panelu bylo HPV negativní (3 byly přepravní roztoky pro vzorky Aptima a 3 byly směsné vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep), čtyři byly nízké HPV pozitivní (detekční mez ~95%) a šest bylo středně HPV pozitivních ( $\geq \sim 3 \times$  detekční mez 95%). Nízké pozitivní a mírné pozitivní členy panelu se skládaly buď z transkriptu *in vitro* (IVT), nebo kultivované buňky infikované HPV v transportní živné půdě vzorků Aptima.

**Tabulka 6:** Panel reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay

Člen panelu	Popis	Koncentrace	Očekávaný výsledek HPV
1	STM šarže 1	Neuplatňuje se	Negativní
2	SiHa nízké pozitivní	1 buňka/reakci	Pozitivní
3	HeLa nízké pozitivní	0,15 buňky/reakci	Pozitivní
4	Klinický fond 1	Neuplatňuje se	Negativní
5	ME180 Středně pozitivní	1 buňka/reakci	Pozitivní
6	MS751 Středně pozitivní	1 buňka/reakci	Pozitivní
7	SiHa & HeLa středně pozitivní	10 buněk/reakci a 1 buňka/reakci	Pozitivní
8	STM šarže 2	Neuplatňuje se	Negativní
9	Klinický fond 2	Neuplatňuje se	Negativní
10	HPV 16 IVT nízké pozitivní	30 kopií/reakci	Pozitivní
11	HPV 18 IVT nízké pozitivní	30 kopií/reakci	Pozitivní
12	STM šarže 3	Neuplatňuje se	Negativní
13	HPV 16 IVT středně pozitivní	100 kopií/reakci	Pozitivní
14	HPV 18 IVT středně pozitivní	100 kopií/reakci	Pozitivní
15	HPV 16 a HPV 18 středně pozitivní	100/100 kopií/reakci	Pozitivní
16	Klinický fond 3	Neuplatňuje se	Negativní

Pro systémy DTS bylo analyzováno sto osm datových bodů na každého člena panelu reprodukovatelnosti, výsledky shrnuje Tabulka 7. Procento pozitivních u negativních panelů se pohybovalo v rozmezí 0 až 3,7; nízké pozitivních bylo  $\geq 98$  a středně pozitivních bylo 100. Shoda s očekávaným výsledkem byla  $> 96\%$  pro všechny členy panelu.

Střední hodnota S/CO IC byla stanovena pro 6 negativních členů panelu (1, 4, 8, 9, 12 a 16); byla vypočtena variabilita mezi přístroji, laboranty, šaržemi a cykly, a také variabilita v rámci cyklu. Střední hodnota S/CO IC pro negativní členy panelu se pohybovala v rozmezí 1,76 až 1,92. Koeficient variace (KV) pro hodnoty S/CO IC byl poměrně nízký,  $< 10\%$  všech hodnocených parametrů. Variabilita hodnot S/CO analytu pro negativní členy panelu nebyla analyzována na negativní členy kvůli inherentní variabilitě, pokud jsou zaznamenány nulové hodnoty.

Střední hodnota S/CO analytu byla stanovena pro 10 negativních členů panelu (2 – 3, 5 – 7, 10 – 11 a 13 – 15); byla vypočtena variabilita mezi přístroji, laboranty, šaržemi a cykly, a také variabilita v rámci cyklu. Střední hodnoty S/CO analytu se pohybovaly v rozmezí 9,00 až 10,70 pro nízké pozitivní panely a 8,84 až 15,75 pro středně pozitivní panely. Dva členy obsahující 2 vysoce rizikové typy HPV, panely 7 a 15, měly střední hodnoty S/CO analytu 22,90 a 23,37 v uvedeném pořadí. KV pro nízké pozitivní a středně pozitivní členy byly  $< 35\%$  a  $< 15\%$  v uvedeném pořadí, s nejvyšší variabilitou během cyklu. Hodnoty S/CO IC nebyly vyhodnoceny pro pozitivní členy panelu, protože RLU IC nejsou indikativní pro individuální výkon reakce v pozitivním vzorku analytu.

Tabulka 7: Reprodukovatelnost Aptima HPV Assay v systémech DTS

Člen panelu	Popis	N	% pozitivních	Shoda	Střední S/CO		Analýza variability S/CO*											
							Mezi přístroji		Mezi laboranty		Mezi šaržemi		Mezi cykly		V rámci cyklu		Celkem	
							SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)
1	Neg	108	0,0	100%	1,92	0,00	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	1,9	0,0	0,7	0,1	5,8	0,1	6,3
2	Niz. poz.	108	99,1	98,1%	Neuplatňuje se	10,68	0,3	2,6	0,0	0,0	0,4	4,1	0,0	0,0	2,0	19,0	2,1	19,6
3	Niz. poz.	108	100	99,1%	Neuplatňuje se	10,65	0,5	4,7	0,0	0,0	0,3	2,5	0,3	3,0	2,4	22,3	2,5	23,1
4	Neg	108	0,0	100%	1,80	0,00	0,0	2,1	0,0	1,8	0,0	0,2	0,0	0,7	0,1	6,6	0,1	7,2
5	Stř. poz.	107 <sup>^</sup>	100	100%	Neuplatňuje se	8,84	0,2	1,8	0,1	0,8	0,2	2,3	0,0	0,0	0,6	7,2	0,7	7,8
6	Stř. poz.	108	100	100%	Neuplatňuje se	15,75	0,4	2,4	0,4	2,6	1,1	7,0	0,1	0,9	0,6	3,9	1,4	8,7
7	Stř. poz.	107 <sup>^</sup>	100	100%	Neuplatňuje se	22,90	0,7	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	9,1	2,2	9,7	
8	Neg	108	0,0	100%	1,85	0,00	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	1,1	0,0	1,5	0,1	6,1	0,1	6,8
9	Neg	108	3,7	96,3%	1,76	0,06	0,0	0,0	0,1	3,6	0,0	0,0	0,0	1,3	0,1	7,5	0,1	8,4
10	Niz. poz.	108	99,1	99,1%	Neuplatňuje se	10,61	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	16,8	1,8	16,8	
11	Niz. poz.	108	98,1	98,1%	Neuplatňuje se	9,04	0,0	0,0	0,4	4,1	0,0	0,0	0,9	10,0	2,9	32,6	3,1	34,3
12	Neg	108	0,0	100%	1,85	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	1,0	0,1	7,6	0,1	7,8
13	Stř. poz.	108	100	100%	Neuplatňuje se	10,99	0,1	1,4	0,1	0,8	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	3,9	0,5	4,2
14	Stř. poz.	108	100	100%	Neuplatňuje se	12,22	0,3	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	12,8	1,6	13,0	
15	Stř. poz.	108	100	100%	Neuplatňuje se	23,37	0,7	2,8	0,3	1,5	0,0	0,0	0,1	0,6	2,5	10,5	2,6	11,0
16	Neg	108	0,9	99,1%	1,79	0,03	0,0	2,3	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	1,1	0,1	7,5	0,1	8,1

\*Analýza variability S/CO IC pro negativní panely (1, 4, 8, 9, 12, 16); analýza variability analytu S/CO pro pozitivní panely (2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15)

<sup>^</sup>1 neplatná reakce, nebylo znovu testováno

S/CO = poměr signálu ku cutoff

SO = směrodatná odchylka

Neuplatňuje se = není k dispozici

## Zkřížená reaktivita

Analytická specifita Aptima HPV Assay byla hodnocena s roztokem živné půdy PreservCyt zředěným v transportní živné půdě Aptima a obohaceným o kultivované bakterie, kvasinky nebo plísně, o kultivovaný virus nebo transkripty HPV s nízkým stupněm rizika *in vitro*. Analytická citlivost byla vyhodnocena se stejným panelem obohaceným infikovanými SiHa buňkami s nízkou koncentrací HPV (1 buňka na reakci). Organismy a testované koncentrace jsou uvedeny v Tabulka 8. U žádného z těchto testovaných organismů nebyl zjištěn žádný vliv na specifitu nebo citlivost Aptima HPV Assay.

Tabulka 8: Panel analytické specifity

Organismus	Testovaná koncentrace	Organismus	Testovaná koncentrace
<b>Bakterie</b>			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Micrococcus luteus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2×10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Atopobium vaginae</i>	5×10 <sup>7</sup> CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma fermentans</i>	5×10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma hominis</i>	5×10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae a Chlamydia trachomatis</i>	5×10 <sup>8</sup> CFU/ml 1,5×10 <sup>4</sup> TCID 50/ml
<i>Campylobacter fetus-fetus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	2×10 <sup>4</sup> TCID 50/ml	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Clostridium difficile</i>	6×10 <sup>7</sup> CFU/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Ruminococcus productus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Fingoldia magna</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml		



Tabulka 8: Panel analytické specifity (pokračování)

Organismus	Testovaná koncentrace	Organismus	Testovaná koncentrace
<b>Kvasinky/prvoci</b>			
<i>Candida albicans</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1×10 <sup>7</sup> buněk/ml
<b>Viry</b>			
Adenovirus 2	1×10 <sup>6</sup> vp/ml	Herpes simplex virus 1	2,5×10 <sup>5</sup> TCID 50/ml
Cytomegalovirus	33 TCID 50/ml	Herpes simplex virus 2	5×10 <sup>4</sup> TCID 50/ml
Epstein-Barr virus	4×10 <sup>7</sup> vp/ml	SV40	1,2×10 <sup>4</sup> TCID 50/ml
HIV-1	1,0×10 <sup>6</sup> kopií/ml		
<b>Necílené genotypy HPV</b>			
HPV 6	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 53	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 11	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 61	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 42	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 71	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 43	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 81	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 44	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml		

## Interference

Látky popsané v Tabulka 9 byly jednotlivě přidány do roztoku PreservCyt a přepravního roztoku pro vzorky Aptima (STM) při 1% a 10% obj/obj nebo hmot/obj; potom byly testovány pomocí Aptima HPV Assay. Všechny látky byly testovány v přítomnosti a nepřítomnosti kultivovaných buněk infikovaných HPV (SiHa, 3 buňky/reakci). Interference nebyla zaznamenána u žádné z testovaných látek s výjimkou dvou z pěti lubrikantů, které obsahovaly Polyquaternium 15 v koncentraci > 0,025% v testovaném vzorku, a antimykotikum s obsahem tiokonazolu v koncentraci > 0,075% v testovaném vzorku.

**Tabulka 9:** Látky testované pro případnou interferenci s Aptima HPV Assay

Kategorie produktů	Značka nebo typ produktu
<b>Lubrikant</b>	KY Sensual Mist (obj/obj)
	KY Warming Jelly (hmot/obj)
	KY Warming Liquid (obj/obj)
	Osobní lubrikant Astroglide*
	Lubrikační kapalina značky Target*
<b>Spermicid</b>	Vaginální antikoncepce Gynol II Original Formula (hmot/obj)
	Vaginální antikoncepce Gynol II Extra Strength (hmot/obj)
	Vaginální antikoncepční pěna Delfen (hmot/obj)
	Vaginální antikoncepce Encare (hmot/obj)
	Vaginální antikoncepce Conceptrol (hmot/obj)
<b>Antimykotika/potlačení svědění</b>	Vagisil Maximum Strength (hmot/obj)
	Monistat Soothing Care (hmot/obj)
	Monistat 3 Combination Pack (hmot/obj)
	Target Tioconazole 1 (hmot/obj)
	Target Miconazole 3 (hmot/obj)
<b>Ledová kyselina octová</b>	EMD M/N AX0073-11 (obj/obj)
<b>Plná krev</b>	plná krev (obj/obj)

\*Osobní lubrikanty obsahující Polyquaternium 15.



## Uspořádání klinické studie Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep

Prospektivní, multicentrická klinická studie v USA pod názvem CLEAR byla provedena k určení klinické účinnosti Aptima HPV Assay pro detekci cervikální intraepiteliální neoplazie stupně 2 nebo závažnějšího cervikálního onemocnění ( $\geq$ CIN2). Klinická studie CLEAR zahrnovala úvodní hodnocení a následné hodnocení po 3 letech.<sup>34</sup>

### Klinická studie CLEAR – úvodní hodnocení

Při úvodním hodnocení v rámci klinické studie CLEAR (úvodní fáze) byly ženy zařazeny do studie ASC-US nebo studie NILM na základě výsledků cytologie z rutinního screeningu rakoviny děložního čípku. Studie ASC-US zahrnovala populaci žen 21 let a starší s výsledky cytologie ASC-US a studie NILM zahrnovala populaci žen 30 let a starší s výsledky cytologie NILM. Účelem studie NILM byla podpora nároku na doplňková vyšetření u žen ve věku od 30 let, protože ženy v této věkové skupině s výsledky cytologie závažnějším než ASC-US by měly absolvovat kolposkopii bez ohledu na svůj status HPV.<sup>35</sup>

Zařazeny byly ženy z 18 klinických pracovišť, převážně gynekologických/porodních klinik, zahrnující široké geografické rozložení a pestrou populaci. Tyto ženy byly rozděleny do studií ASC-US a NILM na základě jejich referenčních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep. Při úvodním vyšetření byly testovány zbývající referenční vzorky od žen ve studii ASC-US nebo studii NILM pomocí Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV.

Při úvodním vyšetření byla u všech žen ve studii ASC-US provedena kolposkopie, bez ohledu na jejich výsledky testu HPV. Byly získány biopsie endocervikální kyretáže (ECC) a biopsie cervikálního vzorku (1 biopsie z každého ze 4 kvadrantů). Pokud byla viditelná léze, byla provedena biopsie cervikálního vzorku (řízená metoda, 1 biopsie na lézi) a v kvadrantech bez viditelné léze byla provedena biopsie skvamokolumnární junkce (náhodná metoda).

Ve studii NILM byla při úvodním vyšetření u žen s pozitivním Aptima HPV Assay nebo komerčně dostupným testem DNA HPV, stejně jako u náhodně vybraných žen s negativním výsledkem obou testů, provedena kolposkopie. Náhodně vybrané ženy, u kterých byly oba testy negativní, byly zahrnuty s ohledem na korekci ověření zkraslení s upraveným odhadnutým výkonem generovaným pomocí metody vícenásobného započtení. Biopsie ECC byla získána od každé ženy, která podstoupila kolposkopii. Punch biopsie byly získány pouze z viditelné léze (řízená metoda; 1 biopsie na lézi).

Status onemocnění byl určen pomocí konsenzuálního revizního histologického panelu, který byl založen na shodě nejméně 2 odborných patologů. Odborní patologové neznali status HPV u daných žen. Skryt byl také status cytologie, jakož i diagnóza histologie druhého odborníka. Pokud se 3 patologové neshodli, všichni 3 patologové revidovali vzorky pomocí více-hlavého mikroskopu, aby dosáhli konsensu. Výzkumníci, lékaři ani ženy neznali výsledky testu HPV až do skončení kolposkopie, aby se zabránilo zkraslení.

Při úvodním vyšetření byla hodnocena klinická účinnost Aptima HPV Assay pro detekci  $\geq$ CIN2 a cervikální intraepiteliální neoplazie stupně 3 nebo závažnějšího cervikálního onemocnění ( $\geq$ CIN3) vzhledem ke statusu cervikálního onemocnění určenému při úvodním vyšetření. Byla také určena klinická účinnost komerčně dostupného testu DNA HPV pro přímé srovnání s výsledky Aptima HPV Assay.

## **Klinická studie CLEAR – následné hodnocení**

Ženy ve studii NILM ze 14 klinických pracovišť byly způsobilé k účasti v následné 3leté fázi studie, pokud: i) při úvodním vyšetření absolvovaly kolposkopii a neměly  $\geq$ CIN2 nebo ii) při úvodním vyšetření kolposkopii neabsolvovaly. Následná fáze studie se skládala z každoročních návštěv. Při těchto návštěvách byl u každé ženy proveden odběr cervikálního vzorku pro cytologii a některé ženy byly testovány pomocí komerčně dostupného testu HPV. U žen s ASC-US nebo závažnějšími výsledky cytologie v následném období byla provedena kolposkopie pomocí stejné biopsie a byly provedeny histologické postupy vyšetření pro hodnocení základních údajů studie NILM. Status cervikálního onemocnění při následné návštěvě byl považován za „negativní“ podle výsledků cytologie NILM, případně u žen s abnormálními výsledky cytologických testů, na základě normálních výsledků nebo výsledků konsenzuálního revizního histologického panelu CIN1. U žen, u kterých bylo v následném období zjištěno  $\geq$ CIN2, bylo následné období označeno jako ukončené; po jistění  $\geq$ CIN2 již v návštěvách nepokračovaly. U žen, u kterých nebylo v následném období zjištěno  $\geq$ CIN2, ale které se studie účastnily návštěvou v 1. následném roce, případně ve 2. následném roce a které se studie zúčastnily návštěvou ve 3. následném roce, bylo následné období označeno jako ukončené.

Cílem následné studie bylo porovnat kumulativní 3leté riziko cervikálního onemocnění u žen s úvodními pozitivními výsledky Aptima HPV Assay s kumulativním 3letým rizikem cervikálního onemocnění u žen s úvodními negativními výsledky Aptima HPV Assay. 3letý status cervikálního onemocnění byl určen následujícím způsobem:

- Pozitivní status cervikálního onemocnění ( $\geq$ CIN2 nebo  $\geq$ CIN3) – ženy, u kterých bylo zjištěno  $\geq$ CIN2 na začátku nebo následně.
- Negativní status cervikálního onemocnění ( $<$ CIN2) – ženy, které dokončily následné období bez detekce  $\geq$ CIN2 a u kterých nebyl uveden „neurčitý“ status cervikálního onemocnění.
- Neurčitý status cervikálního onemocnění – ženy, které měly abnormální výsledky cytologických testů v následném období a které neměly následný výsledek konsenzuálního revizního histologického panelu, případně ženy s neadekvátní cytologií při poslední návštěvě.
- Ztraceny v následné fázi – ženy, které nedokončily následné návštěvy a u kterých nebyl status cervikálního onemocnění označen jako „neurčitý“.

Klinická účinnost Aptima HPV Assay pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 byla hodnocena vzhledem k 3letému statusu cervikálního onemocnění.

## Účinnost testů systému Tigris DTS

### ASC-US Populace ≥ 21 let: Klinická účinnost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep

Celkem bylo do studie ASC-US zahrnuto 1 252 žen ve věku 21 let a starších s výsledky cytologie ASC-US. Z nich bylo 294 žen vyloučeno a 19 mělo status onemocnění označen jako „neurčitý“; všechny byly vyloučeny z analýzy. Zbývajících 939 hodnotitelných žen bylo ve věku 21 let a starších s výsledky cytologie ASC-US, výsledky Aptima HPV Assay a průkazným statusem onemocnění. Devadesát jedna (91) žen mělo ≥CIN2 a čtyřicet jedna (41) mělo ≥CIN3. Prevalence ≥CIN2 a ≥CIN3 u hodnotitelných žen s výsledky cytologie ASC-US byla 9,7% a 4,4% v uvedeném pořadí. Výsledky Aptima HPV Assay podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu jsou uvedeny v Tabulka 11.

