Pouze pro profesionální použití

Anyplex™ II

HPV HR Detection

(katalogové číslo HP7E00X, HP10380Z)

Souprava Anyplex™ II PCR určená k detekci lidského papilomaviru: 14 typů HPV s vysokým rizikem (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) ve vzorcích k cytologii v tenké vrstvě a ve vzorcích stěrů z děložního čípku a samoodběru vaginálních vzorků.

Souprava je určena pro použití v přístrojích:

1. Pro použití s 1. Detekční systém CFX96™ PCR v reálném čase (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

2. Systém CFX96™ Dx (software CFX Manager™ Dx v3.1)

CE

IVD **Pouze pro diagnostiku *in vitro***

REF **HP7E00X** Σ 100 REF **HP10380Z** Σ 25

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Soul, Korejská republika 05548

EC REP **Zdravotnická technika Promedt Consulting GmbH**

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Německo

Není k dispozici v USA

OBSAH

UPOZORNĚNÍ ---------- 3

ÚČEL POUŽITÍ ---------- 5

PRINCIPY, PŘEHLED POSTUPŮ ---------- 6

ZÁKLADNÍ INFORMACE ---------- 8

REAGENCIE ---------- 9

SKLADOVÁNÍ PRODUKTU, ZACHÁZENÍ S PRODUKTEM ---------- 11

POTŘEBNÉ PROSTŘEDKY NEOBSAŽENÉ V BALENÍ ---------- 11

PROTOKOL ---------- 12

NASTAVENÍ PŘÍSTROJE RT PCR, ANALÝZA VÝSLEDKŮ ---------- 21

VÝSLEDKY ---------- 51

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ ---------- 56

ÚČINNOST ---------- 58

ODKAZY ---------- 62

VÝZNAM SYMBOLŮ ---------- 63

INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ ---------- 65

UPOZORNĚNÍ

- Pouze pro diagnostické použití in vitro
- Je-li produkt používán spolu s MICROLAB NIMBUS IVD nebo MICROLAB STARlet, pak nejvýše pro 5 separátních běhů.

- **Tento test byl schválen k použití u následujících typů vzorků: stěr z děložního čípku, vzorky k cytologii v tenké vrstvě a samoodběr vaginálních vzorků**. Test nebyl schválen k použití pro žádný jiný typ vzorku.
- **Před použitím musí být vzorky DNA uchovávány při teplotě -70°C a během zpracování musí být uchovávány na ledu.**
- Citlivost analýzy může být nižší u vzorků, které byly opakovaně zmrazovány a rozmrazovány, nebo u dlouho skladovaných vzorků.
- Spolehlivost výsledků závisí na vhodném postupu při odebírání vzorku, správném skladování, přepravě a správném zpracování vzorku.
- Postup prací v laboratoři musí probíhat vždy jednosměrně.
- Ve všech pracovních prostorech používejte vždy jednorázové rukavice, před vstupem do jiného pracovního prostoru rukavice vždy vyměňte. Dojde-li ke kontaminaci rukavic, neprodleně je vyměňte nebo ošetřete dekontaminačním prostředkem na nukleovou kyselinu**.**
- Materiál a používané prostředky přiřaďte vždy k jednotlivým odděleným pracovním prostorům a nepřemisťujte je z jednoho prostoru do jiného.
- Nepipetujte ústy.
- V pracovních prostorech laboratoře nejezte, nepijte, nekuřte. Při zacházení se vzorky a reagenciemi používejte vždy jednorázové bezprašné rukavice, laboratorní plášť a ochranu očí. Po práci se vzorky a reagenciemi si vždy pečlivě umyjte ruce.
- Při odebírání alikvotní části reagencií ze zkumavky zamezte kontaminaci reagencií. Doporučujeme používat sterilní, vůči aerosolu odolné jednorázové špičky na pipetu.
- Nemíchejte reagencie z různých šarží nebo z různých zkumavek jedné šarže.
- Nepoužívejte produkt s prošlým datem exspirace.
- Používejte zkumavky se šroubovacím uzávěrem, zamezte možnému potřísnění nebo křížové kontaminaci vzorků v průběhu jejich přípravy.
- Dbejte, aby nedošlo ke kontaminaci reagencií izolovanými nukleovými kyselinami, produkty PCR ani pozitivní kontrolou. Jako prevenci kontaminace reagencií doporučujeme používat špičky s filtrem.

- Při každém měření využívejte oddělené a izolované pracovní prostory.
- Pro každý z pracovních prostorů (izolace nukleové kyseliny, míchání reagencií, přidání templátu nukleové kyseliny, přidání produktu PCR) si připravte a použijte jinou sadu pipet.
- Reakční zkumavky a stripy zkumavek po amplifikaci otevírejte pouze na k tomu určeném místě, zamezíte tak kontaminaci amplikonem.
- Pozitivní materiály uchovávejte odděleně od souprav reagencií.
- Při práci se vzorky je nezbytné postupovat v souladu s Bezpečnostními pokyny a postupy laboratoře (viz Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích a Dokumenty CLSI). Pečlivě vyčistěte a vydezinfikujte všechny pracovní povrchy pomocí 0,5% roztoku chlornanu sodného (v deionoizované nebo destilované vodě).
- Doba použitelnosti je 13 měsíců při teplotě ≤ -20 ℃ od data výroby. Datum expirace naleznete na konečné etiketě.
- Seegene NIMBUS a Seegene STARlet jsou stejná zařízení jako Microlab NIMBUS IVD a Microlab STARlet IVD, liší se pouze výrobcem. Protože na přístroji nedošlo k žádným hardwarovým změnám, jsou výsledky testů stejné.
- Obchodní název "CFX96TM Real-time PCR Detection System-IVD" se mění na "CFX96TM Dx system". Vzhledem k tomu, že u systémů nedošlo k žádným hardwarovým změnám, očekává se, že z obou systémů budou získány stejné výsledky.
- "CFX ManagerTM Dx Software v3.1" je aktualizovaná verze "CFX ManagerTM Software-IVD v1.6". Aktualizovaný software obsahuje vylepšení nabídky "Run" (Spustit). Tato vylepšení nemají vliv na výsledky analýzy dat, proto jsou výsledky z obou softwarů stejné.
- Tato souprava je určena k diferenciální diagnostice infekcí cílovými patogeny; lidskými papilomaviry.
- Vlastní odběr by měl být proveden ve zdravotnickém zařízení na základě pokynů poskytovatele zdravotní péče.
- AIOS kombinuje Seegene STARlet prodávaný společností Seegene se zařízením pro PCR v reálném čase (CFX96 Dx, výrobce: Bio-Rad) a zařízením pro uzavírání destiček (výrobce: SAMICK THK) a vytváří tak automatizovanou strukturu propojení extrakce nukleových kyselin s PCR.

ÚČEL POUŽITÍ

Analýza Anyplex™ II HPV HR Detection je kvalitativní *in vitro* test určený k detekci 14 typů viru HPV s vysokým rizikem ve vzorcích cytologie v tenké vrstvě, vzorcích stěru z děložního čípku a vaginálního samoodběru. Tato souprava specificky identifikuje nejen HPV 16 a HPV 18, ale dalších 12 jednotlivých vysoce rizikových HPV genotypů (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) v klinicky relevantních stupních infekce.