**Tabulka 11:** ASC-US Populace ≥ 21 let: Výsledky Aptima HPV Assay podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu

Výsledek Aptima HPV Assay*	Test DNA HPV	Diagnóza konsenzuálního revizního histologického panelu						
		Neurčitý**	Normální	CIN1	CIN2	CIN3	Rakovina	Celkem
Pozitivní	Pozitivní	6	170	113	41	32	1	363
Pozitivní	Negativní	0	7	0	1	2	0	10
Pozitivní	Žádný výsledek***	0	14	11	0	2	0	27
Negativní	Pozitivní	0	47	13	2	3	0	65
Negativní	Negativní	10	371	55	6	1	0	443
Negativní	Žádný výsledek***	3	40	7	0	0	0	50
<b>Celkem</b>		19	649	199	50	40	1****	958

\*Všechny vzorky měly poslední platné výsledky (po počátečním testování nebo po vyřešení počátečních neplatných výsledků podle postupu).

\*\*19 subjektů absolvovalo návštěvu kolposkopie, ale nebylo možno určit diagnózu z následujících důvodů: < 5 bioptických vzorků získáno s výsledky histologie normální/CIN1 (n = 15), nebyla získána žádná biopsie (n = 3), ztraceny bioptické vzorky (n = 1).

\*\*\*77 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu HPV DNA primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

\*\*\*\*Jeden subjekt měl adenokarcinom in situ (AIS).

Odhady klinické účinnosti Aptima HPV Assay včetně citlivosti, specifity, pozitivní prediktivní hodnoty (PPV) a negativní prediktivní hodnoty (NPV) pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3 na základě vyhodnocení všech biopsií a včetně pouze řízených biopsií jsou uvedeny v Tabulka 12, stejně jako odhady pro komerčně dostupný test DNA HPV.

**Tabulka 12:** ASC-US Populace ≥ 21 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 939		Test DNA HPV N = 865*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
≥CIN2	<b>Všechny biopsie</b>				
	Citlivost (%)	86,8 (79/91)	(78,4, 92,3)	88,8 (79/89)	(80,5, 93,8)
	Specifická (%)	62,9 (533/848)	(59,6, 66,0)	55,8 (433/776)	(52,3, 59,3)
	PPV (%)	20,1 (79/394)	(18,1, 22,0)	18,7 (79/422)	(17,0, 20,4)
	NPV (%)	97,8 (533/545)	(96,5, 98,8)	97,7 (433/443)	(96,2, 98,8)
	Prevalence (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
	<b>Řízené biopsie**</b>				
	Citlivost (%)	93,3 (56/60)	(84,1, 97,4)	93,2 (55/59)	(83,8, 97,3)
	Specifická (%)	61,5 (539/876)	(58,3, 64,7)	54,5 (438/804)	(51,0, 57,9)
	PPV (%)	14,2 (56/393)	(12,7, 15,6)	13,1 (55/421)	(11,7, 14,2)
	NPV (%)	99,3 (539/543)	(98,3, 99,8)	99,1 (438/442)	(97,9, 99,7)
	Prevalence (%)	6,4 (60/936)		6,8 (59/863)	
≥CIN3	<b>Všechny biopsie</b>				
	Citlivost (%)	90,2 (37/41)	(77,5, 96,1)	92,3 (36/39)	(79,7, 97,3)
	Specifická (%)	60,2 (541/898)	(57,0, 63,4)	53,3 (440/826)	(49,9, 56,6)
	PPV (%)	9,4 (37/394)	(8,1, 10,4)	8,5 (36/422)	(7,4, 9,4)
	NPV (%)	99,3 (541/545)	(98,3, 99,8)	99,3 (440/443)	(98,3, 99,8)
	Prevalence (%)	4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	
	<b>Řízené biopsie**</b>				
	Citlivost (%)	93,1 (27/29)	(78,0, 98,1)	96,4 (27/28)	(82,3, 99,4)
	Specifická (%)	59,6 (541/908)	(56,4, 62,7)	52,8 (441/836)	(49,4, 56,1)
	PPV (%)	6,9 (27/394)	(5,8, 7,6)	6,4 (27/422)	(5,5, 7,0)
	NPV (%)	99,6 (541/543)	(98,8, 100)	99,8 (441/442)	(98,9, 100)
	Prevalence (%)	3,1 (29/937)		3,2 (28/864)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

\*\*Výsledek konsenzuální histologie byl odvozen pouze pomocí výsledků z řízených biopsií. Ženy bez řízené biopsie reflektují normální kolposkopie a jsou v těchto analýzách zahrnuty jako bez onemocnění (<CIN2 nebo <CIN3, podle okolností). Pokud byly zahrnuty pouze řízené biopsie, nebylo vždy dosaženo konsenzu.

Při hodnocení všech biopsií byly klinické odhady citlivosti Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV, kde jsou k dispozici oba výsledky testu pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3, podobné (nebyly statisticky významné rozdíly v odhadech citlivosti: rozdíl citlivosti = -2,3% [95% CI: -9,5%, 4,8%]). Odhady klinické specifity Aptima HPV Assay pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 byly vyšší než u komerčně dostupného testu DNA HPV (rozdíl v odhadech specifity byly statisticky významné). Pro  $\geq$ CIN2 byl rozdíl specifity 6,8% (95% CI: 4,9%, 9,0%). NPV byly podobné, ale pro detekci  $\geq$ CIN2 byla PPV pro Aptima HPV Assay mírně vyšší než PPV pro komerčně dostupný test DNA HPV (20,1% vs. 18,7%).

Z 91 případů  $\geq$ CIN2 bylo 60 (65,9%) identifikováno při přímé biopsii a 31 (34,1%) bylo identifikováno z náhodných nebo ECC biopsií (tedy nikoli při přímé biopsii). Tato zjištění jsou srovnatelná s výsledky z publikovaných studií, v nichž bylo zjištěno přibližně 25% až 40% případů  $\geq$ CIN2 pouze ze vzorků náhodných, případně ECC biopsií.<sup>36, 37</sup> Použití pouze přímých biopsií k určení statutu onemocnění (za předpokladu, že ženy bez řízené biopsie měly normální výsledky histologie, protože nebyly zjištěny žádné viditelné léze), dosáhly hodnoty  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 ve studii 6,4% a 3,1% v uvedeném pořadí. Odhady klinické citlivosti pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 byly vyšší u obou testů pomocí pouze řízené biopsie než odhady vypočtené s využitím všech biopsií. Pro oba testy byla klinická specifita získaná pouze pomocí řízené biopsie podobná specifitě získané se všemi zahrnutými biopsiemi. Proto, pokud se použily pouze řízené biopsie, byla specifita Aptima HPV Assay výrazně vyšší než u komerčně dostupného testu DNA HPV.

Odhady klinické účinnosti Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV jsou zobrazeny podle věkových skupin v Tabulka 13 a Tabulka 14 ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 v uvedeném pořadí, na základě vyhodnocení všech biopsií).



**Tabulka 13:** ASC-US Populace ≥ 21 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN2 podle věkových skupin

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 939		Test DNA HPV N = 865*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
21 až 29 let		N = 415		N = 389	
	Citlivost (%)	90,2 (55/61)	(80,2, 95,4)	94,9 (56/59)	(86,1, 98,3)
	Specifická (%)	44,9 (159/354)	(39,8, 50,1)	35,5 (117/330)	(30,5, 40,8)
	PPV (%)	22,0 (55/250)	(19,6, 24,2)	20,8 (56/269)	(19,0, 22,5)
	NPV (%)	96,4 (159/165)	(93,0, 98,5)	97,5 (117/120)	(93,6, 99,4)
	Prevalence (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
30 až 39 let		N = 262		N = 239	
	Citlivost (%)	90,0 (18/20)	(69,9, 97,2)	80,0 (16/20)	(58,4, 91,9)
	Specifická (%)	68,2 (165/242)	(62,1, 73,7)	61,6 (135/219)	(55,1, 67,8)
	PPV (%)	18,9 (18/95)	(14,7, 22,7)	16,0 (16/100)	(11,8, 19,6)
	NPV (%)	98,8 (165/167)	(96,5, 99,8)	97,1 (135/139)	(94,1, 99,1)
Prevalence (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)		
≥ 40 let		N = 262		N = 237	
	Citlivost (%)	60,0 (6/10)	(31,3, 83,2)	70,0 (7/10)	(39,7, 89,2)
	Specifická (%)	82,9 (209/252)	(77,8, 87,1)	79,7 (181/227)	(74,0, 84,4)
	PPV (%)	12,2 (6/49)	(5,8, 18,4)	13,2 (7/53)	(6,9, 18,7)
	NPV (%)	98,1 (209/213)	(96,6, 99,4)	98,4 (181/184)	(96,6, 99,6)
Prevalence (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)		

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

**Tabulka 14:** ASC-US Populace ≥ 21 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN3 podle věkových skupin

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 939		Test DNA HPV N = 865*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
<b>21 až 29 let</b>		N = 415		N = 389	
	Citlivost (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Specifická (%)	42,3 (164/388)	(37,5, 47,2)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	PPV (%)	10,4 (26/250)	(8,9, 11,4)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	NPV (%)	99,4 (164/165)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalence (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
<b>30 až 39 let</b>		N = 262		N = 239	
	Citlivost (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Specifická (%)	65,6 (166/253)	(59,6, 71,2)	59,6 (137/230)	(53,1, 65,7)
	PPV (%)	8,4 (8/95)	(5,2, 10,4)	7,0 (7/100)	(3,9, 9,1)
	NPV (%)	99,4 (166/167)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalence (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
<b>≥ 40 let</b>		N = 262		N = 237	
	Citlivost (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Specifická (%)	82,1 (211/257)	(77,0, 86,3)	78,9 (183/232)	(73,2, 83,6)
	PPV (%)	6,1 (3/49)	(1,6, 10,2)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	NPV (%)	99,1 (211/213)	(98,0, 99,9)	99,5 (183/184)	(98,2, 100)
	Prevalence (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Absolutní riziko onemocnění ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3, na základě vyhodnocení všech biopsií) podle výsledku Aptima HPV Assay a relativní riziko onemocnění pro pozitivní vs. negativní výsledky Aptima HPV Assay jsou uvedeny v Tabulka 15, spolu s odhady pro komerčně dostupný test DNA HPV. Relativní riziko  $\geq$ CIN2 bylo 9,1 (95% CI: 5,0, 16,5), což znamená, že žena s pozitivním Aptima HPV Assay měla 9,1krát větší pravděpodobnost onemocnění  $\geq$ CIN2 než žena s negativním Aptima HPV Assay. Relativní riziko  $\geq$ CIN3 bylo 12,8 (95% CI: 4,6, 35,6).

**Tabulka 15:** ASC-US Populace  $\geq$  21 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV

	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 939		Test DNA HPV N = 865*	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	20,1 (79/394) (18,1, 22,0)	9,1 (5,0, 16,5)	18,7 (79/422) (17,0, 20,4)	8,3 (4,4, 15,8)
	Negativní	2,2 (12/545) (1,2, 3,5)		2,3 (10/443) (1,2, 3,8)	
	Prevalence (%)	9,7 (91/939)		10,3 (89/865)	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	9,4 (37/394) (8,1, 10,4)	12,8 (4,6, 35,6)	8,5 (36/422) (7,4, 9,4)	12,6 (3,9, 40,6)
	Negativní	0,7 (4/545) (0,2, 1,7)		0,7 (3/443) (0,2, 1,7)	
	Prevalence (%)	4,4 (41/939)		4,5 (39/865)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Odhady absolutního a relativního rizika onemocnění ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3, na základě vyhodnocení všech biopsií) u Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV jsou zobrazeny podle věkových skupin v Tabulka 16.

**Tabulka 16:** ASC-US Populace  $\geq$  21 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledek Aptima HPV Assay a testu DNA HPV podle věkových skupin

	Věk	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 939		Test DNA HPV N = 865*	
			Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	21 až 29 let		N = 415		N = 389	
		Pozitivní	22,0 (55/250) (19,6, 24,2)	6,1 (2,7, 13,7)	20,8 (56/269) (19,0, 22,5)	8,3 (2,7, 26,1)
		Negativní	3,6 (6/165) (1,5, 7,0)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalence (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	30 až 39 let		N = 262		N = 239	
		Pozitivní	18,9 (18/95) (14,7, 22,7)	15,8 (3,8, 66,7)	16,0 (16/100) (11,8, 19,6)	5,6 (1,9, 16,1)
		Negativní	1,2 (2/167) (0,2, 3,5)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalence (%)	7,6 (20/262)		8,4 (20/239)	
	$\geq$ 40 let		N = 262		N = 237	
		Pozitivní	12,2 (6/49) (5,8, 18,4)	6,5 (1,9, 22,2)	13,2 (7/53) (6,9, 18,7)	8,1 (2,2, 30,2)
		Negativní	1,9 (4/213) (0,6, 3,4)		1,6 (3/184) (0,4, 3,4)	
		Prevalence (%)	3,8 (10/262)		4,2 (10/237)	
$\geq$ CIN3	21 až 29 let		N = 415		N = 389	
		Pozitivní	10,4 (26/250) (8,9, 11,4)	17,2 (2,4, 125)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	Nelze vypočíst
		Negativní	0,6 (1/165) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalence (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	30 až 39 let		N = 262		N = 239	
		Pozitivní	8,4 (8/95) (5,2, 10,4)	14,1 (1,8, 111)	7,0 (7/100) (3,9, 9,1)	4,9 (1,0, 22,9)
		Negativní	0,6 (1/167) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalence (%)	3,4 (9/262)		3,8 (9/239)	
	$\geq$ 40 let		N = 262		N = 237	
		Pozitivní	6,1 (3/49) (1,6, 10,2)	6,5 (1,1, 38,0)	7,5 (4/53) (2,9, 10,7)	13,9 (1,6, 122)
		Negativní	0,9 (2/213) (0,1, 2,0)		0,5 (1/184) (0,0, 1,8)	
		Prevalence (%)	1,9 (5/262)		2,1 (5/237)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

### NILM Populace ≥ 30 let: Klinická účinnost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep při úvodním vyšetření

Celkem bylo do studie NILM zahrnuto 11 644 žen s výsledky cytologie NILM. Z nich bylo 773 žen staženo a vyloučeno z hodnocení základních údajů. Zbývajících 10 871 hodnotitelných žen bylo ve věku 30 let a starších s výsledky cytologie NILM a výsledky Aptima HPV Assay. Z 540 žen s pozitivními výsledky Aptima HPV Assay 335 absolvovalo kolposkopii při úvodním vyšetření. Z 10 331 žen s negativními výsledky Aptima HPV Assay 530 absolvovalo kolposkopii při úvodním vyšetření. Dvacet (20) žen mělo ≥CIN2 a jedenáct (11) mělo ≥CIN3; 799 žen mělo normální/CIN1 histologii; 46 žen měly neurčitý status onemocnění. Výsledky Aptima HPV Assay podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu při úvodním vyšetření jsou uvedeny v Tabulka 17.

**Tabulka 17:** NILM Populace ≥ 30 let: Výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu při úvodním vyšetření

Výsledek Aptima HPV Assay*	Test DNA HPV	Diagnóza konsenzuálního revizního histologického panelu						
		Neurčitý	Normální	CIN1	CIN2	CIN3	Rakovina	Celkem
Pozitivní	Pozitivní	11	212	11	4	7	2	247
Pozitivní	Negativní	7	59	0	1	0	1	68
Pozitivní	Žádný výsledek**	3	16	1	0	0	0	20
Negativní	Pozitivní	10	170	8	2	1	0	191
Negativní	Negativní	15	313	9	1	0	0	338
Negativní	Žádný výsledek**	0	0	0	1	0	0	1
<b>Celkem</b>		46	770	29	9	8	3***	865

\*Všechny vzorky měly poslední platné výsledky (po počátečním testování nebo po vyřešení počátečních neplatných výsledků podle postupu).

\*\*21 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Tři ženy měly adenokarcinom in situ (AIS).

Celkem 10 052 mělo při úvodním vyšetření neověřený (včetně neurčitého) status onemocnění (Tabulka 18). Vzhledem k tomu, že kolposkopii podstoupily pouze náhodně vybrané ženy s negativními výsledky Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV, podíl žen s neověřeným statutem onemocnění byl v této skupině vysoký (96,6%). K úpravě tohoto ověření zkreslení byla použita metoda vícenásobného započtení k odhadu počtu žen s onemocněním, který by byl zjištěn, pokud by všechny ženy podstoupily kolposkopii. Prezentovány jsou jak odhady účinnosti s upraveným ověřením zkreslení, tak neupravené odhady účinnosti založené na 819 ženách s ověřeným statutem onemocnění.

**Tabulka 18:** NILM Populace ≥ 30 let: Klasifikace hodnotitelných žen NILM podle výsledků Aptima HPV Assay a výsledků testu DNA HPV, statusu onemocnění (≥CIN2 a ≥CIN3) a statusu ověření onemocnění při úvodním vyšetření

Výsledek Aptima HPV Assay*	Test DNA HPV	Celkem žen	Ověřený status onemocnění: ≥CIN2		Ověřený status onemocnění: ≥CIN3		Neověřený status onemocnění
			Ženy s onemocněním (≥CIN2)	Ženy bez onemocnění (≥CIN2)	Ženy s onemocněním (≥CIN3)	Ženy bez onemocnění (≥CIN3)	Ženy s neznámým statutem onemocnění (% neznámých)
Pozitivní	Pozitivní	360	13	223	9	227	124 (34,4%)
Pozitivní	Negativní	150	2	59	1	60	89 (59,3%)
Pozitivní	Žádný výsledek**	30	0	17	0	17	13 (43,3%)
Negativní	Pozitivní	306	3	178	1	180	125 (40,8%)
Negativní	Negativní	9 420	1	322	0	323	9 097 (96,6%)
Negativní	Žádný výsledek**	605	1	0	0	1	604 (99,8%)
<b>Celkem</b>		10 871	20	799	11	808	10 052 (92,5%)

\*Všechny vzorky měly konečné výsledky (po počátečním testování nebo po vyřešení počátečních neplatných výsledků podle postupu).

\*\*635 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Upravená prevalence  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 u žen s výsledky cytologie NILM byla 0,9% a 0,4% v uvedeném pořadí. Upravené odhady absolutního a relativního rizika pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 při úvodním vyšetření jsou uvedeny v Tabulka 19. Upravené relativní riziko  $\geq$ CIN2 bylo 8,1 (95% CI: 2,3, 28,1), což znamená, že žena s pozitivním Aptima HPV Assay má 8,1 krát větší pravděpodobnost onemocnění  $\geq$ CIN2 než žena s negativním Aptima HPV Assay. Upravené relativní riziko  $\geq$ CIN3 bylo 34,5 (95% CI: 2,7, 443,3). Neupravené odhady absolutního a relativního rizika pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 při úvodním vyšetření jsou uvedeny celkem v Tabulka 20 a podle věkových skupin v Tabulka 21.

**Tabulka 19:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV (odhady s upraveným ověřením zkreslení) při úvodním vyšetření

Výsledek testu		Aptima HPV Assay		Test DNA HPV	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	4,7 (2,9, 7,6)	8,1 (2,3, 28,1)	3,7 (2,3, 6,0)	7,3 (1,6, 33,4)
	Negativní	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalence (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	3,3 (1,4, 7,6)	34,5 (2,7, 443,3)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,4)
	Negativní	0,1 (0,0, 1,6)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalence (%)	0,4		0,4	

**Tabulka 20:** Populace NILM  $\geq$  30 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

Výsledek testu		Aptima HPV Assay N = 819		Test DNA HPV N = 801*	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	4,8 (15/314) (3,4, 5,8)	4,8 (1,8, 13,1)	3,8 (16/417) (2,9, 4,4)	4,9 (1,4, 16,7)
	Negativní	1,0 (5/505) (0,4, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalence (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	3,2 (10/314) (2,2, 3,7)	16,1 (2,1, 125)	2,4 (10/417) (1,6, 2,7)	9,2 (1,2, 71,6)
	Negativní	0,2 (1/505) (0,0, 0,9)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalence (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

\*18 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

**Tabulka 21:** NILM Populace ≥ 30 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění ≥CIN2 a ≥CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV podle věkových skupin (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

	Věk	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 819		Test DNA HPV N = 801*	
			Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
≥CIN2	30 až 39 let		N = 384		N = 377	
		Pozitivní	4,8 (8/167) (2,1, 9,2)	10,4 (1,3, 82,3)	3,2 (7/216) (1,3, 6,6)	2,6 (0,5, 12,4)
		Negativní	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		1,2 (2/161) (0,2, 4,4)	
		Prevalence (%)	2,3 (9/384)		2,4 (9/377)	
	≥ 40 let		N = 435		N = 424	
		Pozitivní	4,8 (7/147) (1,9, 9,6)	3,4 (1,0, 11,5)	4,5 (9/201) (2,1, 8,3)	10,0 (1,3, 78,1)
		Negativní	1,4 (4/288) (0,4, 3,5)		0,4 (1/223) (0,0, 2,5)	
		Prevalence (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
≥CIN3	30 až 39 let		N = 384		N = 377	
		Pozitivní	3,0 (5/167) (1,0, 6,8)	6,5 (0,8, 55,1)	2,3 (5/216) (0,8, 5,3)	3,7 (0,4, 31,6)
		Negativní	0,5 (1/217) (0,0, 2,5)		0,6 (1/161) (0,0, 3,4)	
		Prevalence (%)	1,6 (6/384)		1,6 (6/377)	
	≥ 40 let		N = 435		N = 424	
		Pozitivní	3,4 (5/147) (1,1, 7,8)	Nelze vypočíst	2,5 (5/201) (0,8, 5,7)	Nelze vypočíst
		Negativní	0,0 (0/288) (0,0, 1,3)		0,0 (0/223) (0,0, 1,6)	
		Prevalence (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

\*18 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.



Upravené odhady klinické účinnosti Aptima HPV Assay včetně citlivosti, specificity, PPV a NPV pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 jsou uvedeny v Tabulka 22, stejně jako odhady pro komerčně dostupný test DNA HPV. Neupravené odhady klinické účinnosti jsou uvedeny v Tabulka 23. Aptima HPV Assay i komerčně dostupný test DNA HPV měly podobnou citlivost, specifická byla výrazně vyšší u Aptima HPV Assay (nepřekrývající, 95% CI). Odhady prediktivní hodnoty Aptima HPV Assay byly klinicky relevantní a podobné odhadům pro komerčně dostupný test DNA HPV. NPV byly podobné, ale pro detekci  $\geq$ CIN2 byla PPV pro Aptima HPV Assay mírně vyšší než PPV pro komerčně dostupný test DNA HPV (4,7% vs. 3,7%).

**Tabulka 22:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 (odhady s upraveným ověřením zkruslení) při úvodním vyšetření

	Účinnost	Aptima HPV Assay		Test DNA HPV	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
$\geq$ CIN2	Citlivost (%)	31,0	(5,9, 56,1)	35,4	(3,8, 66,9)
	Specifická (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,7	(93,2, 94,2)
	PPV (%)	4,7	(2,9, 7,6)	3,7	(2,3, 6,0)
	NPV (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalence (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Citlivost (%)	61,5	(14,0, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Specifická (%)	95,2	(94,8, 95,6)	93,6	(93,1, 94,1)
	PPV (%)	3,3	(1,4, 7,6)	2,3	(1,3, 4,1)
	NPV (%)	99,9	(98,4, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalence (%)	0,4		0,4	

**Tabulka 23:** NILM Populace ≥ 30 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3 (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 819		Test DNA HPV N = 801*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
≥CIN2	Citlivost (%)	75,0 (15/20)	(53,1, 88,8)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Specificita (%)	62,6 (500/799)	(59,2, 65,9)	48,7 (381/782)	(45,2, 52,2)
	PPV (%)	4,8 (15/314)	(3,4, 5,8)	3,8 (16/417)	(2,9, 4,4)
	NPV (%)	99,0 (500/505)	(98,1, 99,6)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalence (%)	2,4 (20/819)		2,4 (19/801)	
≥CIN3	Citlivost (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Specificita (%)	62,4 (504/808)	(59,0, 65,7)	48,5 (383/790)	(45,0, 52,0)
	PPV (%)	3,2 (10/314)	(2,2, 3,7)	2,4 (10/417)	(1,6, 2,7)
	NPV (%)	99,8 (504/505)	(99,1, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalence (%)	1,3 (11/819)		1,4 (11/801)	

\*18 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Přímé porovnání Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV ukazuje, že Aptima HPV Assay dosahuje podobné citlivosti a statisticky významně lepší specifity testu oproti komerčně dostupnému testu DNA HPV pro detekci  $\geq$ CIN2, jak ukazuje poměr skutečně pozitivních a falešně pozitivní hodnot (Tabulka 24 a Tabulka 25 v uvedeném pořadí).

**Tabulka 24:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Poměr skutečně pozitivních hodnot (Aptima HPV Assay/test DNA HPV) pro ženy s  $\geq$ CIN2 (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

		Test DNA HPV		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Aptima HPV Assay	Pozitivní	13	2	15 (78,9%)
	Negativní	3	1	4
	Celkem	16 (84,2%)	3	19
<b>Poměr skutečně pozitivních hodnot = 0,94 (15/16) (95% CI: 0,67, 1,20)</b>				

**Tabulka 25:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Poměr falešně pozitivních hodnot (Aptima HPV Assay/test DNA HPV) pro ženy s  $<$ CIN2 (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

		Test DNA HPV		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Aptima HPV Assay	Pozitivní	223	59	282 (36,1%)
	Negativní	178	322	500
	Celkem	401 (51,3%)	381	782
<b>Poměr falešně pozitivních hodnot = 0,70 (282/401) (95% CI: 0,64, 0,77)</b>				

**NILM Populace ≥ 30 let: Klinická účinnost Aptima HPV Assay po 3 letech studie**

Způsobilých pro další fázi studie bylo 10 854 hodnotitelných žen ve věku 30 let a starších s výsledky cytologie NILM a platnými výsledky Aptima HPV Assay při úvodním vyšetření. Z žen bez ≥CIN2 dokončilo následnou Pap návštěvu po 1 roce 66,9% (7 251/10 834), 60,2% (6 522/10 825) po 2 letech a 58,6% (6 344/10 818) po 3 letech. Celkově 58,8% (6 380/10 854) žen dokončilo studii (měly ≥CIN2 při úvodním vyšetření nebo při následných vyšetřeních, případně absolvovalo požadované návštěvy).

Z 10 854 žen mělo 540 (5,0%) pozitivní výsledky Aptima HPV Assay při úvodním vyšetření. Z těchto 540 žen mělo 263 (48,7%) buď pozitivní, nebo negativní 3letý status onemocnění na základě výsledků cytologie nebo kolposkopie/biopsie. Zbývajících 10 314 žen mělo negativní výsledky Aptima HPV Assay při úvodním vyšetření. Z těchto 10 314 žen mělo 5 943 (57,6%) buď pozitivní, nebo negativní 3letý status onemocnění. Z 6 206 žen s 3letým statutem onemocnění mělo 47 žen ≥CIN2 včetně 23 žen s ≥CIN3; 6 159 žen mělo normální/CIN1 podle konsenzuálního revizního histologického panelu. Výsledky Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV při úvodním vyšetření a 3letý status onemocnění (zahrnuje úvodní a následná vyšetření) podle konsenzuálního revizního histologického panelu jsou uvedeny v Tabulka 26.

**Tabulka 26:** NILM Populace ≥ 30 let: Klasifikace žen způsobilých pro další fáze podle výsledků Aptima HPV Assay při úvodním vyšetření, výsledků testu DNA HPV při úvodním vyšetření a statusu onemocnění (≥CIN2, ≥CIN3, neověřeno) stanovená při úvodním vyšetření a v následných fázích

Výsledek Aptima HPV Assay	Test DNA HPV	Celkem žen	Ověřený status onemocnění: ≥CIN2		Ověřený status onemocnění: ≥CIN3		Neověřený status onemocnění	
			Ženy s onemocněním (≥CIN2)	Ženy bez onemocnění (≥CIN2)	Ženy s onemocněním (≥CIN3)	Ženy bez onemocnění (≥CIN3)	Ztraceny v následné fázi	Neurčitý*
Pozitivní	Pozitivní	360	22	154	15	161	165	19
Pozitivní	Negativní	150	2	72	1	73	68	8
Pozitivní	Žádný výsledek**	30	2	11	1	12	14	3
Negativní	Pozitivní	304	6	146	3	149	133	19
Negativní	Negativní	9 405	14	5 455	3	5 466	3 735	201
Negativní	Žádný výsledek**	605	1	321	0	322	269	14
<b>Celkem</b>		10 854	47	6 159	23	6 183	4 384	264

\*Ženy, které měly abnormální výsledky cytologických testů v následném období a které neměly následný výsledek konsenzuálního revizního histologického panelu a ženy s neadekvátní cytologií při poslední návštěvě. 174 žen s neurčitým statutem onemocnění dokončilo následná vyšetření podle protokolu.

\*\*635 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

3 leté kumulativní riziko onemocnění (≥CIN2 a ≥CIN3) vychází z Kaplanova-Meierova odhadu (analýza přežívání) a zahrnuje onemocnění detekované při úvodním nebo následném vyšetření. Ženy s některými známkami onemocnění (ASC-US nebo závažnější výsledky cytologie), ale bez výsledku konsenzuálního revizního histologického panelu byly zařazeny do analýzy pomocí metod vícenásobného započtení, aby bylo možno předpovědět počet žen s onemocněním, která by byla zjištěna, pokud ženy podstoupily kolposkopii.

3 leté kumulativní odhady absolutního a relativního rizika pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3 jsou uvedeny v Tabulka 27.

**Tabulka 27:** NILM Populace ≥ 30 let: 3 letá kumulativní Absolutní a relativní rizika\* onemocnění ≥CIN2 a ≥CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV při úvodním vyšetření

	Výsledek testu	Aptima HPV Assay		Test DNA HPV	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
≥CIN2	Pozitivní	7,39 (5,12, 10,59)	22,55 (12,68, 40,10)	6,42 (4,50, 9,13)	22,71 (12,19, 42,29)
	Negativní	0,33 (0,21, 0,51)		0,28 (0,17, 0,47)	
	Prevalence (%)	0,68		0,68	
≥CIN3	Pozitivní	4,66 (2,94, 7,36)	44,12 (16,91, 115,10)	4,14 (2,62, 6,52)	51,33 (17,74, 148,55)
	Negativní	0,11 (0,04, 0,25)		0,08 (0,03, 0,22)	
	Prevalence (%)	0,34		0,35	

\*3 letá kumulativní rizika upravená pro další možné chyby byla podobná rizikům v této tabulce. Vzhledem k očekávaným rozdílům v rizicích v 1. a 2. roce pro dvě skupiny žen v navazující studii (ženy s kolposkopií při úvodním vyšetření a ženy bez kolonoskopie při úvodním vyšetření) byla hlášena pouze 3letá kumulativní rizika pro kombinované skupiny.

3 letá kumulativní prevalence ≥CIN2 a ≥CIN3 u žen s výsledky cytologie NILM při úvodním vyšetření byla 0,68% a 0,34% v uvedeném pořadí. Relativní riziko ≥CIN2 bylo 22,55 (95% CI: 12,68, 40,10), což znamená, že žena s pozitivním Aptima HPV Assay má 22,55krát větší pravděpodobnost onemocnění ≥CIN2 než žena s negativním Aptima HPV Assay. Relativní riziko ≥CIN3 bylo 44,12 (95% CI: 16,91, 115,10).

## Klinická účinnost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku SurePath

### Vzorky SurePath ošetřené pomocí transportního roztoku Aptima

Byly shromážděny vzorky v konzervačním roztoku SurePath od kanadských žen (n = 558), které byly pozvány na následnou schůzku z těchto důvodů: jeden nebo více abnormálních Pap testů, HPV infekce nebo jiný důvod. Alikvotní podíl (0,5 ml) každého vzorku byl přenesen do transferové zkumavky na vzorek Aptima a pak ošetřen pomocí transportního roztoku Aptima. Jeden replikát každého vzorku byl otestován pomocí Aptima HPV Assay. Samostatný alikvotní podíl (1 ml) každého vzorku byl použit k testování pomocí komerčně dostupného testu PCR HPV. Klinická citlivost pro detekci onemocnění, definovaná jako výsledek histologie  $\geq$ CIN3, byla vypočtena pro Aptima HPV Assay i pro test PCR HPV, jak je uvedeno v Tabulka 28, s pozitivními a negativními prediktivními hodnotami.

**Tabulka 28:** Účinnost Aptima HPV Assay a testu PCR HPV pro detekci  $\geq$ CIN3

Účinnost	Aptima HPV Assay N = 558		Test PCR HPV N = 558	
	Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
<b>Citlivost (%)</b>	89,3 (25/28)	(72,8 – 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 – 96,3)
<b>Specifická (%)</b>	56,8 (301/530)	(52,5 – 60,9)	49,1 (260/530)	(44,8 – 53,3)
<b>PPV (%)</b>	9,8 (25/254)	(8,1 – 11,2)	8,5 (25/295)	(7,0 – 9,5)
<b>NPV (%)</b>	99,0 (301/304)	(97,6 – 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 – 99,7)
<b>Prevalence (%)</b>	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

Tabulka 29: Citlivost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačních roztocích SurePath a ThinPrep

Genotyp HPV	Kopii/reakci	ThinPrep	SurePath
		% pozitivních (95% CI)	% pozitivních (95% CI)
16	60	98,3 (91,1 – 99,7)	100 (94,0 – 100)
18	100	100 (94,0 – 100)	100 (94,0 – 100)
31	25	100 (94,0 – 100)	95,0 (86,3 – 98,3)
33	60	96,7 (88,6 – 99,1)	98,3 (91,1 – 99,7)
35	25	100 (94,0 – 100)	100 (94,0 – 100)
39	25	100 (94,0 – 100)	91,7 (81,9 – 96,4)
45	40	100 (94,0 – 100)	95,0 (86,3 – 98,3)
51	250	100 (94,0 – 100)	100 (94,0 – 100)
52	600	100 (94,0 – 100)	98,3 (91,1 – 99,7)
56	100	98,3 (91,1 – 99,7)	93,3 (84,1 – 97,4)
58	50	95,0 (86,3 – 98,3)	93,3 (84,1 – 97,4)
59	75	96,7 (88,6 – 99,1)	91,7 (81,9 – 96,4)
66	150	98,3 (91,1 – 99,7)	95,0 (86,3 – 98,3)
68	30	96,7 (88,6 – 99,1)	93,3 (84,1 – 97,4)

### Účinnost Aptima HPV Assay při odběru cervikálních vzorků a jejich transportu

Spárované vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep a vzorky soupravy Aptima CSCT byly odebrány od 735 subjektů. Jeden mililitr (1,0 ml) každého vzorku v konzervačním roztoku ThinPrep byl naředěn do 2,9 ml přepravního roztoku pro vzorky Aptima a jeden replikát byl otestován pomocí Aptima HPV Assay v systému Tigris DTS. Jeden replikát každého vzorku CSCT byl rovněž testován pomocí Aptima HPV Assay. Byla určena procentuální shoda Aptima HPV Assay mezi vzorkem v konzervačním roztoku ThinPrep a vzorkem CSCT, výsledky jsou uvedeny v Tabulka 30.

Procentuální pozitivní shoda dosáhla hodnoty 95,9% (95% CI: 92,6 – 97,8); procentuální negativní shoda dosáhla hodnoty 95,5% (95% CI: 93,3 – 97,0); celková shoda dosáhla hodnoty 95,6% (95% CI: 93,9 – 96,9). Byla pozorována silná korelace mezi kapalnými cytologickými vzorky a vzorky v transportní soupravě ( $\kappa = 0,90$ ).

**Tabulka 30:** Celkové výsledky shody Aptima HPV Assay mezi vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep a vzorky v soupravě pro odběr a transport cervikálních vzorků Aptima testovanými v systému Tigris DTS

		Vzorek v konzervačním roztoku ThinPrep		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Vzorek soupravy Aptima CSCT	Pozitivní	234	22	256
	Negativní	10	469	479
	<b>Celkem</b>	<b>244</b>	<b>491</b>	<b>735</b>

Pozitivní shoda = 95,9% (92,6 – 97,8)  
 Negativní shoda = 95,5% (93,3 – 97,0)  
 Celková shoda = 95,6% (93,9 – 96,9)  
 koeficient kappa = 0,90



## Analytická citlivost

Limit detekce (LOD) při klinickém cutoff je koncentrace RNA HPV, která poskytuje kladný výsledek (nad klinický cutoff) 95% celkového času. LOD Aptima HPV Assay byl určena testováním zředěných panelů transkriptů *in vitro* (IVT) pro všech 14 vysoce rizikových genotypů a 4 buněčné linie infikované HPV: SiHa, HeLa, MS751 a ME180 (ATCC, Manassas, Virginia). Pro panely IVT byl transportní roztok vzorků před testováním uměle obohacen o IVT v různých koncentracích a poté zředěn jednotlivými negativními vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep. Pro panely buněk infikovaných HPV byly fondy HPV negativních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep před testováním uměle obohaceny o HPV infikované buňky v různých koncentracích a poté zředěny transportním roztokem vzorků. Třicet replikátů každé úrovně kopií bylo testováno s každou ze dvou šarží reagensů pro celkem 60 replikátů. Testování bylo prováděno v průběhu 14 dní, při 1 až 12 cyklech provedených denně a s 5 replikáty daného genotypu a testování koncentrace v každém cyklu. Detekční limit 95% byl vypočten z probitové regresní analýzy výsledků positivity pro každý panel ředění.

Výsledky probitové regresní analýzy, Tabulka 31, ukazují, že HPV 16, 18, 31, 33, 35, 38, 45, 58, 59 a 68 měly 95% detekční limity při méně než 100 kopiích/reakci a typy 51, 52, 56 a 66 měly 95% detekční limity při 100 až 300 kopiích/reakci. Čtyři testované buněčné linie měly 95% detekční limity menší než 1 buňka/reakci.