AnyplexTM II HPV HR Detection je indikována:

a) Vyšetřovat pacientky s výsledky cervikální cytologie ASC US (atypické dlaždicové buňky neurčitého významu), aby bylo možné určit nutnost odeslání ke kolposkopii. Výsledky tohoto testu nemají ženám bránit v přistoupení ke kolposkopii.

b) Screening pacientů s výsledky cervikální cytologie ASC US za účelem posouzení přítomnosti nebo nepřítomnosti HPV 16, HPV 18 a dalších 12 jednotlivých vysoce rizikových genotypů HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68).

c) K použití s cervikální cytologií k doplňkovému screeningu k posouzení přítomnosti nebo nepřítomnosti HPV 16, HPV 18 a dalších 12 jednotlivých vysoce rizikových genotypů HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68).

d) Používá se jako primární screeningový test k identifikaci žen se zvýšeným rizikem rozvoje rakoviny děložního čípku nebo přítomnosti onemocnění vysokého stupně.

e) Používá se jako primární screeningový test k posouzení přítomnosti nebo nepřítomnosti HPV 16, HPV 18 a dalších 12 jednotlivých vysoce rizikových genotypů HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 , 66 a 68).

Výsledek z AnyplexTM II HPV HR Detection spolu s lékařovým posouzením cytologické anamnézy, dalších rizikových faktorů a odborných doporučení může být použit jako vodítko pro léčbu pacienta.

PRINCIPY, PŘEHLED POSTUPŮ

1. Principy

Analýza pomocí souprava Anyplex™ II HPV HR Detection patří mezi patentované technologie společnosti Seegene. Je založena za technologii TOCE™, umožňující detekci více patogenů na jednom fluorescenčním kanále přístroje pro RT PCR.

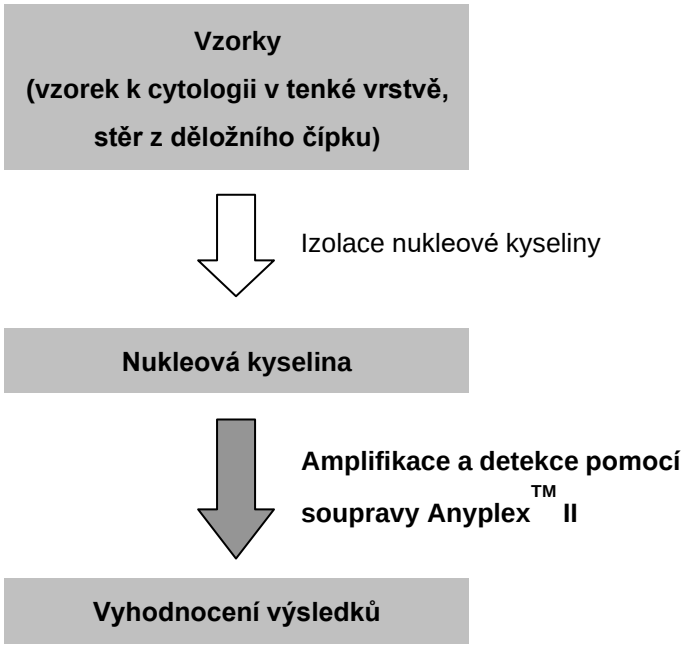
Při analýzách křivek táni prováděných v současnosti jsou často pozorovány teplotní rozdíly u DNA s vysokou variabilitou sekvencí. Tato skutečnost se promítá i do oblasti klinické diagnostiky, kde je přesnost a reprodukovatelnost výsledků testů zásadním faktorem. Technologie TOCE™ je navržena tak, aby výsledky analýzy nebyly variabilitou sekvencí ovlivněny, a byly tak zaručeny konzistentní hodnoty Tm.

Soupravu AnyplexTM II HPV HR Detection lze použít k multiplexní analýze buď s využitím metody End point-CMTA (End point-Catcher Melting Temperature Analysis) nebo metody Cyclic-CMTA (Cyclic-Catcher Melting Temperature Analysis). Metoda Cyclic-CMTA, představující jeden z nové třídy molekulárních testů, umožňuje rozeznat hlavní patogen v koinfikovaných vzorcích. Anyplex™II HPV HR Detection je multiplexní RT PCR analýza umožňující současnou amplifikaci, detekci a rozlišení cílových nukleových kyselin 14 typů HPV s vysokým rizikem (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) a interní kontroly (IC).

Účinnost reakce PCR může být snížena inhibitory, které mohou být v klinických vzorcích přítomny. Součástí tohoto produktu je interní kontrola (IC). Smyslem použití této kontroly je sledování procesu izolace nukleových kyselin a zjištění případné inhibice PCR reakce. Interní kontrola je amplifikována spolu s cílovými nukleovými kyselinami v klinických vzorcích. V soupravě AnyplexTM II HPV HR Detection je jako endogenní interní kontrola použit lidský „provozní“ gen (house-keeping gen), který může zajistit kontrolu purifikace DNA, kontrolu PCR reakce a potvrzení vhodnosti buněk každého jednotlivého vzorku.

V soupravě Anyplex™ II HPV HR Detection je využit systém Uracil-DNA glykosyláza (UDG)- dUTP. Systém UDG-dUTP je obecně používán při PCR reakci k eliminaci přenesení amplikonu, protože UDG „vystřihne“ uracilová rezidua z DNA rozštěpením N-glykosidové vazby.

2. Postup



< Postup při testu Anyplex™ II HPV HR Detection >

ZÁKLADNÍ INFORMACE

Infekce lidským papilomavirem (HPV) vykazuje souvislost s onemocněním rakovinou děložního čípku. Viry HPV lze rozdělit na typy s vysokým rizikem (high risk - HR) a typy s nízkým rizikem (low risk — LR). Dělení je dáno rizikem vyvolání přednádorových změn na děložním čípku.

Z hlediska prevence rozvoje rakovinného onemocnění a postupu nemoci je velmi důležité znát typ HPV, kterým je pacientka infikována. Aktuálně dostupné komerční testy pro diagnostiku HPV jsou založeny na metodách detekce genotypu HPV pomocí hybridizačních sond. Nedostatkem těchto detekčních metod je vysoký poměr falešně pozitivních výsledků, daný křížovou reaktivitou mezi sondami a DNA různých typů viru nebo mezi sondami a PCR amplikony použitými pro hybridizaci. Nabízíme inovovanou metodu detekce/stanovení genotypu HPV viru, při které jsou amplifikovány pouze specifické cíle, bez křížové reaktivity. Detekce je založena na využití reakce RT PCR. Při využití soupravy Anyplex™ II HPV HR Detection dochází k detekci pouze specifických typů viru a k přesnému stanovení genotypu. Součástí soupravy je interní kontrola, sloužící ke zjištění jakékoli případné inhibice reakce PCR. Onemocnění invazivní rakovinou děložního čípku se rozvíjí z přednádorových stavů. Přednádorové změny jsou patrny 7-20 let před rozvojem vlastního karcinomu. Tato relativně dlouhá doba umožňuje při podezření na HPV infekci včasné stanovení diagnózy. Infekce virem HPV s vysokým rizikem může vést k rozvoji rakovinného onemocnění, a to zejména u typů HPV 16 a 18, u kterých je prokázána souvislost s onemocněním rakovinou děložního čípku v 70%. Pomocí soupravy Anyplex™ II HPV HR Detection lze identifikovat současně 14 typů HPV s vysokým rizikem, včetně typů HPV16 a 18.

REAGENCIE

Reagencie obsažené v jedné soupravě postačují pro 100 testů.

Objednací číslo soupravy (REF HP7E00X).