**Tabulka 31:** Limit detekce v klinickém cutoff Aptima HPV Assay

Cíl	Limit detekce* (95% CI)
HPV 16	48,7 (36,6 – 72,2)
HPV 18	80,9 (60,4 – 118,4)
HPV 31	18,6 (14,2 – 27,3)
HPV 33	49,1 (37,0 – 71,3)
HPV 35	19,1 (14,2 – 29,1)
HPV 39	24,6 (19,1 – 34,4)
HPV 45	33,8 (25,7 – 49,4)
HPV 51	206,6 (157,5 – 297,7)
HPV 52	266,2 (205,5 – 373,8)
HPV 56	100,1 (81,9 – 129,9)
HPV 58	48,0 (37,3 – 68,7)
HPV 59	49,0 (36,4 – 75,9)
HPV 66	168,7 (129,6 – 241,1)
HPV 68	27,0 (20,3 – 40,1)
SiHa	0,30 (0,24 – 0,43)
HeLa	0,18 (0,14 – 0,29)
ME180	0,11 (0,09 – 0,16)
MS751	0,19 (0,14 – 0,33)

\*počet kopií na reakci u transkriptů *in vitro* a buněk na reakci u buněčných linií

## Přesnost testu

Přesnost Aptima HPV Assay byla hodnocena ve dvou studiích pomocí stejného 20 členného panelu. 1. studie provedená na 3 externích testovacích pracovištích měla určit reprodukovatelnost testu. 2. studie provedená interně měla změřit opakovatelnost testu. Panel obsahoval 10 členů HPV pozitivních s koncentracemi na limitu detekce testu nebo nad ním (očekávaná pozitivita:  $\geq 95\%$ ), 4 členy HPV pozitivní s koncentracemi pod limitem detekce testu (očekávaná pozitivita:  $> 0\%$  až  $< 25\%$ ) a 6 členů HPV negativních. HPV pozitivní členy panelu byly připraveny obohacením transkriptů RNA *in vitro* (IVT) do transportní živné půdy vzorků (STM) nebo HPV infikovaných kultivovaných buněk (SiHa, HeLa, ME180 a MS751; ATCC, Manassas, Virginia) v roztoku PreservCyt. HPV negativní členy panelu byly připraveny pomocí STM nebo směsných reziduálních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep.

V rámci 1. studie 2 laboranti na každém ze 3 testovacích pracovišť (1 přístroj na pracoviště) provedli 1 pracovní seznam Aptima HPV Assay denně po 3 dny pro každou ze 3 šarží reagensií. Každý pracovní seznam obsahoval 3 replikáty každého z členů panelu reprodukovatelnosti. Sto šedesát dva (162) jednotlivých zkumavek se vzorky bylo testováno pro každý člen panelu (3 pracoviště  $\times$  1 přístroj  $\times$  2 laboranti  $\times$  3 šarže  $\times$  3 pracovní seznamy  $\times$  3 replikáty). Ve 2. studii bylo provedeno testování interně po dobu 20 dní s celkem 162 reakcemi testovanými pro každý člen panelu (1 místo  $\times$  3 přístroje  $\times$  3 laboranti  $\times$  3 šarže  $\times$  2 pracovní seznamy  $\times$  3 replikáty).

Členy panelu jsou popsány v Tabulka 32a (panel členů s očekávanými pozitivními výsledky) a Tabulka 32b (panel členů s očekávanými negativními výsledky), spolu se shrnutím souhlasu s očekávanými výsledky a hodnotami S/CO analytu v 2,5., 50. a 97,5. percentilech distribuce S/CO. Variabilita S/CO analytu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky je uvedena v Tabulka 33 pro 1. studii a v Tabulka 34 pro 2. studii.

Pozitivní shoda pro HPV pozitivní členy panelu s koncentracemi na nebo nad limitem detekce testu se pohybovala od 95,1% do 100% v 1. studii a od 93,2% do 100% v 2. studii pro 9 z 10 členů panelu. Zbývající HPV pozitivní člen panelu dosáhl 77,2% shody v 1. studii a 79,0% shody ve 2. studii, tedy méně než očekávané, ale byl v rámci 2 studií konzistentní. Negativní shoda pro HPV vysoce negativní členy panelu s koncentracemi pod limitem detekce testu se pohybovala od 78,8% do 93,8% v 1. studii a od 82,1% do 95,7% ve 2. studii. Shoda s očekávanými výsledky pro HPV negativní členy panelu se pohybovala od 96,9% do 100% v 1. studii a od 96,3% do 100% ve 2. studii.

**Tabulka 32a:** 1. a 2. studie reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay: Popis panelu, pozitivní shoda a distribuce percentilů hodnot analytu S/CO pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu (kopií nebo buněk/reakcí)	1. studie (3 testovací pracoviště)	2. studie (1 testovací pracoviště)
	% pozitivní shody (95% CI)	% pozitivní shody (95% CI)
HPV 16 a HPV 18 IVT (100 kopií)	100 (161/161) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Buňky SiHa (3 buňky) a buňky HeLa (7,5 buněk)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 18 IVT (100 kopií)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (160/160) (97,7, 100)
HPV 16 IVT (100 kopií)	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Buňky MS751 (1 buňka)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)
Buňky ME180 (0,3 buňky)	95,1 (154/162) (90,6, 97,5)	93,2 (151/162) (88,3, 96,2)
HPV 18 IVT (30 kopií)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 16 IVT (30 kopií)	100 (162/162) (97,7, 100)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
Buňky HeLa (2,5 buňky)	100 (162/162) (97,7, 100)	95,6 (152/159) (91,2, 97,9)
Buňky SiHa (1 buňka)*	77,2 (125/162) (70,1, 83,0)	79,0 (128/162) (72,1, 84,6)

IVT = transkript *in vitro*. IVT byl přidán do STM a buňky byly přidány do roztoku PreservCyt.

\*Očekávané % pozitivní shody ~95%; pozorována nižší možná kvůli variabilitě výroby člena panelu.

**Tabulka 32b:** 1. a 2. studie reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay: Popis panelu, negativní shoda a distribuce percentil hodnot analytu S/CO pro členy panelu s očekávanými negativními výsledky

Popis panelu (kopií nebo buněk/reakci)	1. studie (3 testovací pracoviště)	2. studie (1 testovací pracoviště)
	% negativní shody (95% CI)	% negativní shody (95% CI)
HPV 18 IVT (1 kopie)*	78,8 (126/160) (71,8, 84,4)	83,3 (135/162) (76,8, 88,3)
HPV 16 IVT (1 kopie)*	80,9 (131/162) (74,1, 86,2)	88,3 (143/162) (82,4, 92,4)
Buňky HeLa (0,05 buňky)*	79,0 (128/162) (72,1, 84,6)	82,1 (133/162) (75,5, 87,2)
Buňky SiHa (0,03 buňky)*	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
STM šarže 1	100 (162/162) (97,7, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
STM šarže 2	99,4 (160/161) (96,6, 99,9)	100 (162/162) (97,7, 100)
STM šarže 3	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)
Fond ThinPrep 1	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)	97,5 (158/162) (93,8, 99,0)
Fond ThinPrep 2	96,9 (157/162) (93,0, 98,7)	96,3 (156/162) (92,2, 98,3)
Fond ThinPrep 3	100 (162/162) (97,7, 100)	99,4 (161/162) (96,6, 99,9)

STM = transportní živná půda vzorků; IVT = transkript *in vitro*. IVT byl přidán do STM a buňky byly přidány do roztoku PreservCyt.

\*Očekávané % negativní shody > 75% a < 100%.

**Tabulka 33:** 1. studie reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay: Variabilita signálu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu (kopie nebo buňky/reakcí)	n	Střední S/CO	Mezi pracovišti		Mezi laboranty		Mezi šaržemi		Mezi pracovními seznamy		V pracovních seznamech		Celkem	
			SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)
HPV 16 a HPV 18 IVT (100 kopií)	161 <sup>^</sup>	23,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,9	4,0	0	0	1,6	7,0	1,9	8,1
Buňky SiHa (3 buňky) a buňky HeLa (7,5 buněk)	162	17,9	0	0	1,4	8,1	0	0	0,6	3,1	5,1	28,6	5,3	29,9
HPV 18 IVT(100 kopií)	162	11,8	0	0	0	0	0,8	6,4	0,1	0,9	1,2	10,1	1,4	12,0
HPV 16 IVT(100 kopií)	162	10,8	0,2	1,5	0	0	0,1	1,1	0,3	2,6	0,3	3,1	0,5	4,5
Buňky MS751 (1 buňka)	162	13,3	0,3	2,1	0	0	1,0	7,8	0,9	7,1	2,2	16,2	2,6	19,4
Buňky ME180 (0,3 buňky)	162	6,5	0,2	3,2	0	0	0,6	8,6	0,4	5,5	2,4	36,2	2,5	37,7
HPV 18 IVT(30 kopií)	162	9,0	0,7	7,3	0	0	0,7	7,2	0,8	8,3	2,3	25,3	2,6	28,5
HPV 16 IVT(30 kopií)	162	10,8	0,1	0,8	0	0	0,1	1,3	0,4	3,8	0,9	8,4	1,0	9,3
Buňky HeLa (2,5 buňky)	162	12,4	0	0	0,4	3,3	0,4	3,1	0	0	2,3	18,4	2,4	19,0
Buňky SiHa (1 buňka)	162	7,5	0,3	3,7	1,0	13,0	0	0	0	0	4,8	63,6	4,9	65,0

SO = standardní odchylka; KV = koeficient variace; IVT = transkript *in vitro*; S/CO = poměr signálu ke cutoffu

<sup>^</sup>Jeden vzorek měl neplatný výsledek Aptima HPV Assay a nebyl zahrnut do analýz.

**Poznámka:** Variabilita některých faktorů může být číselně záporná. K tomu může dojít, pokud je variabilita vzhledem k těmto faktorům velmi malá. V těchto případech jsou SO a KV zobrazeny jako 0.

**Tabulka 34:** 2. studie reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay: Variabilita signálu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu (kopie nebo buňky/reakci)	n	Střední S/CO	Mezi přístroji		Mezi laboranty		Mezi šaržemi		Mezi pracovními seznamy		V pracovních seznamech		Celkem	
			SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)
HPV 16 a HPV 18 IVT (100 kopií)	162	23,2	0,4	1,5	0,6	2,3	0,8	3,4	0,8	3,4	1,5	6,3	2,0	8,4
Buňky SiHa (3 buňky) a buňky HeLa (7,5 buněk)	162	18,6	0	0	1,7	9,3	0	0	3,5	18,6	3,7	20,0	5,4	28,9
HPV 18 IVT(100 kopií)	160 <sup>^</sup>	11,9	0,1	0,6	0,2	1,6	0,8	7,0	0,4	3,6	1,3	11,3	1,7	13,8
HPV 16 IVT(100 kopií)	162	10,8	0	0	0,1	1,3	0	0	0,2	2,2	0,7	6,1	0,7	6,6
Buňky MS751 (1 buňka)	162	13,6	0	0	0,6	4,3	0	0	2,5	18,4	2,1	15,2	3,3	24,2
Buňky ME180 (0,3 buňky)	162	5,8	0	0	0,6	10,8	0,5	9,4	2,2	36,9	1,7	29,7	2,9	49,5
HPV 18 IVT(30 kopií)	162	8,8	0,4	4,4	0,5	6,0	0,7	7,9	1,0	11,5	1,9	21,4	2,4	26,6
HPV 16 IVT(30 kopií)	162	10,5	0	0	0,1	1,3	0,2	2,0	1,6	14,9	1,2	11,2	2,0	18,8
Buňky HeLa (2,5 buňky)	159 <sup>^</sup>	12,0	0,6	5,1	1,0	8,5	0	0	2,8	23,8	2,0	16,6	3,7	30,6
Buňky SiHa (1 buňka)	162	7,4	0,9	12,5	0	0	0,7	9,3	1,8	24	4,2	56,8	4,7	63,8

SO = standardní odchylka; KV = koeficient variace; IVT = transkript *in vitro*; S/CO = poměr signálu ke cutoffu

<sup>^</sup>Pět vzorků mělo neplatný výsledek Aptima HPV Assay (2 pro HPV 18 IVT (100 kopií), 3 pro buňky HeLa (2,5 buňky)) a nebyly zahrnuty do analýz.

**Poznámka:** Variabilita některých faktorů může být číselně záporná. K tomu může dojít, pokud je variabilita vzhledem k těmto faktorům velmi malá. V těchto případech jsou SO a KV zobrazeny jako 0.

Proběhla třetí studie, která měla zjistit reprodukovatelnost testu testováním 6členného panelu směsných klinických vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep. Šest jedinečných fondů reziduálních HPV negativních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep bylo připraveno jako matrice, z nichž dvě byly testovány jako HPV negativní členy panelu. Čtyři jedinečné fondy HPV pozitivních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep byly použity pro přípravu nízce (n = 2) a vysoce (n = 2) HPV pozitivních členů panelu. Nízce pozitivní členy panelu měly koncentrace na limitu detekce testu (očekávaná pozitivita:  $\geq 95\%$  pro každý jednotlivý HPV pozitivní fond z testování sériových řadění fondů). Vysoce pozitivní členy panelu měly u 1–2 protokolů koncentrace nad předpokládaným limitem detekce pro každý jednotlivý HPV pozitivní fond (očekávaná pozitivita: 100% pozitivita). Každý člen panelu byl v den testování přenesen (1 ml) do transferové zkumavky na vzorek Aptima obsahující STM. Testování bylo provedeno interně 2 laboranty pomocí 1 šarže reagentie a 3 přístrojů během 6 dní (3 dny na každého laboranta), kteří testovali 2 cykly na den, kdy byl panel testován v duplikátu.

Členy panelu jsou popsány v Tabulka 35, spolu se shrnutím shody s očekávanými výsledky a hodnotami S/CO analytu v 2,5., 50. a 97,5. percentilech distribuce signálu. Variabilita S/CO analytu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky je uvedena v Tabulka 36.

Shoda byla 100% pro vysoce HPV pozitivní členy panelu,  $\geq 98,6\%$  pro nízce HPV pozitivní členy panelu a  $\geq 94,4\%$  bylo pro HPV negativní členy panelu.

**Tabulka 35:** 3. studie reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay: Popis panelu, procento shody

Popis panelu	% shody (95% CI)
Nízce pozitivní 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Nízce pozitivní 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Vysoce pozitivní 1	100 (72/72) (94,9, 100)
Vysoce pozitivní 2	100 (72/72) (94,9, 100)
Negativní 1	98,6 (71/72) (92,5, 99,8)
Negativní 2	94,4 (68/72) (86,6, 97,8)

**Tabulka 36:** 3. studie reprodukovatelnosti Aptima HPV Assay: Analýza signálu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu	n	Střední S/CO	Mezi přístroji		Mezi laboranty		Mezi šaržemi		Mezi pracovními seznamy		V pracovních seznamech		Celkem	
			SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)
Nízce pozitivní 1	72	9,8	0	0	0	0	0	0	2,2	22,8	3,0	30,4	3,7	38,0
Nízce pozitivní 2	72	10,5	0	0	2,2	21,0	0,9	9,0	3,7	35,3	2,7	26,1	5,2	49,5
Vysoce pozitivní 1	72	22,7	1,3	5,6	0	0	0,1	0,5	3,0	13,3	3,7	16,4	5,0	21,9
Vysoce pozitivní 2	72	23,9	0	0	0	0	0	0	2,9	12,3	3,0	12,4	4,2	17,4

SO = standardní odchylka; KV = koeficient variace; S/CO = poměr signálu ke cutoffu

**Poznámka:** Variabilita některých faktorů může být číselně záporná. K tomu může dojít, pokud je variabilita vzhledem k těmto faktorům velmi malá. V těchto případech jsou SO a KV zobrazeny jako 0.

## Zkřížená reaktivita

Analytická specifita Aptima HPV Assay byla hodnocena s roztokem živné půdy PreservCyt zředěným v poměru 1:2,9 s STM a obohaceným o kultivované bakterie, kvasinky nebo plísňe, o kultivovaný virus nebo transkripty HPV s nízkým stupněm rizika *in vitro*. Organismy a testované koncentrace jsou uvedeny v Tabulka 37. Kritéria studie pro posuzování vlivu přítomnosti mikroorganismů na specifitu testu byly založeny na pozitivitě. Zkřížená reaktivita s níže rizikovými genotypy HPV 26, 67, 70 a 82, s žádným jiným z ostatních testovaných organismů.

**Tabulka 37:** Panel analytické specifity: Organismy a koncentrace bez zkřížené reaktivity

Organismus	Koncentrace testu bez zkřížené reaktivity	Organismus	Koncentrace testu bez zkřížené reaktivity
<b>Bakterie</b>			
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Micrococcus luteus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mobiluncus curtisii</i>	2×10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Atopobium vaginae</i>	5×10 <sup>7</sup> CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma fermentans</i>	5×10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma genitalium</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Mycoplasma hominis</i>	5×10 <sup>7</sup> CFU/ml
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Bifidobacterium breve</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae a Chlamydia trachomatis</i>	2,5×10 <sup>7</sup> CFU/ml 2,3×10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
<i>Campylobacter fetus-fetus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	3,2×10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Clostridium difficile</i>	6×10 <sup>7</sup> CFU/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Ruminococcus productus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Fingoldia magna</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml		



**Tabulka 37:** Panel analytické specifity: Organismy a koncentrace bez zkřížené reaktivity (pokračování)

Organismus	Koncentrace testu bez zkřížené reaktivity	Organismus	Koncentrace testu bez zkřížené reaktivity
<b>Kvasinky/prvoci</b>			
<i>Candida albicans</i>	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1×10 <sup>7</sup> buněk/ml
<b>Viry</b>			
Adenovirus 2	1×10 <sup>7</sup> vp/ml	Herpes simplex virus 1	2,5×10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
Cytomegalovirus	5,6×10 <sup>2</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Herpes simplex virus 2	5×10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
Epstein-Barr virus	4,3×10 <sup>6</sup> vp/ml	SV40	1,2×10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml
HIV-1	1,0×10 <sup>6</sup> kopií/ml		
<b>Necílené genotypy HPV</b>			
HPV 6	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 61	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 11	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	<b>HPV 67</b>	1 kopie/ml
<b>HPV 26</b>	2,5 kopie/ml	HPV 69	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 30	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	<b>HPV 70</b>	1 kopie/ml
HPV 34	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 71	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 42	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 73	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 43	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 81	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 44	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	<b>HPV 82</b>	1 kopie/ml
HPV 53	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml	HPV 85	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml
HPV 54	2,5×10 <sup>6</sup> kopií/ml		

vp = virové částice

CFU = jednotky tvořící kolonie

TCID<sub>50</sub> = infekční dávka tkáňové kultury 50

**Poznámka:** Tučný text označuje typy, kde byla zaznamenána zkřížená reaktivita (> 5 % pozitivita) při testování v koncentracích větších, než je uvedeno v tabulce.

Analytická citlivost Aptima HPV Assay v přítomnosti mikroorganismů byla vyhodnocena se stejným panelem popsáním v Tabulka 37, který byl také obohacen nízkou koncentrací HPV infikovaných SiHa buněk (1 buňka na reakci). Kritéria studie pro posuzování vlivu přítomnosti mikroorganismů na citlivost testu byly založeny na pozitivitě. Citlivost Aptima HPV Assay nebyla ovlivněna žádným z testovaných organismů.

## Interference

Látky popsané v Tabulka 38 byly jednotlivě přidány do roztoku PreservCyt rozředěným pomocí STM při 1% a 10% obj/obj nebo hmot/obj; potom byly testovány pomocí Aptima HPV Assay. Všechny látky byly testovány v přítomnosti a nepřítomnosti kultivovaných buněk infikovaných HPV (SiHa, 3 buňky/reakci). Interference byly pozorovány u dvou ze sedmi lubrikantů obsahujících Polyquaternium 15 a jednoho z pěti antimykotik, které obsahovalo tiokonazol. Interference nebyly pozorovány u žádných dalších testovaných látek.

Tabulka 38: Látky testované pro případnou interferenci s Aptima HPV Assay

Kategorie produktů	Značka nebo typ produktu	Nejvyšší testovaná koncentrace*, která neinterferovala s účinností testu
<b>Lubrikant</b>	KY Sensual Mist	10% obj/obj
	KY Warming Jelly	10% hmot/obj
	KY Warming Liquid	10% obj/obj
	Osobní lubrikant značky CVS	10% hmot/obj
	Hřejivý masážní krém a osobní lubrikant značky Target	10% obj/obj
	Osobní lubrikant Astroglide	0,3% hmot/obj (testovací vzorek 0,075% hmot/obj)
	Lubrikační kapalina značky Target	0,1% obj/obj (testovací vzorek 0,025% obj/obj)
<b>Spermicid</b>	Vaginální antikoncepce Gynol II Original Formula	10% hmot/obj
	Vaginální antikoncepce Gynol II Extra Strength	10% hmot/obj
	Vaginální antikoncepční pěna Delfen	10% hmot/obj
	Vaginální antikoncepce Encare	10% hmot/obj
	Vaginální antikoncepce Conceptrol	10% hmot/obj
<b>Antimykotika/ potlačení svědění</b>	Vagisil Maximum Strength	10% hmot/obj
	Monistat Soothing Care	10% hmot/obj
	Monistat 3 Combination Pack	10% hmot/obj
	Target Tioconazole 1	0,3% hmot/obj (testovací vzorek 0,075% hmot/obj)
	Target Miconazole 3	10% hmot/obj
<b>Ledová kyselina octová</b>	EMD M/N AX0073-11	10% obj/obj
<b>Plná krev</b>	Plná krev	10% obj/obj

\*Osobní lubrikanty obsahující Polyquaternium 15.

## Očekávané výsledky testů systému Panther: Prevalence vysoce rizikové mRNA HPV

Prevalence infekce vysoce rizikovým HPV se značně liší a je ovlivněna několika faktory, z nichž nejvýznamnějším je věk.<sup>32, 33</sup> Mnohé studie zkoumaly prevalenci HPV určenou pomocí detekce DNA HPV, ale pouze několik studií hlásí prevalenci založenou na detekci onkogenní mRNA HPV. Ženy z řady klinických pracovišť (n = 18) představující široké geografické rozložení a rozmanitou populaci (10 států v USA) bylo zařazeno do prospektivní klinické studie s názvem CLEAR.<sup>34</sup> Jak bylo určeno pomocí Aptima HPV Assay v systému Panther, prevalence mRNA HPV pozitivních vzorků zjištěná v klinickém hodnocení byla kvalifikována celkově, podle věkových skupin a testovacího pracoviště. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 39 pro ASC-US (atypické dlaždicové buňky neurčeného významu) a NILM (negativní intraepiteliální léze nebo malignity) v populaci.

**Tabulka 39:** Prevalence mRNA vysoce rizikového HPV podle věkových skupin, testovacího pracoviště a celkem

	% poměru pozitivivity (x/n)	
	ASC-US Populace (≥ 21 let)	NILM Populace (≥ 30 let)
<b>Vše</b>	42,3 (404/956)	4,7 (512/10 860)
<b>Věková skupina (roky)</b>		
<b>21 až 29</b>	60,0 (251/418)	Neuplatňuje se
<b>30 až 39</b>	38,1 (101/265)	6,8 (286/4192)
<b>≥ 40</b>	19,0 (52/273)	3,4 (226/6668)
<b>Testovací pracoviště</b>		
<b>1</b>	41,5 (134/323)	3,7 (304/8286)
<b>2</b>	43,1 (137/318)	9,2 (118/1285)
<b>3</b>	42,2 (133/315)	7,0 (90/1289)

Neuplatňuje se = Není k dispozici

## Uspořádání klinické studie Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep

Aptima HPV Assay v systému Panther byl hodnocen pomocí reziduálních vzorků referenční cytologie odebraných od plnoletých žen během prospektivní, multicentrické americké klinické studie pod názvem CLEAR.<sup>34</sup>

### Klinická studie CLEAR – úvodní hodnocení

Klinická studie CLEAR byla provedena k určení klinické účinnosti Aptima HPV Assay v systému Tigris DTS pro detekci cervikální intraepiteliální neoplazie stupně 2 nebo závažnějšího cervikálního onemocnění ( $\geq$ CIN2). Klinická studie CLEAR zahrnovala úvodní hodnocení a následné hodnocení po 3 letech. Ženy byly zařazeny do studie ASC-US nebo studie NILM na základě výsledků cytologie z rutinního screeningu rakoviny děložního čípku. Studie ASC-US zahrnovala populaci žen 21 let a starší s výsledky cytologie ASC-US a studie NILM zahrnovala populaci žen 30 let a starší s výsledky cytologie NILM. Účelem studie NILM byla podpora nároku na doplňková vyšetření u žen ve věku od 30 let, protože ženy v této věkové skupině s výsledky cytologie závažnějším než ASC-US by měly absolvovat kolposkopii bez ohledu na svůj status HPV.<sup>35</sup>

Zařazeny byly ženy z 18 klinických pracovišť, převážně gynekologických/porodních klinik, zahrnující široké geografické rozložení a pestrá populace. Tyto ženy byly rozděleny do studií ASC-US a NILM na základě jejich referenčních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep. Při úvodním vyšetření byly nejprve testovány zbývající referenční vzorky od žen ve studii ASC-US nebo studii NILM pomocí Aptima HPV Assay v systému Tigris DTC a komerčně dostupného testu DNA HPV. Vzorky potom byly archivovány a skladovány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dokud nebyly následně otestovány pomocí Aptima HPV Assay v systému Panther.

Při úvodním vyšetření klinické studie CLEAR (úvodní fáze) byla u všech žen ve studii ASC-US provedena kolposkopie, bez ohledu na jejich výsledky testu HPV. Byly získány biopsie endocervikální kyretáže (ECC) a biopsie cervikálního vzorku (1 biopsie z každého ze 4 kvadrantů). Pokud byla viditelná léze, byla provedena biopsie cervikálního vzorku (řízená metoda, 1 biopsie na lézi) a v kvadrantech bez viditelné léze byla provedena biopsie skvamokolumnární junkce (náhodná metoda).

Ve studii NILM byla při úvodním vyšetření u žen s pozitivním Aptima HPV Assay v systému Tigris DTS nebo komerčně dostupným testem DNA HPV, stejně jako u náhodně vybraných žen s negativním výsledkem obou testů, provedena kolposkopie. Náhodně vybrané ženy, u kterých byly oba testy negativní, byly zahrnuty s ohledem na korekci ověření zkrácení s upraveným odhadnutým výkonem generovaným pomocí metody vícenásobného započtení. Biopsie ECC byla získána od každé ženy, která podstoupila kolposkopii. Punch biopsie byly získány pouze z viditelné léze (řízená metoda; 1 biopsie na lézi).

Status onemocnění byl určen pomocí konsenzuálního revizního histologického panelu, který byl založen na shodě nejméně 2 odborných patologů. Odborní patologové neznali status HPV u daných žen. Skryt byl také status cytologie, jakož i diagnóza histologie druhého odborníka. Pokud se všichni 3 patologové neshodli, všichni 3 patologové revidovali vzorky pomocí více-hlavého mikroskopu, aby dosáhli konsensu. Výzkumníci, lékaři ani ženy neznali výsledky testu HPV až do skončení kolposkopie, aby se zabránilo zkreslení.

Při úvodním vyšetření byla hodnocena klinická účinnost Aptima HPV Assay pro detekci  $\geq$ CIN2 a cervikální intraepiteliální neoplazie stupně 3 nebo závažnějšího cervikálního onemocnění ( $\geq$ CIN3) vzhledem ke stavu cervikálního onemocnění určenému při úvodním vyšetření. Byla také určena klinická účinnost komerčně dostupného testu DNA HPV pro přímé srovnání s výsledky Aptima HPV Assay.

## **Klinická studie CLEAR – následné hodnocení**

Ženy ve studii NILM ze 14 klinických pracovišť byly způsobilé k účasti v následné 3 leté fázi studie, pokud: i) při úvodním vyšetření absolvovaly kolposkopii a neměly  $\geq$ CIN2 nebo ii) při úvodním vyšetření kolposkopii neabsolvovaly. Následná fáze studie se skládala z každoročních návštěv. Při těchto návštěvách byl u každé ženy proveden odběr cervikálního vzorku pro cytologii a některé ženy byly také testovány pomocí komerčně dostupného testu HPV. U žen s ASC-US nebo závažnějšími výsledky cytologie v následném období byla provedena kolposkopie pomocí stejné biopsie a byly provedeny histologické postupy vyšetření pro hodnocení základních údajů studie NILM. Status cervikálního onemocnění při následné návštěvě byl považován za „negativní“ podle výsledků cytologie NILM, případně u žen s abnormálními výsledky cytologických testů, na základě normálních výsledků nebo výsledků konsenzuálního revizního histologického panelu CIN1. U žen, u kterých bylo v následném období zjištěno  $\geq$ CIN2, bylo následné období označeno jako ukončené; po jistění  $\geq$ CIN2 již v návštěvách nepokračovaly. U žen, u kterých nebylo v následném období zjištěno  $\geq$ CIN2, ale které se studie účastnily návštěvou v 1. následném roce, případně ve 2. následném roce a které se studie zúčastnily návštěvou ve 3. následném roce, bylo následné období označeno jako ukončené.

Cílem následné studie bylo porovnat kumulativní 3 leté riziko cervikálního onemocnění u žen s úvodními pozitivními výsledky Aptima HPV Assay s kumulativním 3letým rizikem cervikálního onemocnění u žen s úvodními negativními výsledky Aptima HPV Assay. 3letý status cervikálního onemocnění byl určen následujícím způsobem:

- Pozitivní status cervikálního onemocnění ( $\geq$ CIN2 nebo  $\geq$ CIN3) – ženy, u kterých bylo zjištěno  $\geq$ CIN2 na začátku nebo následně.
- Negativní status cervikálního onemocnění ( $<$ CIN2) – ženy, které dokončily následné období bez detekce  $\geq$ CIN2 a u kterých nebyl uveden „neurčitý“ status cervikálního onemocnění.
- Neurčitý status cervikálního onemocnění – ženy, které měly abnormální výsledky cytologických testů v následném období a které neměly následný výsledek konsenzuálního revizního histologického panelu, případně ženy s neadekvátní cytologií při poslední návštěvě.
- Ztraceny v následné fázi – ženy, které nedokončily následné návštěvy a u kterých nebyl status cervikálního onemocnění označen jako „neurčitý“.

Klinická účinnost Aptima HPV Assay v systému Panther pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 byla hodnocena vzhledem k 3 letému statutu cervikálního onemocnění.

## Účinnost testů systému Panther

### ASC-US Populace ≥ 21 let: Klinická účinnost Aptima HPV Assay

Celkem bylo do studie ASC-US zahrnuto 1 252 žen ve věku 21 let a starších s výsledky cytologie ASC-US. Z nich bylo 294 žen vyloučeno. Zbývajících 958 žen bylo způsobilých k testování v systému Panther. U dvou žen chyběly vzorky a 19 mělo status onemocnění označen jako „neurčitý“; všechny byly vyloučeny z analýzy. Zbývajících 937 hodnotitelných žen bylo ve věku 21 let a starších s výsledky cytologie ASC-US, výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther a průkazným statusem onemocnění. Devadesát jedna (91) žen mělo ≥CIN2 a čtyřicet jedna (41) mělo ≥CIN3. Prevalence ≥CIN2 a ≥CIN3 u hodnotitelných žen s výsledky cytologie ASC-US byla 9,7% a 4,4% v uvedeném pořadí. Výsledky Aptima HPV Assay podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu jsou uvedeny v Tabulka 40.

**Tabulka 40:** ASC-US Populace ≥ 21 let: Výsledky Aptima HPV Assay podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu

Výsledek Aptima HPV Assay*	Test DNA HPV	Diagnóza konsenzuálního revizního histologického panelu						
		Neurčitý**	Normální	CIN1	CIN2	CIN3	Rakovina	Celkem
Pozitivní	Pozitivní	6	178	110	40	32	1	367
Pozitivní	Negativní	0	5	2	0	2	0	9
Pozitivní	Žádný výsledek***	0	15	11	0	2	0	28
Negativní	Pozitivní	0	39	15	3	3	0	60
Negativní	Negativní	10	372	53	7	1	0	443
Negativní	Žádný výsledek***	3	39	7	0	0	0	49
<b>Celkem</b>		19	648	198	50	40	1****	956

\*Všechny vzorky měly poslední platné výsledky (po počátečním testování nebo po vyřešení počátečních neplatných výsledků podle postupu).

\*\*19 subjektů absolvovalo návštěvu kolposkopie, ale nebylo možno určit diagnózu z následujících důvodů: < 5 bioptických vzorků získáno s výsledky histologie normální/CIN1 (n = 15), nebyla získána žádná biopsie (n = 3), ztraceny bioptické vzorky (n = 1).

\*\*\*77 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu HPV DNA primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

\*\*\*\*Jeden subjekt měl adenokarcinom in situ (AIS).

Odhady klinické účinnosti Aptima HPV Assay včetně citlivosti, specifity, pozitivní prediktivní hodnoty (PPV) a negativní prediktivní hodnoty (NPV) pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3 na základě vyhodnocení všech biopsií a včetně pouze řízených biopsií jsou uvedeny v Tabulka 41, stejně jako odhady pro komerčně dostupný test DNA HPV.

**Tabulka 41:** Populace ASC-US ≥ 21 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 937		Test DNA HPV N = 863*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
≥CIN2	<b>Všechny biopsie</b>				
	Citlivost (%)	84,6 (77/91)	(75,8, 90,6)	88,8 (79/89)	(80,5, 93,8)
	Specificita (%)	62,1 (525/846)	(58,7, 65,3)	55,8 (432/774)	(52,3, 59,3)
	PPV (%)	19,3 (77/398)	(17,3, 21,2)	18,8 (79/421)	(17,0, 20,4)
	NPV (%)	97,4 (525/539)	(96,0, 98,5)	97,7 (432/442)	(96,2, 98,8)
	Prevalence (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
	<b>Řízené biopsie**</b>				
	Citlivost (%)	90,0 (54/60)	(79,9, 95,3)	93,2 (55/59)	(83,8, 97,3)
	Specificita (%)	60,8 (531/874)	(57,5, 63,9)	54,5 (437/802)	(51,0, 57,9)
	PPV (%)	13,6 (54/397)	(12,0, 15,0)	13,1 (55/420)	(11,7, 14,2)
	NPV (%)	98,9 (531/537)	(97,8, 99,6)	99,1 (437/441)	(97,9, 99,7)
	Prevalence (%)	6,4 (60/934)		6,9 (59/861)	
≥CIN3	<b>Všechny biopsie</b>				
	Citlivost (%)	90,2 (37/41)	(77,5, 96,1)	92,3 (36/39)	(79,7, 97,3)
	Specificita (%)	59,7 (535/896)	(56,5, 62,9)	53,3 (439/824)	(49,9, 56,7)
	PPV (%)	9,3 (37/398)	(8,0, 10,3)	8,6 (36/421)	(7,4, 9,4)
	NPV (%)	99,3 (535/539)	(98,3, 99,8)	99,3 (439/442)	(98,3, 99,8)
	Prevalence (%)	4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	
	<b>Řízené biopsie**</b>				
	Citlivost (%)	93,1 (27/29)	(78,0, 98,1)	96,4 (27/28)	(82,3, 99,4)
	Specificita (%)	59,1 (535/906)	(55,8, 62,2)	52,8 (440/834)	(49,4, 56,1)
	PPV (%)	6,8 (27/398)	(5,7, 7,5)	6,4 (27/421)	(5,5, 7,0)
	NPV (%)	99,6 (535/537)	(98,8, 100)	99,8 (440/441)	(98,9, 100)
	Prevalence (%)	3,1 (29/935)		3,2 (28/862)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

\*\*Výsledek konsenzuální histologie byl odvozen pouze pomocí výsledků z řízených biopsií. Ženy bez řízené biopsie reflektují normální kolposkopie a jsou v těchto analýzách zahrnuty jako bez onemocnění (<CIN2 nebo <CIN3, podle okolností). Pokud byly zahrnuty pouze řízené biopsie, nebylo vždy dosaženo konsenzu.

Při hodnocení všech biopsií byly klinické odhady citlivosti Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV, kde jsou k dispozici oba výsledky testu pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3, podobné (nebyly statisticky významné rozdíly v odhadech citlivosti). Pro  $\geq$ CIN2 byl rozdíl citlivosti -4,5% (95% CI: -12,2%, 2,5%). Odhady klinické specifity Aptima HPV Assay pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 byly vyšší než u komerčně dostupného testu DNA HPV (rozdíly v odhadech specifity byly statisticky významné). Pro  $\geq$ CIN2 byl rozdíl specifity 6,1% (95% CI: 4,2%, 8,2%). NPV byly podobné, ale pro detekci  $\geq$ CIN2 byla PPV pro Aptima HPV Assay mírně vyšší než PPV pro komerčně dostupný test DNA HPV (19,3% vs. 18,8%).

Z 91 případů  $\geq$ CIN2 bylo 60 (65,9%) identifikováno při přímé biopsii a 31 (34,1%) bylo identifikováno z náhodných nebo ECC biopsií (tedy nikoli při přímé biopsii). Tato zjištění jsou srovnatelná s výsledky z publikovaných studií, v nichž bylo zjištěno přibližně 25% až 40% případů  $\geq$ CIN2 pouze ze vzorků náhodných, případně ECC biopsií.<sup>36, 37</sup> Použití pouze přímých biopsií k určení statutu onemocnění (za předpokladu, že ženy bez řízené biopsie měly normální výsledky histologie, protože nebyly zjištěny žádné viditelné léze), dosáhly hodnoty  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 ve studii 6,4% a 3,1% v uvedeném pořadí. Odhady klinické citlivosti pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 byly vyšší u obou testů pomocí pouze řízené biopsie než odhady vypočtené s využitím všech biopsií. Pro oba testy byla klinická specifita získaná pouze pomocí řízené biopsie podobná specifitě získané se všemi zahrnutými biopsiemi. Proto, pokud se použily pouze řízené biopsie, byla specifita Aptima HPV Assay výrazně vyšší než u komerčně dostupného testu DNA HPV.

Odhady klinické účinnosti Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV jsou zobrazeny podle věkových skupin v Tabulka 42 a Tabulka 43 ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 v uvedeném pořadí, na základě vyhodnocení všech biopsií).