Anyplex™ II HPV HR Detection			
Symbol	**Obsah**	**Objem**	**Popis**
PRIMER	4X HPV HR TOM	500 µl	TOCE Oligo Mix(TOM): - reagencie pro amplifikaci a detekci
PREMIX	4X Anyplex PCR Master Mix (s UDG)	500 µl	- DNA polymeráza - Uracil-DNA glykosyláza (UDG) - pufr s dNTPs
CONTROL +	HPV HR PC1	50 µl	Pozitivní kontrola (PC): - směť patogenních klonů
CONTROL +	HPV HR PC2	50 µl	Pozitivní kontrola (PC): - směs patogenních klonů
CONTROL +	HPV HR PC3	50 µl	Pozitivní kontrola (PC): - směs patogenních klonů
WATER	RNase-free Water	1 000 µl	Ultračistá kvalita, stupeň PCR negativní kontrola (NC): - sterilizovaná voda jako negativní kontrola
	Návod k použití		

Příslušenství - analytický software
Seegene Viewer*

- Analytický software poskytuje společnost Seegene Inc. nebo regionální manažer. Použijte prosím Seegene Viewer V3 a novější.

Reagencie obsažené v jedné soupravě postačují pro 25 testů.Objednací číslo soupravy (REF HP10380Z).

Anyplex™ II HPV HR Detection			
Symbol	**Obsah**	**Objem**	**Popis**
PRIMER	4X HPV HR TOM	125 µl	TOCE Oligo Mix(TOM): - reagencie pro amplifikaci a detekci
PREMIX	4X Anyplex PCR Master Mix (s UDG)	125 µl	- DNA polymeráza - Uracil-DNA glykosyláza (UDG) - pufr s dNTPs
CONTROL +	HPV HR PC1	50 µl	Pozitivní kontrola (PC): - smět patogenních klonů
CONTROL +	HPV HR PC2	50 µl	Pozitivní kontrola (PC): - směs patogenních klonů
CONTROL +	HPV HR PC3	50 µl	Pozitivní kontrola (PC): - směs patogenních klonů
WATER	RNase-free Water	1 000 µl	Ultračistá kvalita, stupeň PCR negativní kontrola (NC): - sterilizovaná voda jako negativní kontrola
	Návod k použití		

Příslušenství - analytický software
Seegene Viewer*

• Analytický software poskytuje společnost Seegene Inc. nebo regionální manažer. Použijte prosím Seegene Viewer V3 a novější.

SKLADOVÁNÍ PRODUKTU, ZACHÁZENÍ S PRODUKTEM

Komponenty soupravy Anyplex™ II HPV HR Detection je třeba skladovat při teplotě -20℃. Při dodržení podmínek skladování je jejich stabilita zaručena do data exspirace, uvedeného na štítku soupravy. Reagencie opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte, mohlo by dojít ke snížení citlivosti testu. Pokud budou reagencie používány pouze občasně, je vhodné je zmrazit po alikvotních částech.

POTŘEBNÉ PROSTŘEDKY NEOBSAŽENÉ V BALENÍ

- Jednorázové nepudrované rukavice (latexové nebo nitrilové)
- Pipety (nastavitelné) a sterilní pipetovací špičky 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavka
- Souprava pro extrakci nukleových kyselin (viz Extrakce nukleových kyselin)
- Proteinázu K (pro Seeprep32)
- Výrobník ledu
- Stolní odstředivka Vortex mixer
- CFX96TM Detekční systém PCR v reálném čase (Bio-Rad)
- CFX96TM Dx System (Bio-Rad)
- Optické ploché stripy s 8 víčky (kat. č. TCS0803, Bio-Rad)
- Nízkoprofilové 0,2 ml 8-zkumavkové proužky bez uzávěru (bílá barva, kat. č. TLS0851, Bio-Rad) Hard shell® 96jamkové PCR destičky, nízký profil, tenká stěna, s okrajem, bílá/bílá (kat. č. HSP9655, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96jamkové PCR destičky, nízký profil, tenká stěna, s okrajem, bílá/bílá, s čárovým kódem (kat. č. HSP9955, Bio-Rad)
- Systém pro management uzávěrů lahviček (kat. č. 6600532-01, Hamilton)
- AIOS (kat. č. SG72100, Seegene)
- Propichovací uzávěr (kat. č. 922119, SPL) (pouze pro použití v AIOS) Permanentní čirá tepelné těsnění (kat. č. 1814035, Bio-Rad)*
- PX1 PCR těsnění destiček (auto-sealer, kat. č. 181-4000, Bio-Rad)*
- Čistý stůl

* Ujistěte se, že používáte vhodnou folii a výše uvedený nástroj na zatavení destiček.

PROTOKOL

1. Odběr, skladování a přeprava vzorků

Poznámka: Se všemi vzorky je nutné zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Zpracovávat je možné pouze vzorky, které byly odebrány, skladovány a přepravovány v naprostém souladu s pokyny uvedenými dále v textu.

Vzorky k cytologii v tenké vrstvě

Stěr z děložního čípku

Vzorek z vaginálního samoodběru

Poznámka: Aby zůstala zachována dostatečná kvalita vzorku, je nutné přepravu uskutečnit co nejdříve. Vzorky musí být přepravovány při teplotě specifikované dále v textu.

A. Odběr vzorků

Vzorky k cytologii v tenké vrstvě

- Postupujte podle návodu k médiu pro odběr vzorku buněk z děložního čípku ThinPrep® (HOLOGIC,USA) nebo SurePath™. (Becton Dickinson, USA), CellPreserv (Kolplast, Brazil) media.

Stěr z děložního čípku

Pro odběr stěru z děložního čípku používejte tyto prostředky:

- K odběru a přepravě vzorků stěru z děložního čípku používejte následující média:
  - ENAT(COPAN)

Souprava pro odběr vzorku	Výrobce	Katalogové číslo
ENAT PM 2ML L-SHAPE APPLICATOR	COPAN	606CS01L

- Vzorek stěru ponechejte v médiu pro přepravu. Kontejner se vzorkem uzavřete a označte štítkem. Pečlivě dodržujte všechny pokyny pro uchovávání a přepravu vzorku.
- Při odběru cylindrických a skvamózních epitelových buněk nejprve odstraňte hlen, poté postupujte podle doporučeného protokolu.

Vzorek z vaginálního samoodběru

- K odběru vaginálního vzorku z vlastního odběru použijte prosím následující materiál:
  - Rovers® Evalyn® Brush (Rovers Medical Devices B.V., Nizozemsko)
  - Qvintip® (Aprovix AB, Švédsko)

Self-sampling device	Manufacturer	Cat. No.
Rovers® Evalyn® Brush	Rovers Medical Devices B.V.	380500131
Qvintip®	Aprovix AB	10-002

- Samoobslužný vaginální vzorek lze odebrat a uložit do roztoku ThinPrep® PreservCyt®.
- Při odběru a uchovávání vzorků vaginálních buněk se řiďte pokyny každého výrobce odběrového zařízení a transportního média.

B. Skladování a transport vzorků

U opakovaně rozmrazovaných a zmrazovaných vzorků, a u vzorků skladovaných delší dobu může dojít ke snížení citlivosti testu.