**Tabulka 42:** Populace ASC-US ≥ 21 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN2 podle věkových skupin

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 937		Test DNA HPV N = 863*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
21 až 29 let		N = 415		N = 389	
	Citlivost (%)	88,5 (54/61)	(78,2, 94,3)	94,9 (56/59)	(86,1, 98,3)
	Specifická (%)	44,9 (159/354)	(39,8, 50,1)	35,5 (117/330)	(30,5, 40,8)
	PPV (%)	21,7 (54/249)	(19,3, 23,9)	20,8 (56/269)	(19,0, 22,5)
	NPV (%)	95,8 (159/166)	(92,3, 98,1)	97,5 (117/120)	(93,6, 99,4)
	Prevalence (%)	14,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
30 až 39 let		N = 261		N = 238	
	Citlivost (%)	85,0 (17/20)	(64,0, 94,8)	80,0 (16/20)	(58,4, 91,9)
	Specifická (%)	66,4 (160/241)	(60,2, 72,1)	61,9 (135/218)	(55,3, 68,1)
	PPV (%)	17,3 (17/98)	(13,1, 21,1)	16,2 (16/99)	(11,8, 19,8)
	NPV (%)	98,2 (160/163)	(95,7, 99,6)	97,1 (135/139)	(94,1, 99,1)
	Prevalence (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
≥ 40 let		N = 261		N = 236	
	Citlivost (%)	60,0 (6/10)	(31,3, 83,2)	70,0 (7/10)	(39,7, 89,2)
	Specifická (%)	82,1 (206/251)	(76,9, 86,3)	79,6 (180/226)	(73,9, 84,4)
	PPV (%)	11,8 (6/51)	(5,6, 17,7)	13,2 (7/53)	(6,9, 18,7)
	NPV (%)	98,1 (206/210)	(96,6, 99,4)	98,4 (180/183)	(96,6, 99,6)
	Prevalence (%)	3,8 (10/261)		4,2 (10/236)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

**Tabulka 43:** Populace ASC-US ≥ 21 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN3 podle věkových skupin

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 937		Test DNA HPV N = 863*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
21 až 29 let		N = 415		N = 389	
	Citlivost (%)	96,3 (26/27)	(81,7, 99,3)	100 (25/25)	(86,7, 100)
	Specifická (%)	42,5 (165/388)	(37,7, 47,5)	33,0 (120/364)	(28,3, 38,0)
	PPV (%)	10,4 (26/249)	(9,0, 11,5)	9,3 (25/269)	(8,2, 10,0)
	NPV (%)	99,4 (165/166)	(97,2, 100)	100 (120/120)	(97,5, 100)
	Prevalence (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
30 až 39 let		N = 261		N = 238	
	Citlivost (%)	88,9 (8/9)	(56,5, 98,0)	77,8 (7/9)	(45,3, 93,7)
	Specifická (%)	64,3 (162/252)	(58,2, 69,9)	59,8 (137/229)	(53,4, 66,0)
	PPV (%)	8,2 (8/98)	(5,0, 10,1)	7,1 (7/99)	(4,0, 9,2)
	NPV (%)	99,4 (162/163)	(97,6, 100)	98,6 (137/139)	(96,4, 99,8)
	Prevalence (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
≥ 40 let		N = 261		N = 236	
	Citlivost (%)	60,0 (3/5)	(23,1, 88,2)	80,0 (4/5)	(37,6, 96,4)
	Specifická (%)	81,3 (208/256)	(76,0, 85,6)	78,8 (182/231)	(73,1, 83,6)
	PPV (%)	5,9 (3/51)	(1,6, 9,7)	7,5 (4/53)	(2,9, 10,7)
	NPV (%)	99,0 (208/210)	(98,0, 99,9)	99,5 (182/183)	(98,2, 100)
	Prevalence (%)	1,9 (5/261)		2,1 (5/236)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Absolutní riziko onemocnění ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3, na základě vyhodnocení všech biopsií) podle výsledku Aptima HPV Assay a relativní riziko onemocnění pro pozitivní vs. negativní výsledky Aptima HPV Assay jsou uvedeny v Tabulka 44, spolu s odhadem pro komerčně dostupný test DNA HPV. Relativní riziko  $\geq$ CIN2 bylo 7,4 (95% CI: 4,3, 13,0), což znamená, že žena s pozitivním Aptima HPV Assay měla 7,4krát větší pravděpodobnost onemocnění  $\geq$ CIN2 než žena s negativním Aptima HPV Assay. Relativní riziko  $\geq$ CIN3 bylo 12,5 (95% CI: 4,5, 34,9).

**Tabulka 44:** Populace ASC-US  $\geq$  21 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV

	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 937		Test DNA HPV N = 863*	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	19,3 (77/398) (17,3, 21,2)	7,4 (4,3, 13,0)	18,8 (79/421) (17,0, 20,4)	8,3 (4,4, 15,8)
	Negativní	2,6 (14/539) (1,5, 4,0)		2,3 (10/442) (1,2, 3,8)	
	Prevalence (%)	9,7 (91/937)		10,3 (89/863)	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	9,3 (37/398) (8,0, 10,3)	12,5 (4,5, 34,9)	8,6 (36/421) (7,4, 9,4)	12,6 (3,9, 40,6)
	Negativní	0,7 (4/539) (0,2, 1,7)		0,7 (3/442) (0,2, 1,7)	
	Prevalence (%)	4,4 (41/937)		4,5 (39/863)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Odhady absolutního a relativního rizika onemocnění ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3, na základě vyhodnocení všech biopsií) u Aptima HPV Assay a komerčně dostupného testu DNA HPV jsou zobrazeny podle věkových skupin v Tabulka 45.

**Tabulka 45:** Populace ASC-US  $\geq$  21 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV podle věkových skupin

	Věk	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 937		Test DNA HPV N = 863*	
			Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	21 až 29 let		N = 415		N = 389	
		Pozitivní	21,7 (54/249) (19,3, 23,9)	5,1 (2,4, 11,0)	20,8 (56/269) (19,0, 22,5)	8,3 (2,7, 26,1)
		Negativní	4,2 (7/166) (1,9, 7,7)		2,5 (3/120) (0,6, 6,4)	
		Prevalence (%)	9,7 (61/415)		15,2 (59/389)	
	30 až 39 let		N = 261		N = 238	
		Pozitivní	17,3 (17/98) (13,1, 21,1)	9,4 (2,8, 31,3)	16,2 (16/99) (11,8, 19,8)	5,6 (1,9, 16,3)
		Negativní	1,8 (3/163) (0,4, 4,3)		2,9 (4/139) (0,9, 5,9)	
		Prevalence (%)	7,7 (20/261)		8,4 (20/238)	
	$\geq$ 40 let		N = 261		N = 236	
		Pozitivní	11,8 (6/51) (5,6, 17,7)	6,2 (1,8, 21,1)	13,2 (7/53) (6,9, 18,7)	8,1 (2,2, 30,1)
		Negativní	1,9 (4/210) (0,6, 3,4)		1,6 (3/183) (0,4, 3,4)	
		Prevalence (%)	3,8 (10/261)		4,2 (10/236)	
$\geq$ CIN3	21 až 29 let		N = 415		N = 389	
		Pozitivní	10,4 (26/249) (9,0, 11,5)	17,3 (2,4, 127)	9,3 (25/269) (8,2, 10,0)	Nelze vypočítat
		Negativní	0,6 (1/166) (0,0, 2,8)		0,0 (0/120) (0,0, 2,5)	
		Prevalence (%)	6,5 (27/415)		6,4 (25/389)	
	30 až 39 let		N = 261		N = 238	
		Pozitivní	8,2 (8/98) (5,0, 10,1)	13,3 (1,7, 105)	7,1 (7/99) (4,0, 9,2)	4,9 (1,0, 23,2)
		Negativní	0,6 (1/163) (0,0, 2,4)		1,4 (2/139) (0,2, 3,6)	
		Prevalence (%)	3,4 (9/261)		3,8 (9/238)	
	$\geq$ 40 let		N = 261		N = 236	
		Pozitivní	5,9 (3/51) (1,6, 9,7)	6,2 (1,1, 36,0)	7,5 (4/53) (2,9, 10,7)	13,8 (1,6, 121)
		Negativní	1,0 (2/210) (0,1, 2,0)		0,5 (1/183) (0,0, 1,8)	
		Prevalence (%)	1,9 (5/261)		2,1 (5/236)	

\*74 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

### Populace NILM ≥ 30 let: Klinická účinnost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep při úvodním vyšetření

Celkem bylo do studie NILM zahrnuto 11 644 žen s výsledky cytologie NILM. Z nich bylo 773 žen vyloučeno. Zbývajících 10 871 žen bylo způsobilých k testování v systému Panther. U jedenácti žen chyběly vzorky, proto byly vyloučeny z hodnocení úvodního Aptima HPV Assay v systému Panther. Zbývajících 10 860 hodnotitelných žen bylo ve věku 30 let a starších s výsledky cytologie NILM a výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther. Z 512 žen s pozitivními výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther 284 absolvovalo kolposkopii při úvodním vyšetření. Z 10 348 žen s negativními výsledky Aptima HPV Assay 580 absolvovalo kolposkopii při úvodním vyšetření. Dvacet (20) žen mělo ≥CIN2 a jedenáct (11) mělo ≥CIN3; 798 žen mělo normální/CIN1 histologii; 46 žen měly neurčitý status onemocnění. Výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu při úvodním vyšetření jsou uvedeny v Tabulka 46.

**Tabulka 46:** Populace NILM ≥ 30 let: Výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV podle diagnózy konsenzuálního revizního histologického panelu při úvodním vyšetření

Výsledek Aptima HPV Assay*	Test DNA HPV	Diagnóza konsenzuálního revizního histologického panelu						
		Neurčitý**	Normální	CIN1	CIN2	CIN3	Rakovina	Celkem
Pozitivní	Pozitivní	11	211	12	4	7	2	247
Pozitivní	Negativní	2	19	0	0	0	1	22
Pozitivní	Žádný výsledek***	2	12	1	0	0	0	15
Negativní	Pozitivní	10	170	7	2	1	0	190
Negativní	Negativní	20	353	9	2	0	0	384
Negativní	Žádný výsledek***	1	4	0	1	0	0	6
<b>Celkem</b>		46	769	29	9	8	3****	864

\*Všechny vzorky měly závěrečné platné výsledky (po úvodním testování nebo po vyřešení počátečních neplatných výsledků podle postupu).

\*\*46 subjektů absolvovalo kolposkopii, ale diagnózu nebylo možno určit z následujících důvodů: vzorky biopsie byly označeny za nedostatečné (n = 29), nebyla odebrána žádná biopsie (n = 15) a ztráta vzorků biopsie (n = 2).

\*\*\*21 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo primárně výsledky testu DNA HPV v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

\*\*\*\*Tři ženy měly adenokarcinom in situ (AIS).

Celkem 10 042 mělo při úvodním vyšetření neověřený (včetně neurčitého) status onemocnění (Tabulka 47). Vzhledem k tomu, že kolposkopii podstoupily pouze náhodně vybrané ženy s negativními výsledky Aptima HPV Assay v systému Tigris DTS a komerčně dostupného testu DNA HPV, podíl žen s neověřeným statutem onemocnění byl v této skupině vysoký (96,6%). K úpravě tohoto ověření zkraslení byla použita metoda vícenásobného započtení k odhadu počtu žen s onemocněním, který by byl zjištěn, pokud by všechny ženy podstoupily kolposkopii. Prezentovány jsou jak odhady účinnosti s upraveným ověřením zkraslení, tak neupravené odhady účinnosti založené na 818 ženách s ověřeným statutem onemocnění.

**Tabulka 47:** NILM Populace  $\geq 30$  let: Klasifikace hodnotitelných žen NILM podle výsledků Aptima HPV Assay a výsledků testu DNA HPV, stavu onemocnění ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3) a stavu ověření onemocnění

Výsledek Aptima HPV Assay*		Test DNA HPV	Celkem žen	Ověřený status onemocnění: $\geq$ CIN2		Ověřený status onemocnění: $\geq$ CIN3		Neověřený status onemocnění
Systém Panther	Systém Tigris DTS			Ženy s onemocněním ( $\geq$ CIN2)	Ženy bez onemocnění ( $\geq$ CIN2)	Ženy s onemocněním ( $\geq$ CIN3)	Ženy bez onemocnění ( $\geq$ CIN3)	Ženy s neznámým statutem onemocnění (% neznámých)
Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	313	13	189	9	193	111 (35,5%)
Pozitivní	Pozitivní	Negativní	37	1	18	1	18	18 (48,6%)
Pozitivní	Pozitivní	Žádný výsledek**	22	0	13	0	13	9 (40,9%)
Pozitivní	Negativní	Pozitivní	70	0	34	0	34	36 (51,4%)
Pozitivní	Negativní	Negativní	60	0	1	0	1	59 (98,3%)
Pozitivní	Negativní	Žádný výsledek**	10	0	0	0	0	10 (100%)
Negativní	Pozitivní	Pozitivní	46	0	33	0	33	13 (28,3%)
Negativní	Pozitivní	Negativní	113	1	41	0	42	71 (62,8%)
Negativní	Pozitivní	Žádný výsledek**	8	0	4	0	4	4 (50,0%)
Negativní	Negativní	Pozitivní	236	3	144	1	146	89 (37,7%)
Negativní	Negativní	Negativní	9 354	1	321	0	322	9 032 (96,6%)
Negativní	Negativní	Žádný výsledek**	591	1	0	0	1	590 (99,8%)
<b>Celkem</b>			10 860	20	798	11	807	10 042 (92,5%)

\*Všechny vzorky měly konečné výsledky (po počátečním testování nebo po vyřešení počátečních neplatných výsledků podle postupu).

\*\*631 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Upravená prevalence  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 u žen s výsledky cytologie NILM byla 0,9% a 0,4% v uvedeném pořadí. Upravené odhady absolutního a relativního rizika pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 při úvodním vyšetření jsou uvedeny v Tabulka 48. Upravené relativní riziko  $\geq$ CIN2 bylo 7,5 (95% CI: 2,1, 26,3), což znamená, že žena s pozitivním Aptima HPV Assay má 7,5 krát větší pravděpodobnost onemocnění  $\geq$ CIN2 než žena s negativním Aptima HPV Assay. Upravené relativní riziko  $\geq$ CIN3 bylo 24,9 (95% CI: 2,0, 307,0). Neupravené odhady absolutního a relativního rizika pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 při úvodním vyšetření jsou uvedeny celkem v Tabulka 49 a podle věkových skupin v Tabulka 50.

**Tabulka 48:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV (odhady s upraveným ověřením zkruslení) při úvodním vyšetření

	Výsledek testu	Aptima HPV Assay		Test DNA HPV	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	4,5 (2,7, 7,4)	7,5 (2,1, 26,3)	3,7 (2,3, 6,1)	7,3 (1,6, 33,5)
	Negativní	0,6 (0,2, 1,9)		0,5 (0,1, 2,1)	
	Prevalence (%)	0,9		0,9	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	3,0 (1,6, 5,5)	24,9 (2,0, 307,0)	2,3 (1,3, 4,1)	21,0 (1,0, 423,8)
	Negativní	0,1 (0,0, 1,7)		0,1 (0,0, 2,4)	
	Prevalence (%)	0,4		0,4	

**Tabulka 49:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 818		Test DNA HPV N = 800*	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	5,2 (14/269) (3,5, 6,6)	4,8 (1,9, 12,3)	3,8 (16/416) (2,9, 4,5)	4,9 (1,4, 16,8)
	Negativní	1,1 (6/549) (0,5, 1,9)		0,8 (3/384) (0,2, 1,9)	
	Prevalence (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	3,7 (10/269) (2,5, 4,3)	20,4 (2,6, 159)	2,4 (10/416) (1,6, 2,7)	9,2 (1,2, 71,8)
	Negativní	0,2 (1/549) (0,0, 0,8)		0,3 (1/384) (0,0, 1,1)	
	Prevalence (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

\*18 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

**Tabulka 50:** NILM Populace ≥ 30 let: Absolutní a relativní rizika onemocnění ≥CIN2 a ≥CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV podle věkových skupin (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

	Věk	Výsledek testu	Aptima HPV Assay N = 818		Test DNA HPV N = 800*	
			Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
≥CIN2	30 až 39 let		N = 383		N = 376	
		Pozitivní	4,6 (7/153) (2,5, 5,9)	5,3 (1,1, 25,0)	3,3 (7/215) (1,8, 4,1)	2,6 (0,6, 12,4)
		Negativní	0,9 (2/230) (0,1, 2,2)		1,2 (2/161) (0,2, 3,2)	
		Prevalence (%)	2,3 (9/383)		2,4 (9/376)	
	≥ 40 let		N = 435		N = 424	
		Pozitivní	6,0 (7/116) (3,2, 8,5)	4,8 (1,4, 16,1)	4,5 (9/201) (2,9, 5,3)	10,0 (1,3, 78,1)
		Negativní	1,3 (4/319) (0,4, 2,3)		0,4 (1/223) (0,0, 1,8)	
		Prevalence (%)	2,5 (11/435)		2,4 (10/424)	
≥CIN3	30 až 39 let		N = 383		N = 376	
		Pozitivní	3,3 (5/153) (1,6, 4,1)	7,5 (0,9, 63,7)	2,3 (5/215) (1,1, 2,9)	3,7 (0,4, 31,7)
		Negativní	0,4 (1/230) (0,0, 1,6)		0,6 (1/161) (0,0, 2,2)	
		Prevalence (%)	1,6 (6/383)		1,6 (6/376)	
	≥ 40 let		N = 435		N = 424	
		Pozitivní	4,3 (5/116) (2,2, 5,1)	Nelze vypočíst	2,5 (5/201) (1,3, 2,8)	Nelze vypočíst
		Negativní	0,0 (0/319) (0,0, 0,8)		0,0 (0/223) (0,0, 1,1)	
		Prevalence (%)	1,1 (5/435)		1,2 (5/424)	

\*18 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.



Upravené odhady klinické účinnosti Aptima HPV Assay včetně citlivosti, specifity, PPV a NPV pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 při úvodním vyšetření jsou uvedeny v Tabulka 51, stejně jako odhady pro komerčně dostupný test DNA HPV. Neupravené odhady klinické účinnosti jsou uvedeny v Tabulka 52. Aptima HPV Assay i komerčně dostupný test DNA HPV měly podobnou citlivost, specifita byla výrazně vyšší u Aptima HPV Assay (nepřekrývající, 95% CI). Odhady prediktivní hodnoty Aptima HPV Assay byly klinicky relevantní a podobné odhadům pro komerčně dostupný test DNA HPV. NPV byly podobné, ale pro detekci  $\geq$ CIN2 byla PPV pro Aptima HPV Assay mírně vyšší než PPV pro komerčně dostupný test DNA HPV (4,5% vs. 3,7%).

**Tabulka 51:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 (odhady s upraveným ověřením zkruslení) při úvodním vyšetření

	Účinnost	Aptima HPV Assay		Test DNA HPV	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
$\geq$ CIN2	Citlivost (%)	28,4	(4,9, 51,8)	35,4	(3,8, 66,9)
	Specifita (%)	95,5	(95,1, 95,9)	93,7	(93,2, 94,2)
	PPV (%)	4,5	(2,7, 7,4)	3,7	(2,3, 6,1)
	NPV (%)	99,4	(98,1, 99,8)	99,5	(97,9, 99,9)
	Prevalence (%)	0,9 (0,0, 1,9)		0,9 (0,0, 1,9)	
$\geq$ CIN3	Citlivost (%)	54,0	(3,6, 100)	56,4	(0,4, 100)
	Specifita (%)	95,4	(95,0, 95,8)	93,6	(93,1, 94,1)
	PPV (%)	3,0	(1,6, 5,5)	2,3	(1,3, 4,1)
	NPV (%)	99,9	(98,3, 100)	99,9	(97,6, 100)
	Prevalence (%)	0,4 (0,0, 1,2)		0,4 (0,0, 1,3)	

**Tabulka 52:** NILM Populace ≥ 30 let: Účinnost Aptima HPV Assay a testu DNA HPV pro detekci ≥CIN2 a ≥CIN3 (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

	Účinnost	Aptima HPV Assay N = 818		Test DNA HPV N = 800*	
		Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
≥CIN2	Citlivost (%)	70,0 (14/20)	(48,1, 85,5)	84,2 (16/19)	(62,4, 94,5)
	Specifická (%)	68,0 (543/798)	(64,7, 71,2)	48,8 (381/781)	(45,3, 52,3)
	PPV (%)	5,2 (14/269)	(3,5, 6,6)	3,8 (16/416)	(2,9, 4,5)
	NPV (%)	98,9 (543/549)	(98,1, 99,5)	99,2 (381/384)	(98,1, 99,8)
	Prevalence (%)	2,4 (20/818)		2,4 (19/800)	
≥CIN3	Citlivost (%)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)	90,9 (10/11)	(62,3, 98,4)
	Specifická (%)	67,9 (548/807)	(64,6, 71,0)	48,5 (383/789)	(45,1, 52,0)
	PPV (%)	3,7 (10/269)	(2,5, 4,3)	2,4 (10/416)	(1,6, 2,7)
	NPV (%)	99,8 (548/549)	(99,2, 100)	99,7 (383/384)	(98,9, 100)
	Prevalence (%)	1,3 (11/818)		1,4 (11/800)	

\*18 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

Přímé porovnání Aptima HPV Assay v systému Panther a komerčně dostupného testu DNA HPV ukazuje, že Aptima HPV Assay dosahuje podobné citlivosti a statisticky významně lepší specifity testu oproti komerčně dostupnému testu DNA HPV pro detekci  $\geq$ CIN2, jak ukazuje poměr skutečně pozitivních a falešně pozitivních hodnot (Tabulka 53 a Tabulka 54 v uvedeném pořadí).

**Tabulka 53:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Poměr skutečně pozitivních hodnot (Aptima HPV Assay/test DNA HPV) pro ženy s  $\geq$ CIN2 (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

		Test DNA HPV		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Aptima HPV Assay	Pozitivní	13	1	14 (73,7%)
	Negativní	3	2	5
	Celkem	16 (84,2%)	3	19
Poměr skutečně pozitivních hodnot = 0,88 (14/16) (95% CI: 0,65, 1,10)				

**Tabulka 54:** NILM Populace  $\geq$  30 let: Poměr falešně pozitivních hodnot (Aptima HPV Assay/test DNA HPV) pro ženy s  $<$ CIN2 (neupravené odhady) při úvodním vyšetření

		Test DNA HPV		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Aptima HPV Assay	Pozitivní	223	19	242 (31,0%)
	Negativní	177	362	539
	Celkem	400 (51,2%)	381	781
Poměr falešně pozitivních hodnot = 0,61 (242/400) (95% CI: 0,55, 0,66)				

### NILM Populace $\geq$ 30 let: Klinická účinnost Aptima HPV Assay v systému Panther po 3 letech sledování

Způsobilých pro další fázi studie bylo 10 843 hodnotitelných žen ve věku 30 let a starších s výsledky cytologie NILM a platnými výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther při úvodním vyšetření. Z žen bez  $\geq$ CIN2 dokončilo následnou Pap návštěvu po 1 roce 67,0% (7 247/10 823), 60,3% (6 517/10 814) po 2 letech a 58,7% (6 339/10 807) po 3 letech. Celkově 58,8% (6 375/10 843) žen dokončilo studii (měly  $\geq$ CIN2 při úvodním vyšetření nebo při následných vyšetřeních, případně absolvovalo požadované návštěvy).

Z 10 843 hodnotitelných žen mělo 511 (4,7%) pozitivní výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther při úvodním vyšetření. Z těchto 511 žen mělo 255 (49,9%) buď pozitivní, nebo negativní 3letý status onemocnění na základě výsledků cytologie nebo kolposkopie/biopsie. Zbývajících 10 332 žen mělo negativní výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther při úvodním vyšetření. Z těchto 10 332 žen mělo 5 946 (57,5%) buď pozitivní, nebo negativní 3letý status onemocnění. Z 6 201 žen s 3letým statusem onemocnění mělo 47 žen  $\geq$ CIN2 včetně 23 žen s  $\geq$ CIN3; 6 154 žen mělo normální/CIN1 podle konsenzuálního revizního histologického panelu. Výsledky Aptima HPV Assay v systému Panther a komerčně

dostupného testu DNA HPV při úvodním vyšetření a 3letý status onemocnění (zahrnuje úvodní a následná vyšetření) podle konsenzuálního revizního histologického panelu jsou uvedeny v Tabulka 55.

**Tabulka 55:** NILM Populace  $\geq 30$  let: Klasifikace žen způsobilých pro další fáze podle výsledků Aptima HPV Assay při úvodním vyšetření, výsledků testu DNA HPV při úvodním vyšetření a statusu onemocnění ( $\geq$ CIN2,  $\geq$ CIN3, neověřeno) stanovená při úvodním vyšetření a v následných fázích

Výsledek Aptima HPV Assay	Test DNA HPV	Celkem žen	Ověřený status onemocnění: $\geq$ CIN2		Ověřený status onemocnění: $\geq$ CIN3		Neověřený status onemocnění	
			Ženy s onemocněním ( $\geq$ CIN2)	Ženy bez onemocnění ( $\geq$ CIN2)	Ženy s onemocněním ( $\geq$ CIN3)	Ženy bez onemocnění ( $\geq$ CIN3)	Ztraceny v následné fázi	Neurčitý*
Pozitivní	Pozitivní	382	23	171	16	178	167	21
Pozitivní	Negativní	97	1	48	1	48	44	4
Pozitivní	Žádný výsledek**	32	2	10	1	11	17	3
Negativní	Pozitivní	281	5	129	2	132	130	17
Negativní	Negativní	9 452	15	5 476	3	5 488	3 756	205
Negativní	Žádný výsledek**	599	1	320	0	321	264	14
<b>Celkem</b>		10 843	47	6 154	23	6 178	4 378	264

\*Ženy, které měly abnormální výsledky cytologických testů v následném období a které neměly následný výsledek konsenzuálního revizního histologického panelu a ženy s neadekvátní cytologií při poslední návštěvě. 174 žen s neurčitým statusem onemocnění dokončilo svá následná vyšetření podle protokolu.

\*\*631 žen s výsledky Aptima HPV Assay nemělo výsledky testu DNA HPV primárně v důsledku nedostatečného objemu vzorku cytologie.

3 leté kumulativní riziko onemocnění ( $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3) vychází z Kaplanova-Meierova odhadu (analýza přežívání) a zahrnuje onemocnění detekované při úvodním nebo následném vyšetření. Ženy s některými známkami onemocnění (ASC-US nebo závažnější výsledky cytologie), ale bez výsledku konsenzuálního revizního histologického panelu byly zařazeny do analýzy pomocí metody vícenásobného započtení, aby bylo možno předpovědět počet žen s onemocněním, která by byla zjištěna, pokud ženy podstoupily kolposkopii.

3 leté kumulativní odhady absolutního a relativního rizika pro detekci  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 jsou uvedeny v Tabulka 56.

**Tabulka 56:** NILM Populace  $\geq 30$  let: 3 letá kumulativní Absolutní a relativní rizika\* onemocnění  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 pro výsledky Aptima HPV Assay a testu DNA HPV při úvodním vyšetření

	Výsledek testu	Aptima HPV Assay		Test DNA HPV	
		Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)	Absolutní riziko (95% CI)	Relativní riziko (95% CI)
$\geq$ CIN2	Pozitivní	7,90 (5,50, 11,27)	24,45 (13,85, 43,15)	6,43 (4,50, 9,14)	22,71 (12,20, 42,30)
	Negativní	0,32 (0,21, 0,51)		0,28 (0,17, 0,47)	
	Prevalence (%)	0,68		0,68	
$\geq$ CIN3	Pozitivní	5,23 (3,34, 8,13)	57,11 (21,09, 154,62)	4,14 (2,62, 6,52)	51,34 (17,74, 148,58)
	Negativní	0,09 (0,04, 0,23)		0,08 (0,03, 0,22)	
	Prevalence (%)	0,34		0,35	

\*3letá kumulativní rizika upravená pro další možné chyby byla podobná rizikům v této tabulce. Vzhledem k očekávaným rozdílům v rizicích v 1. a 2. roce pro dvě skupiny žen v navazující studii (ženy s kolposkopií při úvodním vyšetření a ženy bez kolonoskopie při úvodním vyšetření) byla hlášena pouze 3letá kumulativní rizika pro kombinované skupiny.

3 letá kumulativní prevalence  $\geq$ CIN2 a  $\geq$ CIN3 u žen s výsledky cytologie NILM při úvodním vyšetření byla 0,68% a 0,34% v uvedeném pořadí. Relativní riziko  $\geq$ CIN2 bylo 24,45 (95% CI 13,85, 43,15), což znamená, že žena s pozitivním Aptima HPV Assay v systému Panther má 24,45 krát větší pravděpodobnost onemocnění  $\geq$ CIN2 než žena s negativním Aptima HPV Assay. Relativní riziko  $\geq$ CIN3 bylo 57,11 (95% CI: 21,09, 154,62).

### Klinická účinnost Aptima HPV Assay se vzorky v konzervačním roztoku SurePath

Byly shromážděny vzorky v konzervačním roztoku SurePath od kanadských žen (n = 558), které byly pozvány na následnou schůzku z těchto důvodů: jeden nebo více abnormálních Pap testů, HPV infekce nebo jiný důvod. Alikvotní podíl (0,5 ml) každého vzorku byl přenesen do transferové zkumavky na vzorek Aptima a pak ošetřen pomocí transportního roztoku Aptima. Jeden replikát každého vzorku byl otestován pomocí Aptima HPV Assay. Samostatný alikvotní podíl (1 ml) každého vzorku byl použit k testování pomocí komerčně dostupného testu PCR HPV. Klinická citlivost pro detekci onemocnění, definovaná jako výsledek histologie  $\geq$ CIN3, byla vypočtena pro Aptima HPV Assay i pro test PCR HPV, jak je uvedeno v Tabulka 57, s pozitivními a negativními prediktivními hodnotami.

**Tabulka 57:** Účinnost Aptima HPV Assay a testu PCR HPV pro detekci  $\geq$ CIN3

Účinnost	Aptima HPV Assay N = 558		Test PCR HPV N = 558	
	Odhad	(95% CI)	Odhad	(95% CI)
<b>Citlivost (%)</b>	89,3 (25/28)	(72,8 – 96,3)	89,3 (25/28)	(72,8 – 96,3)
<b>Specifická (%)</b>	58,7 (311/530)	(54,4 – 62,8)	49,1 (260/530)	(44,8 – 53,3)
<b>PPV (%)</b>	10,2 (25/244)	(8,4 – 11,7)	8,5 (25/295)	(7,0 – 9,5)
<b>NPV (%)</b>	99,0 (311/314)	(97,6 – 99,8)	98,9 (260/263)	(97,2 – 99,7)
<b>Prevalence (%)</b>	5,0 (28/558)		5,0 (28/558)	

### Účinnost Aptima HPV Assay při odběru cervikálních vzorků a jejich transportu

Vysoce rizikové HPV pozitivní a vysoce rizikové HPV negativní klinické vzorky odebrané od screeningové (rutinní návštěva) i doporučené (vyšetření kolposkopie) populace pomocí soupravy Aptima CSCT byly testovány pomocí Aptima HPV Assay v systémech Panther a Tigris DTS pomocí dvou šarží reagentie. Shoda mezi systémy Panther a Tigris DTS pro vzorky CSCT jsou uvedeny v Tabulka 58.

U vzorků CSCT byla celková shoda mezi systémy Tigris DTS a Panther > 98%, jak je uvedeno v Tabulka 58. Z 632 testovaných klinických vzorků bylo 69 CIN2+ a 38 bylo CIN3+. Citlivost Aptima HPV Assay pro detekci CIN2+ byla 97,1% (95% CI 90,0% – 99,2%) v systému Panther a 98,6% (95% CI: 92,2 – 99,7) v systému Tigris DTS. Citlivost pro detekci CIN3+ byla 100% (CI: 90,8% – 100%) v systémech Panther a Tigris DTS.

**Tabulka 58:** Shoda výsledků Aptima HPV Assay se vzorky Aptima CSCT testovanými v systémech Tigris DTS a Panther

		Systém Tigris DTS		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Systém Panther	Pozitivní	490	3	493
	Negativní	9	130	139
	Celkem	499	133	632

Celková shoda = 98,1% (CI 96,7 – 98,9)

Pozitivní shoda = 98,2% (CI 96,6 – 99,0)

Negativní shoda = 97,7% (CI 93,6 – 99,2)

### Analytická citlivost

Limit detekce (LOD) při klinickém cutoff je koncentrace RNA HPV, která poskytuje kladný výsledek (nad klinický cutoff) 95% celkového času. LOD Aptima HPV Assay byl určena testováním zředěných panelů transkriptů in vitro (IVT) pro všech 14 vysoce rizikových genotypů a 4 buněčné linie infikované HPV: SiHa, HeLa, MS751 a ME180 (ATCC, Manassas, Virginia). Pro panely IVT byl transportní roztok vzorků před testováním uměle obohacen o IVT v různých koncentracích a poté zředěn jednotlivými negativními vzorky v konzervačním roztoku ThinPrep. Pro panely buněk infikovaných HPV byly fondy HPV negativních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep před testováním uměle obohaceny o HPV infikované buňky v různých koncentracích a poté zředěny transportním roztokem vzorků. Třicet replikátů každé úrovně kopií bylo testováno s každou ze dvou šarží reagentů pro celkem 60 replikátů. Testování bylo prováděno v průběhu 17 dní, při 1 až 12 cyklech provedených denně a 5 replikáty daného genotypu a koncentrace testované v každém cyklu. Detekční limit 95% byl vypočten z probitové regresní analýzy výsledků positivity pro každý panel ředění.

Výsledky probitové regresní analýzy v Tabulka 59 ukazují, že HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 59 a 68 měly 95% detekční limity při méně než 100 kopiích/reakci a typy 52, 58 a 66 měly 95% detekční limity při 100 až 500 kopiích/reakci. Čtyři testované buněčné linie měly 95% detekční limity menší než 1 buňka/reakci.

**Tabulka 59:** Limit detekce v klinickém cutoff Aptima HPV Assay

<b>Cíl</b>	<b>Limit detekce* (95% CI)</b>
<b>HPV 16</b>	49,4 (37,1 – 73,0)
<b>HPV 18</b>	44,0 (34,4 – 62,1)
<b>HPV 31</b>	32,5 (23,2 – 52,1)
<b>HPV 33</b>	67,5 (48,8 – 106,2)
<b>HPV 35</b>	32,7 (23,6 – 51,4)
<b>HPV 39</b>	20,9 (16,3 – 29,5)
<b>HPV 45</b>	37,1 (27,9 – 54,7)
<b>HPV 51</b>	51,1 (36,3 – 83,9)
<b>HPV 52</b>	410,2 (310,7 – 595,1)
<b>HPV 56</b>	59,4 (46,7 – 81,5)
<b>HPV 58</b>	124,1 (90,7 – 190,1)
<b>HPV 59</b>	81,1 (61,9 – 116,6)
<b>HPV 66</b>	118,5 (83,2 – 202,0)
<b>HPV 68</b>	22,4 (17,1 – 32,4)
<b>SiHa</b>	0,25 (0,19 – 0,36)
<b>HeLa</b>	0,11 (0,09 – 0,14)
<b>ME180</b>	0,10 (0,08 – 0,16)
<b>MS751</b>	0,17 (0,14 – 0,25)

\*počet kopií na reakci u transkriptů in vitro a buněk na reakci u buněčných linií



## Přesnost testu

Přesnost Aptima HPV Assay byla hodnocena ve dvou studiích pomocí stejného 20členného panelu. 1. studie byla provedena na 3 pracovištích, 2 externích a 1 interním, a 2. studie byla provedena interně. Panel obsahoval 13 členů HPV pozitivních s koncentracemi na nebo nad limitem detekce testu (očekávaná pozitivita:  $\geq 95\%$ ), 3 členy HPV pozitivní s koncentracemi pod limitem detekce testu (očekávaná pozitivita:  $> 0\%$  až  $< 25\%$ ) a 4 členů HPV negativních. HPV pozitivní členy panelu byly připraveny obohacením transkriptů RNA in vitro (IVT) do roztoku PreservCyt rozředěného transportním roztokem vzorků (STM) nebo HPV infikovaných kultivovaných buněk (SiHa, HeLa a MS751; ATCC, Manassas, Virginia) ve směsných negativních vzorcích v konzervačním roztoku ThinPrep zředěných v STM. HPV negativní členy panelu byly připraveny pomocí roztoku PreservCyt nebo směsných negativních vzorků v konzervačním roztoku ThinPrep zředěných v STM.

V rámci 1. studie 2 laboranti na každém ze 3 testovacích pracovišť (1 přístroj na pracoviště) provedli 2 pracovní seznamy Aptima HPV Assay denně (1 pro každou šarži reagensí) po 3 dny. Každý pracovní seznam obsahoval 3 replikáty každého z členů panelu reprodukovatelnosti.

Sto osm (108) jednotlivých zkumavek se vzorky bylo testováno pro každý člen panelu (3 pracoviště  $\times$  1 přístroj  $\times$  2 laboranti  $\times$  2 šarže  $\times$  3 pracovní seznamy  $\times$  3 replikáty).

Ve 2. studii bylo provedeno testování interně po dobu 13 dní s celkem 162 reakcemi testovanými pro každý člen panelu (1 místo  $\times$  3 přístroje  $\times$  3 laborant  $\times$  3 šarže  $\times$  2 pracovní seznamy  $\times$  3 replikáty).

Členy panelu jsou popsány v Tabulka 60a (panel členů s očekávanými pozitivními výsledky) a Tabulka 60b (panel členů s očekávanými negativními výsledky), spolu se shrnutím shody s očekávanými výsledky a hodnotami S/CO analytu v 2,5., 50. a 97,5. percentilech distribuce S/CO. Variabilita S/CO analytu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky je uvedena v Tabulka 61 pro 1. studii a v Tabulka 62 pro 2. studii.