Specimen	Media	Storage & Transport		Note
		Temp.	Duration*	
Cervical swab	eNAT®	2~8℃ & Room Temperature**	90 days	- Performance may be affected by prolonged storage of specimens. - Specimens should also adhere to local and national instructions for transport of pathogenic material.
Liquid-based cytology	ThinPrep®			
	SurePath™			
	CellPreserv			
Self-collected vaginal specimen	ThinPrep®			

- *Trvání: Vzorek odebraný z období před zkouškou, včetně skladování a přepravy vzorku před zkouškou.
- ** Optimální teplota pro přepravu je 2~25℃℃.
- Poznámka: Účinnost testu může být ovlivněna dlouhodobým skladováním. Vzorky by také měly dodržovat místní a národní pokyny pro přepravu patogenního materiálu.

2. Izolace nukleové kyseliny

Na trhu je k dispozici množství souprav pro izolaci nukleové kyseliny od různých výrobců. Vždy používejte množství vzorku podle daného protokolu. K použití spolu s touto detekční soupravou byly schváleny soupravy pro izolaci nukleové kyseliny uvedené dále v textu.

A. Předúprava vzorků k cytologii v tenké vrstvě

- Nechte teplotu vzorků vyrovnat na pokojovou teplotu (19~25°C).
- Odstřeďujte 1 ml vzorku k cytologii v tenké vrstvě po dobu 15 minut při 15 000 x *g* (13 000 ot/m).
- Odstraňte supernatant. Po jeho odstranění vortexem pečlivě resuspendujte pelet s doporučeným objemem 1X PBS (200~300µl, viz Doporučený objem 2-C, D).

Poznámka: Krok předúpravy procesu s použitím lyzačního pufru v extrakční sadě, nikoli 1X PBS, pokud jsou vzorky odebírány v médiu SurePathTM a byly by analyzovány pomocí Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS nebo Seegene STARlet.

Poznámka: Média ThinPrep® a SurePathTM lze zpracovat bez předběžné úpravy při použití Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS nebo Seegene STARlet.

Poznámka: CellPreserv a vaginální vzorek z vlastního odběru nevyžadují krok předběžného ošetření.

Poznámka: SurePathTM a CellPreserv nebyly validovány pomocí soupravy STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit.

Poznámka: CellPreserv nebyl validován pomocí STARMag 96 ProPrep C (Plate) a STARMag 96 ProPrep C (Tube).

Poznámka: Pokud je vzorek odebrán do média SurePath™ a bude analyzován v přístroji NIMBUSnebo STARlet, použijte namísto 1X PBS lytický pufr z izolační soupravy.

- Postupujte podle protokolu výrobce.

B. Stěr z děložního čípku

- Nechte teplotu vzorku vyrovnat s pokojovou teplotou (19~25°C).
- Vzorky stěrů z děložního čípku s odběrovým tamponem umístěné v médiu pro přepravu kultury je třeba rozmíchat vortexem.
- Víčka zkumavek se vzorky je třeba otevírat opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci. Všechen nadbytečný hlen ve vzorku je třeba v tomto okamžiku ze vzorku odebrat. Veškerou reziduální tekutinu z hlenu a odběrového tamponu je třeba vytlačit zmáčknutím proti boční stěně zkumavky. Poté je nutné tampon a hlen odstranit a zlikvidovat.
- Vzorky odebrané pomocí ENAT mohou být rovnou zpracovány mimo původní kontejner.

C. Soupravy pro manuální přípravu

Souprava pro izolaci	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
QIAamp® DNA Mini Kit*	QIAGEN	51304	Vzorek: 200 µl Eluce: 50 µl
Ribo_spin vRD** (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	GeneAll	302-150 SG1701***	Vzorek: 200 µl Eluce: 50 µl

* V případě média SurePath™ použijte při lýze místo pufru AL 180 µl pufru ATL.

** Soupravu Ribo_spin vRD nelze použít s médiem SurePath™.

*** Při objednávání těchto produktů u společnosti Seegene, Inc. použijte uvedená katalogová čísla.

D. Zařízení pro automatickou purifikaci

Poznámka: Použijte prosím doporučené objemy vzorku a eluce, jak je uvedeno níže. Pro ostatní viz protokol výrobce.

D-1. MICROLAB NIMBUS IVD

Poznámka: Informace naleznete v Návodu k obsluze MICROLAB NIMBUS IVD.

Zařízení pro automatickou purifikaci	Výrobce	Kat. č.	Doporučený objem
MICROLAB NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit**	Seegene	EX00013C	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

*Při objednávání produktu u společnosti Seegene, Inc. použijte toto katalogové číslo.

** SurePathTM a CellPreserv nebyly validovány pomocí soupravy STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit.

D-2. MICROLAB STARlet IVD

Poznámka: Informace naleznete v Návodu k obsluze MICROLAB STARlet.

Zařízení pro automatickou purifikaci	Výrobce	Kat. číslo	Doporučený objem
MICROLAB STARlet	Hamilton	173000-075*	
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit**	Seegene	EX00013C	Vzorek: 300 µl Eluce: 100 µl

*Při objednávání produktu u společnosti Seegene, Inc. použijte toto katalogové číslo.
** SurePathTM a CellPreserv nebyly validovány pomocí soupravy STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit.

D-3. Seegene Nimbus-IVD

Poznámka: Informace naleznete v Návodu k obsluze Seegene Nimbus-IVD

Automated Extraction System	Manufacturer	Cat. No.	Recommended Vol.
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Specimen: 300 µL Elution: 100 µL
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit*	Seegene	EX00013C	Specimen: 300 µL Elution: 100 µL

*Při objednávání produktu u společnosti Seegene, Inc. použijte toto katalogové číslo.
** SurePathTM a CellPreserv nebyly validovány pomocí soupravy STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit.

D-4. Seegene STARlet

Poznámka: Informace naleznete v Návodu k obsluze Seegene STARlet

Automated Extraction System	Manufacturer	Cat. No.	Recommended Vol.
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Specimen: 300 µL Elution: 100 µL
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit*	Seegene	EX00013C	Specimen: 300 µL Elution: 100 µL
STARMag™ S96H N Kit**	Seegene	EX00036P EX00037P	Specimen: 300 µL Elution: 60 µL

*SurePathTM a CellPreserv nebyly validovány pomocí soupravy STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit.

** Sada STARMagTM S96H N je navržena a validována pro použití s konfigurací Seegene STARlet s hlavicí sondy CO RE 96.

D-5. NucliSENS® easyMAG®

- Pokračujte v procesu extrakce pomocí „obecného protokolu“.

Automated Extraction System	Manufacturer	REF	Recommended Vol.
NucliSENS® easyMAG®	bioMérieux	200111	Specimen: 200 µL Magnetic Silica: 50 µL Elution: 100 µL

D-6. SEEPREP32

- Pokračujte v procesu extrakce pomocí „**Pro-Protocol A**“.

Automated Extraction System	Manufacturer	REF	Recommended Vol.
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	Seegene	EX00009P	Specimen: 200 µL Elution: 100 µL
STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	Seegene	EX00009T	Specimen: 200 µL Elution: 100 µL
STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)*	Seegene	EX00017P	Specimen: 200 µL Elution: 100 µL
STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)*	Seegene	EX00017T	Specimen: 200 µL Elution: 100 µL

*CellPreserv nebyl validován pomocí STARMag 96 ProPrep C (Plate) a STARMag 96 ProPrep C (Tube).

E. Shrnutí

1.

Extraction Method	Applicated sampling device
Microlab NIMBUS IVD / Microlab STARlet IVD / Seegene NIMBUS / Seegene STARlet [8]	eNAT®, ThinPrep®, SurePath™ [1,2], CellPreserv [1]
SEEPREP12™ [3]	eNAT®, ThinPrep® [7], SurePath™
NucliSENS® easyMAG® [4]	eNAT®, ThinPrep® [7], CellPreserv
QIAamp® DNA Mini Kit	eNAT®, ThinPrep®, SurePath™ [5], CellPreserv
Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	eNAT®, ThinPrep®, CellPreserv
SEEPREP32	eNAT®, ThinPrep®, CellPreserv [6]

1.SurePathTM a CellPreserv nebyly validovány pomocí soupravy STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit.

2. Pokud je DNA extrahována ze vzorků SurePathTM pomocí Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS nebo Seegene STARlet, existuje možnost, že by se citlivost mohla snížit ve srovnání s jinými extrakčními metodami.

3. Dostupné pouze pro SEEPREP12TM Viral NA Kit.

4. Systém NucliSENS® easyMAG

5. V případě média SurePathTM zpracujte krok lýzy s použitím 180 µl ATL pufru místo AL pufru.

6. CellPreserv nebyl validován pomocí STARMag 96 ProPrep C (Plate) a STARMag 96 ProPrep C (Tube).

7. Média ThinPrep® se samoodebíranými vaginálními vzorky nebyla validována pomocí NucliSENS®easyMAG®.

8. Sada STARMagTM S96H N je navržena a ověřena pro použití s konfigurací Seegene STARlet s hlavicí sondy CO-RE 96.

* Volitelně: Systém pro správu uzávěru lahvičky lze použít s Microlab STARlet IVD a Seegene STARlet.

** Volitelné: AIOS lze použít se Seegene STARlet.

3. Příprava pro RT PCR

Poznámka: Při použití Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet pro tento krok prostudujte návod k použití

Poznámka: Je nutné používat správné typy zkumavek a víček (viz část POTŘEBNÉ PROSTŘEDKY NEOBSAŽENÉ V BALENÍ).

Poznámka: Při přípravě vzorků používejte špičky s filtrem aerosolu a přiléhavé rukavice. Postupujte velmi pečlivě, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.

Poznámka: Zcela rozmrazte reagencie na ledu.

Poznámka: Zkumavky s reagenciemi krátce odstřeďte, odstraníte tak kapičky z vnitřní strany víčka.

Poznámka: **Kroky A~D jsou automaticky zpracovávány na Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS a Seegene STARlet. Viz návod k obsluze**

A. Příprava PCR mixu

5 µl	4X HPV HR TOM
5 µl	4X Anyplex PCR Master Mix (s UDG)
5 µl	RNase-free Water
5 µl	nukleová kyselina vzorku
20 µl	celkový reakční objem pro PCR reakci

Poznámka: Celkový potřebný objem jednotlivých reagencií vypočtěte podle počtu všech reakcí (vzorky + kontroly).

B. Pětkrát zkumavku otočte nebo rychle protřepejte ve vortexu a zkumavky krátce odstřeďte.

C. Alikvotní část 15 µl směsi PCR Mastermix do zkumavek pro PCR.

D. Přidejte 5 µl nukleových kyselin každého vzorku do zkumavky obsahující PCR Mastermix.

15 µl	PCR mix
5 µl	Vzorek nukleové kyseliny
20 µl	celkový reakční objem

Poznámka: Pro každý vzorek použijte novou sterilní špičku na pipetu.

Poznámka: Pro **negativní kontrolu** použijte místo nukleové kyseliny vzorku 5 µl RNase-free Water.

Poznámka: Pro **pozitivní kontrolu** použijte 5 µl od každé pozitivní kontroly HPV HR PC1, PC2 a PC3.

Poznámka: Dbejte, aby pozitivní kontrolou nedošlo ke křížové kontaminaci PCR mastermixu a vzorků.

Poznámka: Štítek s označením neumisťujte na víčko reakční zkumavky, fluorescence je detekována přes víčko.

- **Pozitivní kontrola**

Souprava obsahuje tři zkumavky s pozitivními kontrolami: HPV HR PC1, PC2 a PC3.

Každá pozitivní kontrola obsahuje klony pro 5 cílů.

Poznámka: Připravte tři zkumavky pozitivní kontroly.

Pozitivní kontrola

Name	FAM			HEX			CalRed 610			Quasar 670			Quasar 705			Auto interpretation
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC	35	18	56	68	31	
PC1	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	Positive Control (+)
PC2	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	Positive Control (+)
PC3	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	Positive Control (+)

NASTAVENÍ PŘÍSTROJE RT PCR, ANALÝZA VÝSLEDKŮ

1. CFX96™ Real time PCR Detection System (CFX ManagerTM Software IVD v1.6)

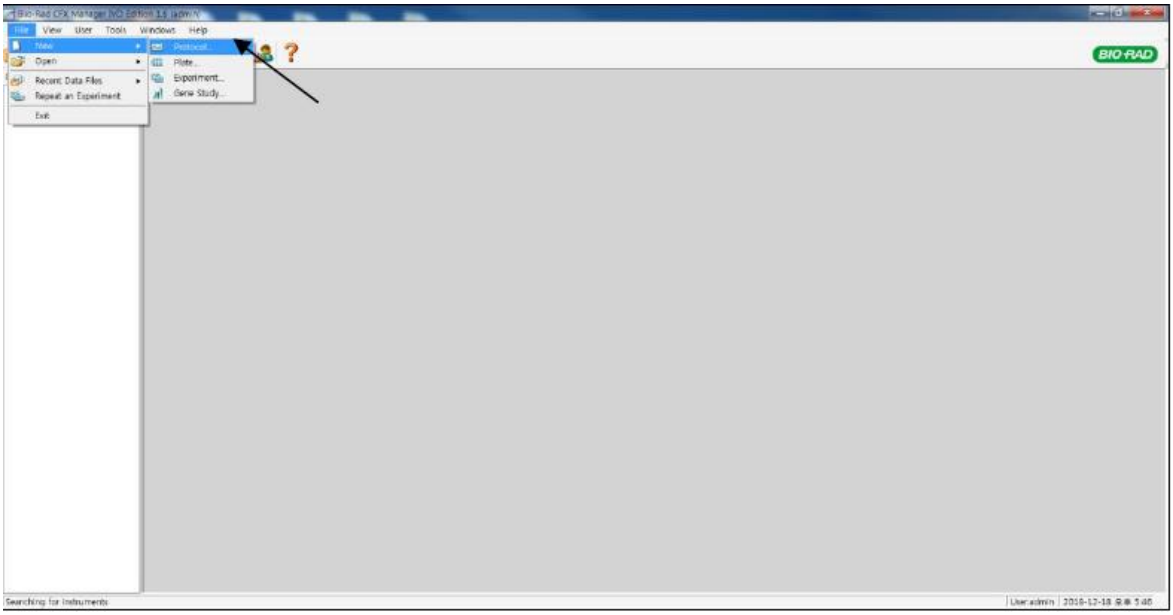
1.1. Nastavení přístroje RT PCR

Poznámka: Nastavení přístroje CFX96™ Real-time PCR System(Bio-Rad) lze rozdělit do následujících tří kroků:

- Nastavení Protocol
- Nastavení Plate
- Start Run

A. Nastavení Protocol

1) V hlavní nabídce klikněte na Protocol, otevře se okno Experiment Setup.



Obr. 1. Nastavení **Protocol.**

Pro prováděné měření vytvořte nový nebo načtěte již existující protokol.