**Tabulka 60a:** 1. a 2. studie přesnosti Aptima HPV Assay: Popis panelu, pozitivní shoda a distribuce percentilů hodnot analytu S/CO pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu (kopií nebo buněk/reakci)	1. studie (3 testovací pracoviště)	2. studie (1 testovací pracoviště)
	% pozitivní shody (95% CI)	% pozitivní shody (95% CI)
HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 1	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,7, 100)
HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 2	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 16 IVT (1 830 kopií)	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (161/161) (97,1, 100)
HPV 18 IVT (1550 kopií)	100 (107/107) (96,5, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV níže pozitivní klinický vzorek 1	94,4 (101/107) (88,3, 97,4)	89,5 (145/162) (83,3, 93,3)
HPV níže pozitivní klinický vzorek 2	88,0 (95/108) (80,5, 92,8)	92,0 (149/162) (86,8, 95,3)
HPV níže pozitivní klinický vzorek 3	100 (108/108) (96,6, 100)	97,5 (157/161) (93,8, 99,0)
HPV níže pozitivní klinický vzorek 4	90,7 (98/108) (83,8, 94,9)	92,6 (150/162) (87,5, 95,7)
HPV 16 IVT (183 kopií)	100 (102/102) (96,4, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
HPV 18 IVT (155 kopií)	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (159/159) (97,6, 100)
Buňky MS751 (0,63 buňky)	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Buňky HeLa (0,35 buňky)	100 (108/108) (96,6, 100)	100 (162/162) (97,7, 100)
Buňky SiHa (0,90 buňky)	87,9 (94/107) (80,3, 92,8)	89,5 (145/162) (83,8, 93,3)

IVT = transkript in vitro

\*Očekávaná % pozitivní shoda ~95%, pozorována nižší pravděpodobnost kvůli variabilitě výroby člena panelu.

**Tabulka 60b:** 1. a 2. studie přesnosti Aptima HPV Assay: Popis panelu, negativní shoda a distribuce percentilů hodnot analytu S/CO pro členy panelu s očekávanými negativními výsledky

Popis panelu (kopii nebo buněk/reakci)	1. studie (3 testovací pracoviště)	2. studie (1 testovací pracoviště)
	% negativní shody (95% CI)	% negativní shody (95% CI)
<b>Buňky MS751 (0,005 buňky)</b>	87,0 (94/108) (79,4, 92,1)	93,8 (152/162) (89,0, 96,6)
<b>Buňky SiHa (0,008 buňky)</b>	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	95,7 (155/162) (91,4, 97,9)
<b>Buňky HeLa (0,02 buňky)</b>	70,4 (76/108) (61,2, 78,2)	67,3 (109/162) (59,8, 74,0)
<b>HPV negativní klinický vzorek 1</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>HPV negativní klinický vzorek 2</b>	97,2 (105/108) (92,1, 99,1)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Roztok PreservCyt 1</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (162/162) (97,7, 100)
<b>Roztok PreservCyt 2</b>	99,1 (107/108) (94,9, 99,8)	100 (161/161) (97,7, 100)

IVT = transkript in vitro.

\*Očekávaná % negativní shoda > 75% a < 100%.

**Tabulka 61:** 1. studie přesnosti Aptima HPV Assay: Variabilita signálu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu (kopie nebo buňky/reakci)	n	Střední S/CO	Mezi přístroji		Mezi laboranty		Mezi šaržemi		Mezi pracovními seznamy		V pracovních seznamech		Celkem	
			SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)
HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 1	107*	29,34	0,00	0,0	0,00	0,0	1,43	4,9	1,87	6,4	1,49	5,1	2,79	9,5
HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 2	107*	30,09	0,55	1,8	0,00	0,0	1,06	3,5	0,73	2,4	2,21	7,3	2,61	8,7
HPV 16 IVT (1830 kopií)	107*	11,20	0,09	0,8	0,16	1,4	0,03	0,3	0,14	1,3	0,46	4,1	0,52	4,6
HPV 18 IVT (1550 kopií)	107*	14,89	0,18	1,2	0,00	0,0	0,20	1,3	0,14	0,9	1,53	10,3	1,56	10,5
HPV níže pozitivní klinický vzorek 1	107*	8,24	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	3,23	39,2	3,23	39,2
HPV níže pozitivní klinický vzorek 2	108	7,07	0,00	0,0	0,41	5,8	0,00	0,0	0,00	0,0	4,57	64,7	4,59	65,0
HPV níže pozitivní klinický vzorek 3	108	10,23	0,26	2,5	0,00	0,0	0,00	0,0	1,32	12,9	3,23	31,6	3,49	34,2
HPV níže pozitivní klinický vzorek 4	108	4,68	0,50	10,7	0,20	4,2	0,00	0,0	0,99	21,1	3,02	64,6	3,22	68,9
HPV 16 IVT (183 kopií)	102*	11,09	0,08	0,7	0,00	0,0	0,00	0,0	0,26	2,3	0,54	4,9	0,61	5,5
HPV 18 IVT (155 kopií)	108	11,78	0,00	0,0	0,43	3,7	0,00	0,0	1,12	9,5	1,97	16,7	2,30	19,6
Buňky MS751 (0,63 buňky)	108	10,73	0,00	0,0	0,59	5,5	0,72	6,7	0,82	7,6	1,86	17,3	2,23	20,8
Buňky HeLa (0,35 buňky)	108	6,78	0,00	0,0	0,56	8,3	0,00	0,0	1,23	18,2	3,08	45,5	3,37	49,7
Buňky SiHa (0,90 buňky)	107*	7,74	0,37	4,8	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	3,85	49,8	3,87	50,1

\*Dvanáct vzorků mělo neplatné výsledky Aptima HPV Assay (1 pro HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 1, 1 pro HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 2, 1 pro HPV 16 IVT (1 830 kopií), 1 pro HPV 18 IVT (1 550 kopií), 1 pro HPV níže pozitivní klinický vzorek 1, 6 pro HPV 16 IVT (183 kopií) a 1 pro buňky SiHa (0,90 buňky)).

KV = koeficient variace; IVT = transkript in vitro; SO = standardní odchylka

**Poznámka:** Variabilita některých faktorů může být číselně záporná. K tomu může dojít, pokud je variabilita vzhledem k těmto faktorům velmi malá. V těchto případech jsou SO a KV zobrazeny jako nula.

**Tabulka 62:** 2. studie přesnosti Aptima HPV Assay: Variabilita signálu pro členy panelu s očekávanými pozitivními výsledky

Popis panelu (kopie nebo buňky/reakci)	n	Střední S/CO	Mezi přístroji		Mezi laboranty		Mezi šaržemi		Mezi pracovními seznamy		V pracovních seznamech		Celkem	
			SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)	SO	KV (%)
HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 1	161*	26,81	0,75	2,8	0,00	0,0	0,91	3,4	0,48	1,8	1,84	6,9	2,24	8,3
HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 2	162	28,83	0,00	0,0	0,00	0,0	0,96	3,3	0,65	2,3	2,35	8,2	2,62	9,1
HPV 16 IVT (1830 kopií)	161*	11,07	0,14	1,2	0,00	0,0	0,05	0,5	0,16	1,4	0,32	2,9	0,39	3,5
HPV 18 IVT (1550 kopií)	162	13,34	0,14	1,1	0,12	0,9	1,00	7,5	0,31	2,3	0,75	5,6	1,31	9,8
HPV níže pozitivní klinický vzorek 1	162	7,57	0,56	7,5	0,55	7,3	0,63	8,3	0,00	0,0	3,61	47,7	3,75	49,5
HPV níže pozitivní klinický vzorek 2	162	7,59	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	5,25	69,2	5,25	69,2
HPV níže pozitivní klinický vzorek 3	161*	8,83	0,00	0,0	0,00	0,0	0,26	3,0	0,00	0,0	3,48	39,4	3,49	39,5
HPV níže pozitivní klinický vzorek 4	162	4,95	0,00	0,0	0,00	0,0	0,75	15,2	0,00	0,0	3,35	67,6	3,43	69,3
HPV 16 IVT (183 kopií)	162	11,02	0,13	1,2	0,11	1,0	0,12	1,1	0,13	1,2	0,54	4,9	0,59	5,4
HPV 18 IVT (155 kopií)	159*	11,40	0,16	1,4	0,17	1,5	1,21	10,6	0,23	2,0	1,17	10,3	1,72	15,0
Buňky MS751 (0,63 buňky)	162	9,87	0,76	7,7	0,00	0,0	0,65	6,6	0,65	6,6	1,41	14,3	1,85	18,7
Buňky HeLa (0,35 buňky)	162	7,80	0,55	7,0	0,00	0,0	0,85	10,9	0,00	0,0	2,44	31,3	2,65	33,9
Buňky SiHa (0,90 buňky)	162	7,30	0,32	4,3	0,00	0,0	0,93	12,7	1,04	14,3	3,49	47,8	3,77	51,7

\*Šest vzorků mělo neplatné výsledky Aptima HPV Assay (1 pro HPV vysoce pozitivní klinický vzorek 1, 1 pro HPV 16 IVT (1 830 kopií), 1 pro HPV níže pozitivní klinický vzorek 3, 3 pro HPV 18 IVT (155 kopií)).

KV = koeficient variace; IVT = transkript in vitro; SO = standardní odchylka

**Poznámka:** Variabilita některých faktorů může být číselně záporná. K tomu může dojít, pokud je variabilita vzhledem k těmto faktorům velmi malá. V těchto případech jsou SO a KV zobrazeny jako nula.

## Zkřížená reaktivita

Bylo provedeno testování s potenciálně zkříženě reaktivními organismy pro Aptima HPV Assay pomocí systému Tigris DTS. Výsledky najdete v *Zkřížená reaktivita* (Tabulka 37) v části systému Tigris DTS.

## Interference

Bylo provedeno testování s potenciálně interferujícími látkami pro Aptima HPV Assay pomocí systému Tigris DTS. Výsledky najdete v *Interference* (Tabulka 38) v části systému Tigris DTS.

## Bibliografie

1. **Walboomers, J. M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, N. Muñoz.** 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* **189**:12-19.
2. **Li N., S. Franceschi, R. Howell-Jones, P. J. Snijders, G. M. Clifford.** 2010. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*, n/a. doi: 10.1002/ijc.25396.
3. **Czegledy J., C. Losif, B.G. Hansson, M. Evander, L. Gergely, and G. Wadell.** 1995. Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer? *Int J Cancer.* **64(3)**:211-5.
4. **Doorbar, J.** 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* **110(5)**:525-41.
5. **Burd, E.M.** 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* **16(1)**:1-17.
6. **Lambert P.F., H. Pan, H.C. Pitot, A. Liem, M. Jackson, and A.E. Griep.** 1993. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(12)**:5583-7.
7. **Kjaer S.K., A.J.C. van den Brule, G. Paull, E.I. Svare, M.E. Sherman, B.L. Thomsen, M. Sunsum, J.E. Bock, P.A. Poll, and C.J.L.M. Meijer.** 2002. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ.* **325(7364)**: 572-579.
8. **Monsonogo J., F.X. Bosch, P. Coursaget, J.T. Cox, E. Franco, I. Frazer, R. Sankaranarayanan, J. Schiller, A. Singer, T.C. Wright Jr, W. Kinney, C.J. Meijer, J. Linder, E. McGoogan, and C. Meijer.** 2004. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer.* **108(3)**:329-33. Erratum in: *Int J Cancer.* **108(6)**:945.
9. **Cuschieri, K.S., M.J. Whitley, H.A. Cubie.** 2004. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence—implications for cervical disease progression and monitoring. *J. Med. Virol.* **73(1)**: 65-70.
10. **Baseman J.G., and L.A. Koutsky.** 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* **32 Suppl 1**:S16-24.
11. **Wu R, Belinson SE, Du H, Na W, Qu X, Wu R, et al.** Human papillomavirus messenger RNA assay for cervical cancer screening: the Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I. *International Journal of Gynecological Cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2010; 20(8):1411-4.
12. **Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, et al.** Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49(2):557-64.
13. **Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat J-C, Syrjänen K, Halfon P, et al.** Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *International Journal of Cancer Journal international du cancer.* 2011;129:691-701.
14. **Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat J-C, Syrjänen K, Smith JS.** Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (the FASE study). *Gynecologic Oncology.* 2012;125:175-80.
15. **Nieves L, Enerson CL, Belinson S, Brainard J, Chiesa-Vottero A, Nagore N, et al.** Primary cervical cancer screening and triage using an mRNA human papillomavirus assay and visual inspection. *International Journal of Gynecological Cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2013;23(3):513-8.
16. **Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al.** Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *British Journal of Cancer.* 2013;108:908-13.
17. **Rebolj M, Preisler S, Ejegod DM, Bonde J, Rygaard C, Lyng E.** Prevalence of human papillomavirus infection in unselected SurePath samples using the APTIMA HPV mRNA assay. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2013;15(5):670-7.
18. **Rebolj M, Bonde J, Ejegod D, Preisler S, Rygaard C, Lyng E.** A daunting challenge: human papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women below age 30 years. *European Journal of Cancer.* 2015;51:1456-66.
19. **Heideman DAM, Hesselink AT, van Kemenade FJ, Iftner T, Berkhof J, Topal F, et al.** The Aptima HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. *Journal of Clinical Microbiology.* 2013;51(11):3653-7.
20. **Pyne MT, Hamula CL, Tardif K, Law C, Schlaberg R.** High-risk HPV detection and genotyping by APTIMA HPV using cervical samples. *Journal of Virological Methods.* 2015;221:95-9.
21. **Iftner T, Becker S, Neis KJ, Castanon A, Iftner A, Holz B, et al.** Head-to-Head Comparison of the RNA368 Based Aptima Human Papillomavirus (HPV) Assay and the DNA-Based Hybrid Capture 2 HPV Test in a Routine Screening Population of Women Aged 30 to 60 Years in Germany. *Journal of Clinical Microbiology.* 2015;53:2509-16.
22. **Rebolj M, Bonde J, Preisler S, Ejegod D, Rygaard C, Lyng E.** Human Papillomavirus Assays and Cytology in Primary Cervical Screening of Women Aged 30 Years and Above. *PLoS One.* 2016 Jan 20;11(1):e0147326.
23. **Rebolj M, Bonde J, Ejegod D, Preisler S, Rygaard C, Lyng E.** A daunting challenge: Human Papillomavirus assays and cytology in primary cervical screening of women below age 30years. *Eur J Cancer.* 2015 Jul;51(11):1456-66.
24. **Kacian, D.L. and T.J. Fultz.** 1995. Nucleic acid sequence amplification methods. U. S. Patent 5,399,491.
25. **Arnold, L. J., P. W. Hammond, W. A. Wiese, and N. C. Nelson.** 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem.* **35**: 1588-1594.
26. **Nelson, N. C., A. BenCheikh, E. Matsuda, and M. Becker.** 1996. Simultaneous detection of multiple nucleic acid targets in a homogeneous format. *Biochem.* **35**:8429-8438.

27. **Clad, A., M. Reuschenbach, J. Weischenk, R. Grote, J. Rahmsdorf, and N. Freudenberg.** Performance of the Aptima high-risk HPV mRNA assay in a referral population in comparison with Hybrid Capture 2 and cytology. 2010. *J Clin Microbiol*, n/a. doi: 10.1128/JCM.01674-10.
28. **Ratnam S., F. Coutless, D. Fontaine, J. Bentley, N. Escott, P. Ghatage, G. Holloway, E. Bartellas, N. Kum, and A. Lear.** 2008. Clinical Correlations of Aptima HPV E6/E7 mRNA Test in Cervical Cancer Screening: Preliminary Results from a Multicentre Candian Study. Presented at EUROGIN 2008, November 12-15, 2008, Scientific Communication SS **8-6**.
29. **Szarewski A., L. Ambroisine, L. Cadman, J. Austin, L. Ho, G. Terry, S. Little, R. Dina, J. McCarthy, H. Buckley, C. Bergeron, P. Soutter, D. Lyons, and J. Cuzick.** 2008. Comparison of predictors for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **17(11)**, November.
30. **Castle P.E., J. Dockter, C. Giachetti, F.A.R. Garcia, M. McCormick, A.L.Mitchell, E.B. Holladay, and D.P. Kolk.** 2007. A Cross-sectional Study of a Prototype Carcinogenic Human Papillomavirus E6/E7 Messenger RNA Assay for Detection of Cervical Pre-cancer and Cancer. *Clin Cancer Res.* **13(9)**. 2599.
31. **Monsonogo J., M.G. Hudgens, L. Zerat, J.C. Zerat, K. Syrjänen, P. Halfon, F. Ruiz, and J.S. Smith.** 2010. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid based cytology in primary cervical cancer screening (The FASE study). *Int J Cancer.* n/a. doi 10.1002/ijc.25726.
32. **Datta, S. D., L. A. Koutsky, S. Ratelle, E. R. Unger, J. Shlay, T. McClain, B. Weaver, P. Kerndt, J. Zenilman, M. Hagensee, C. J. Suhr, and H. Weinstock.** 2008. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cytology in Women Screened for Cervical Cancer in the United States, 2003–2005. *Annals Int Med.* **148**:493.
33. **Clifford, G.M., S. Gallus, R. Herrero, N. Muñoz, P. J. F. Snijders, S. Vaccarella, P. T. H. Anh, C. Ferreccio, N. T. Hieu, E. Matos, M. Molano, R. Rajkumar, G. Ronco, S. de Sanjosé, H. R. Shin, S. Sukvirach, J. O. Thomas, S. Tunsakul, C. J. L. M. Meijer, S. Franceschi, and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled Analysis. 2005. *The Lancet.* **366**, 991.
34. **Stoler, M.H., T.C. Wright, Jr., J. Cuzick, J. Dockter, J. Reid, D. Getman, C. Giachetti.** 2013. Aptima HPV assay performance in women with atypical squamous cells of undetermined significance cytology results. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* **208(2)**:144-145.
35. **Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, and Solomon D.** 2006 Consensus Guidelines for the Management of Women with Abnormal Cervical Cancer Screening Tests. 2007. *Am J Obstet Gynecol* **197 (4)**; 346-355.
36. **Pretorius R.G., W. H. Zhang, J. L. Belinson, et al.** Colposcopically directed biopsy, random cervical biopsy, and endocervical curettage in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia II or worse. 2004. *Am J Obstet Gynecol.* **191**:430-434.
37. **Pretorius R.G., R. J. Kim, J. L. Belinson, P. Elson, Y-L Qiao.** Inflation of sensitivity of cervical cancer screening tests secondary to correlated error in colposcopy. 2006. *J Low Genit Tract Dis.* **10(1)**:5-9.



Hologic, Inc.  
10210 Genetic Center Drive  
San Diego, CA 92121 USA

Zákaznická podpora: +1 844 Hologic (+1 844 465 6442)  
customersupport@hologic.com

Technická podpora: +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com



**Emergo Europe**  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands

Další kontaktní informace najdete na webu [www.hologic.com](http://www.hologic.com).

Tento produkt je určen pro použití pouze v oblasti lidské diagnostiky *in vitro*.

Hologic, Aptima, DTS, Leader, Panther, PreservCyt, SB100, ThinPrep a Tigris jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc., případně jejích dceřiných společností v USA a dalších zemích.

eppendorf (stylizovaná) a REPEATER jsou ochranné známky společnosti Eppendorf AG.

RAININ je ochranná známka společnosti Rainin Instruments, LLC.

TECAN a FREEDOM EVO jsou ochranné známky společnosti Tecan Group AG.

SUREPATH a PREPSTAIN jsou ochranné známky společnosti TriPath Imaging, Inc.

Všechny další ochranné známky, které se objeví v této příručce, patří odpovídajícím vlastníkům.

©2007–2017 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.  
AW-14517-2601 Rev. 003

2017-04