2) V Protocol Editoru zadejte teplotní profily podle následující tabulky:

i) Cyclic-CMTA (Melt analysis of three times)

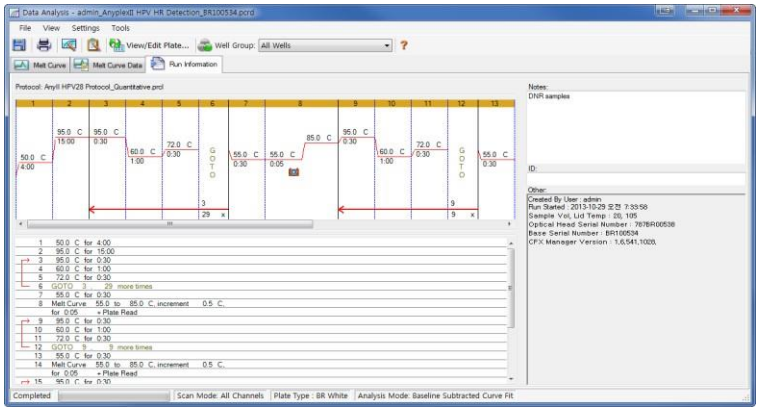
Segment	Temperature (teplota)	Duration (doba trvání)	No. of cycles (počet cyklů)
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 29 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	GOTO 9, 9 more times		
13	55°C	30 sec	
14*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
15	95°C	30 sec	10
16	60°C	1 min	
17	72°C	30 sec	
18	GOTO 15, 9 more times		
19	55°C	30 sec	
20*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

Poznámka: Plate Read na Segment 8, 14 and 20. Fluorescence je detekována při tání (melting).

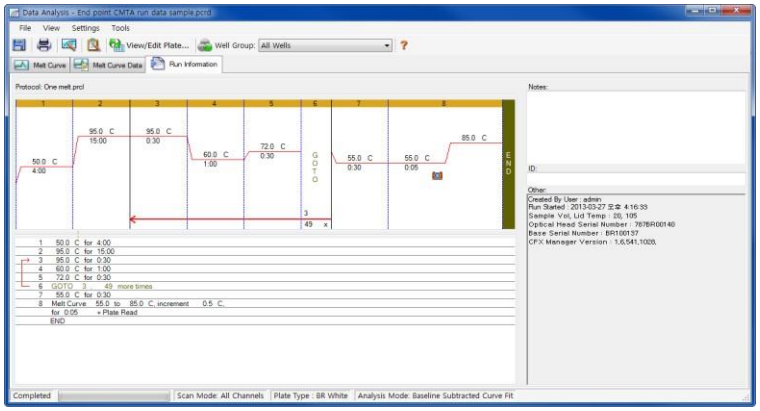
ii) End point-CMTA (Melt analysis of one time)

Segment	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	50
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 49 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

Poznámka: Plate Read na Segment 8. Fluorescence je detekována při tání (melting)**.**



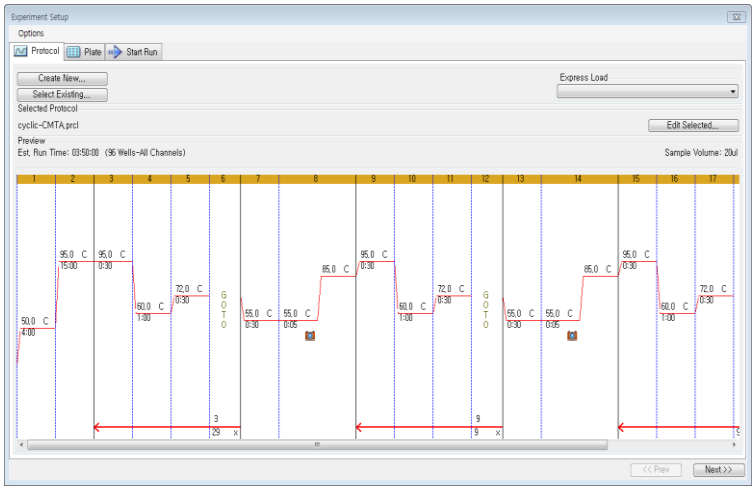
Obr. 2. **Protocol Editor** (Cyclic-CMTA)



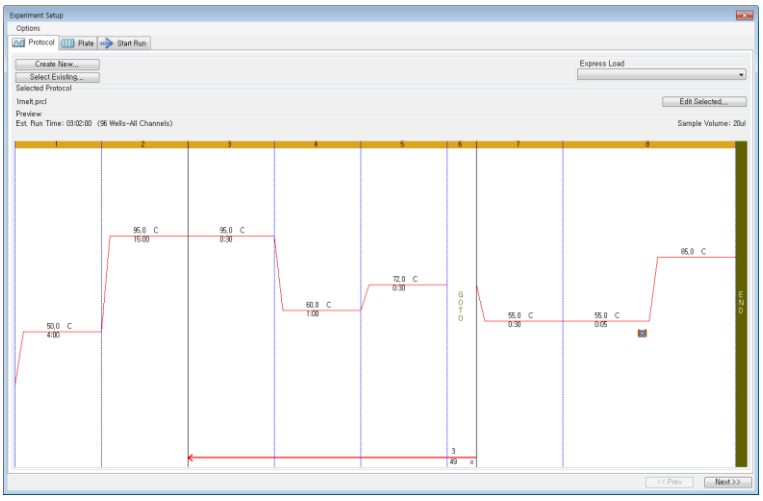
Obr. 3. **Protocol Editor** (End point-CMTA)

3) Klikněte na okno **Sample Volume** a zadejte 20 µl.

4) Klikněte na tlačítko **OK,** otevře se okno **Experiment Setup**.



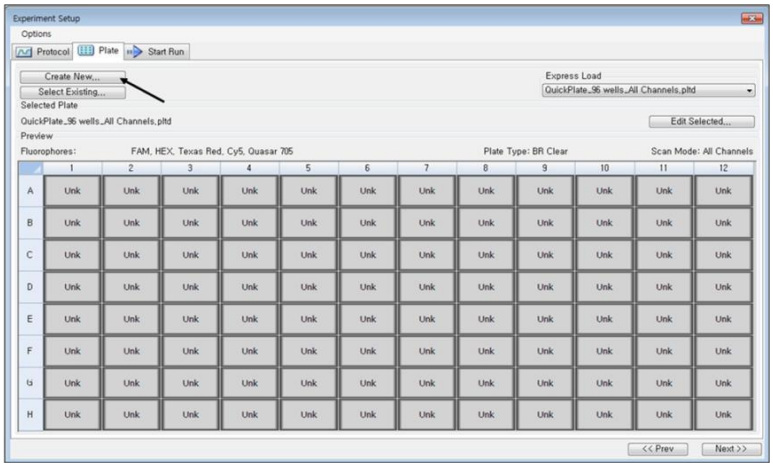
Obr. 4. **Experiment Setup Protocol** (Cyclic-CMTA)



Obr. 5. **Experiment Setup Protocol** (End point-CMTA)

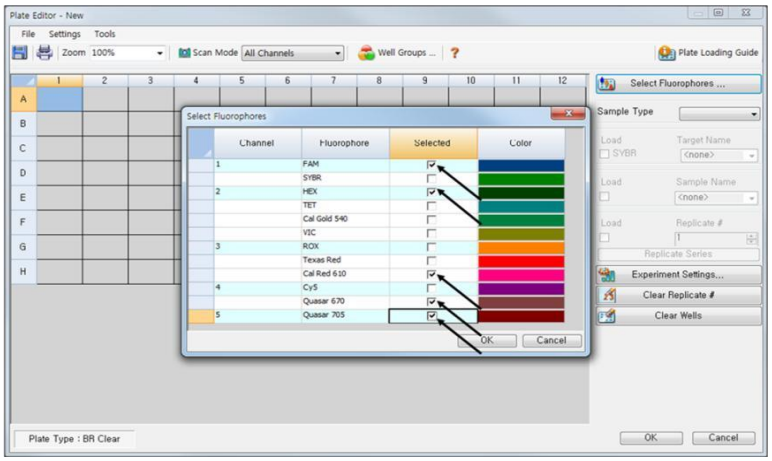
B. Nastavení Plate

1) V okně **Experiment Setup Plate** klikněte na tlačítko **Create New.** Tím otevřete **Plate Editor,** kde můžete zadat nové parametry.



Obr. 6. **Plate Editor**. Zadejte nové parametry plata nebo načtěte již uložené.

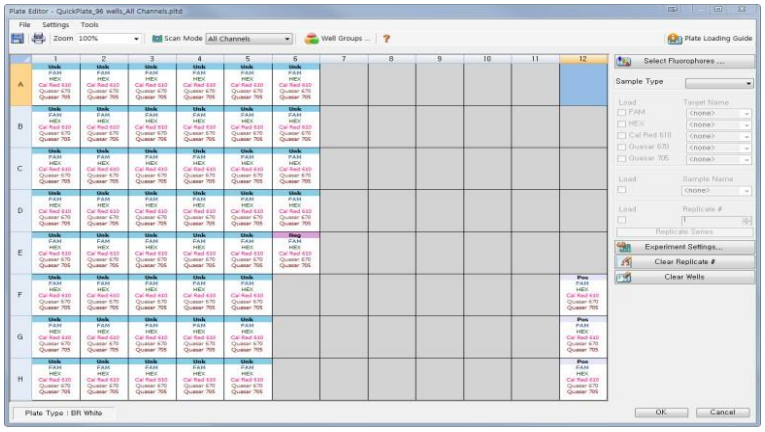
2) Klikněte na tlačítko **Select Fluorophores**, v zobrazeném okně vyberte kanály, které budou při měření použity (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610, Quasar 670** a **Quasar 705**).



Obr. 7. **Select Fluorophores**(**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610, Quasar 670** a **Quasar 705**).

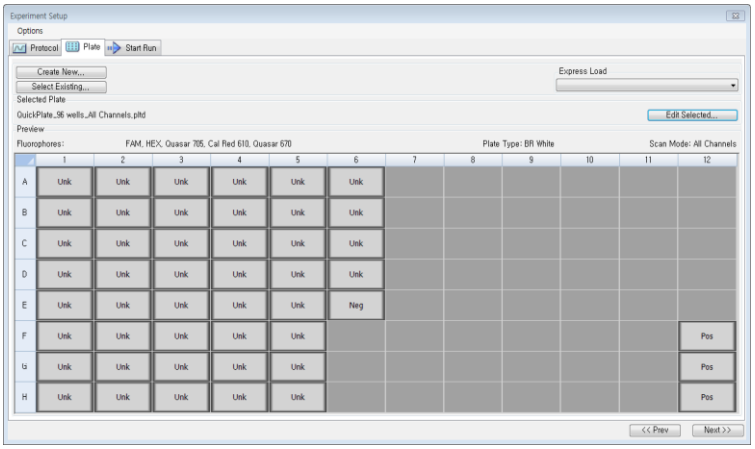
3) Vyberte jamku a následně v roletovém menu **Sample Type** vyberte typ vzorku v jamce.
   - **Unknown**: klinické vzorky
   - **Negative Control** (negativní kontrola)
   - **Positive Control** (pozitivní kontrola)

4) Kliknutím na příslušná zaškrtávací okénka (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610, Quasar 670** a **Quasar705**) vyberte měřící kanály pro zvolené jamky.
5) Zadejte **Sample Name** a **PC(PC1, PC2** a **PC3)**, poté stiskněte tlačítko Enter.
6) Ve volbě **Settings** hlavního menu **Plate Editoru** zvolte **Plate Size(96 Wells)** a **Plate Type (BR White)**.



Obr. 8. **Plate Setup**.

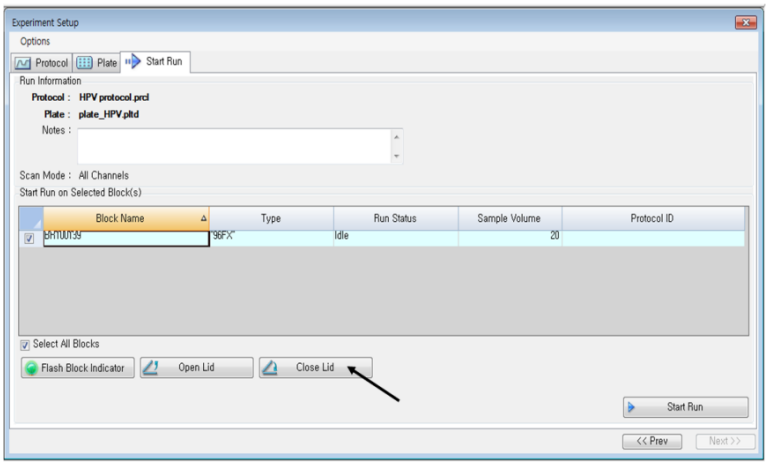
7) Klikněte na tlačítko **OK** a soubor s údaji nastavení nového plata uložte.
8) Poté bude zobrazeno okno **Experiment Setup**.



Obr. 9. **Experiment Setup Plate**.

C. Start Run

1) V okně **Experiment Setup Start Run** klikněte na tlačítko **Close Lid**, dojde k zavření víka.



Obr. 10. **Close Lid.**

2) Klikněte na tlačítko **Start Run**.
3) Soubor měření uložte buď ve složce My documents nebo v jiné, k tomu určené složce.Zadejte název souboru a stiskněte tlačítko **SAVE**, tím dojde ke spuštění přístroje.

1.2. Analýza dat

A. Vytvoření složky určené k uložení dat

A-1. Cyclic-CMTA

• Použití funkce 'Export All Data Sheet to excel' function (viz str. 23)

1) Za účelem uložení dat ze souboru výsledků pro každý bod tání vytvořte tři složky.
2) Název složky pro data prvního bodu tání je "1", pro data druhého bodu tání "2" a pro datatřetího bodu tání "3".

• Použití funkce 'Seegene Export' (viz str. 26)

1) Pro uložení dat ze souboru výsledků pro bod tání vytvořte jednu složku.
2) Název složky zadejte dle Vaší volby.
3) Při využití funkce 'Seegene Export' jsou v rámci složky vytvořené uživatelem automaticky

vytvořeny podsložky 1, 2 a 3, do kterých budou uložena data pro jednotlivé body tání.

A-2. End point-CMTA

1) Pro uložení dat ze souboru výsledků pro bod tání vytvořte jednu složku.
2) Název složky zadejte podle vlastní volby.

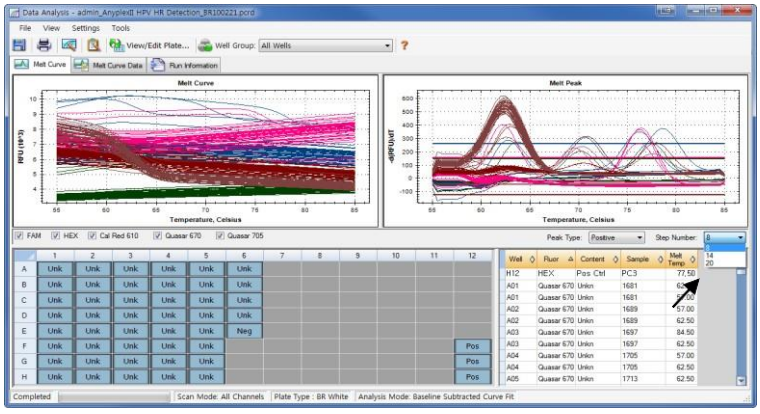
B. Přednastavní pro analýzu dat CFX96™

B-1. Použití funkce ‘Export All Data Sheet to excel’

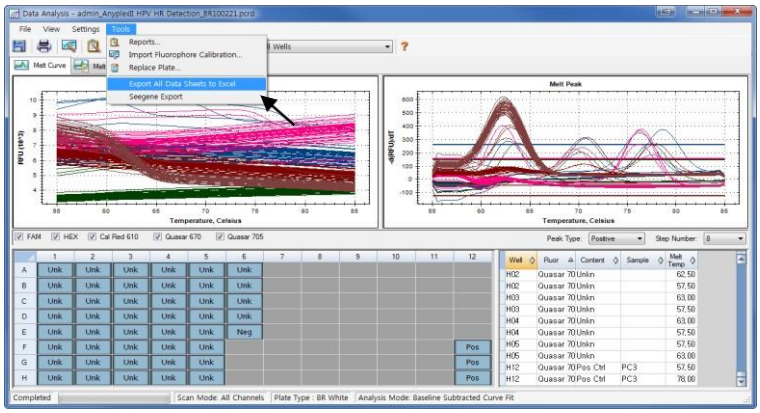
1) Po dokončení testu klikněte na pole Melt curve, tak výsledky Melt Peak akceptujete.

Obr. 11. **Výsledek Melting peak.**

2) Na nástrojové listě zvolte **Step number** “**8**” a vyberte “**Export All Data Sheets to Excel**”.**Poznámka: V případě End point-CMTA zvolte rovnou “Export All Data Sheets to Excel”.**



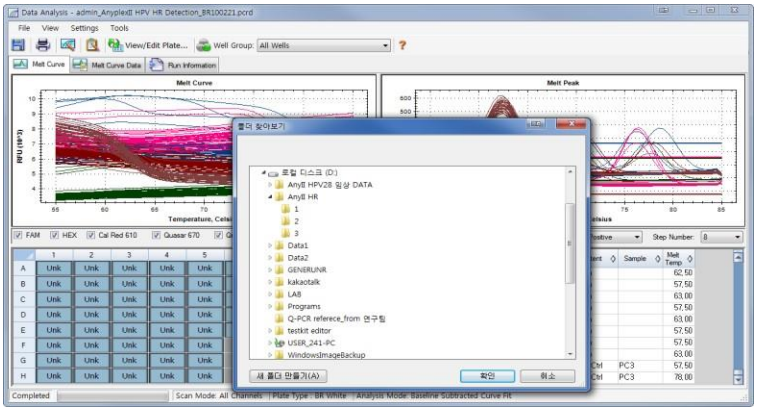
Obr. 12a. **Výsledek Melting peak.**



Obr. 12b**. Export All Data sheets to excel.**

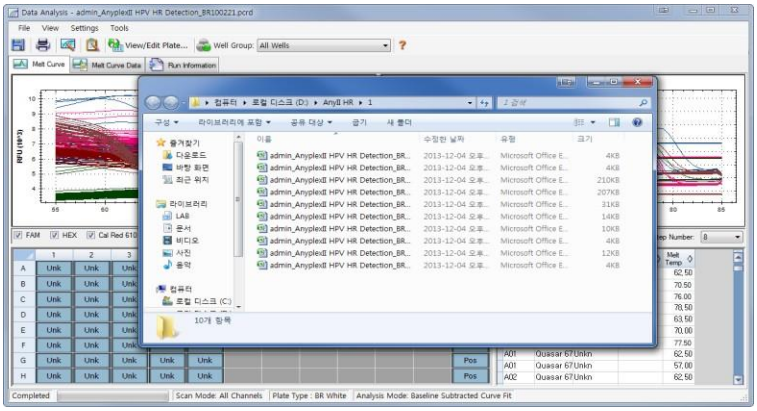
3) Po otevření nového okna uložte výsledek do **složky "1"**.

Poznámka: V případě End point-CMTA uložte výsledek do libovolné složky.



Obr. 13. **Export všech dat z tabulek analýzy dat do určené složky.**

4) Ujistěte se, že výsledek byl do složky uložen.



Obr. 14**. Exportované soubory výsledků.**

Poznámka: V případě End point-CMTA přeskočte kroky 5)~7) a pokračujte dalším krokem analýzy.

5) Vraťte se do kroku 2) a zvolte **Step number** "**14**". Opakujte kroky 3) a 4) a uložte datado **složky "2"**.

6) Vraťte se do kroku 2) a zvolte **Step number "20"**.

7) Opakujte kroky 3) a 4), data uložte do **složky "3"**. Data z jednotlivých kroků (Step number) jsou uložena následovně.

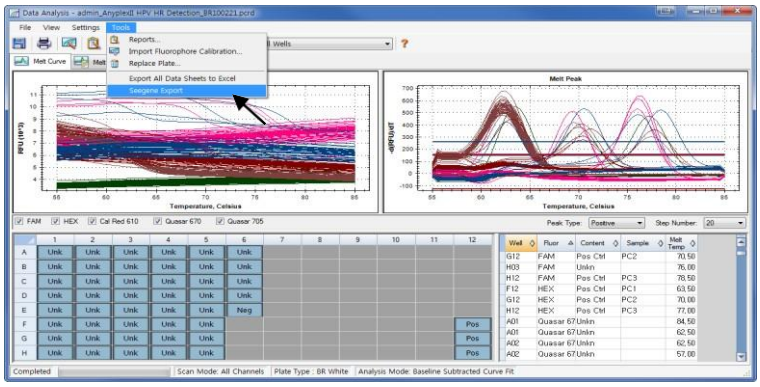
Step number	Složka
8	1
14	2
20	3

B-2. Použití funkce ‘Seegene Export’

1) Po dokončení testu klikněte na pole Melt curve, tím výsledky Melt peak akceptujete.

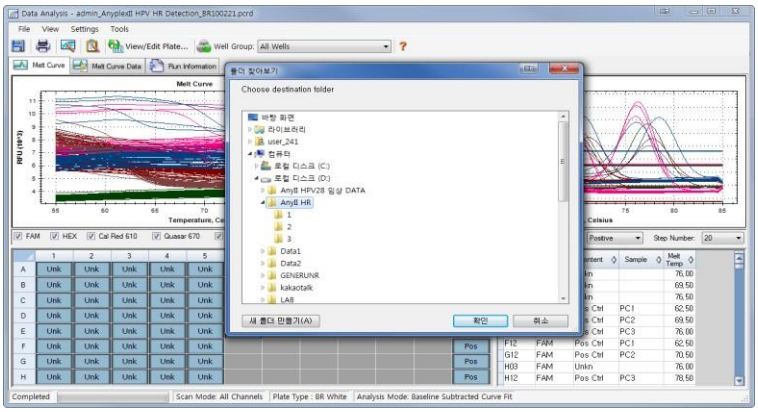
Obr. 15**. Výsledek Melt peak.**

2) V menu Tools zvolte **Seegene Export**.



Obr. 16**. Seegene Export.**

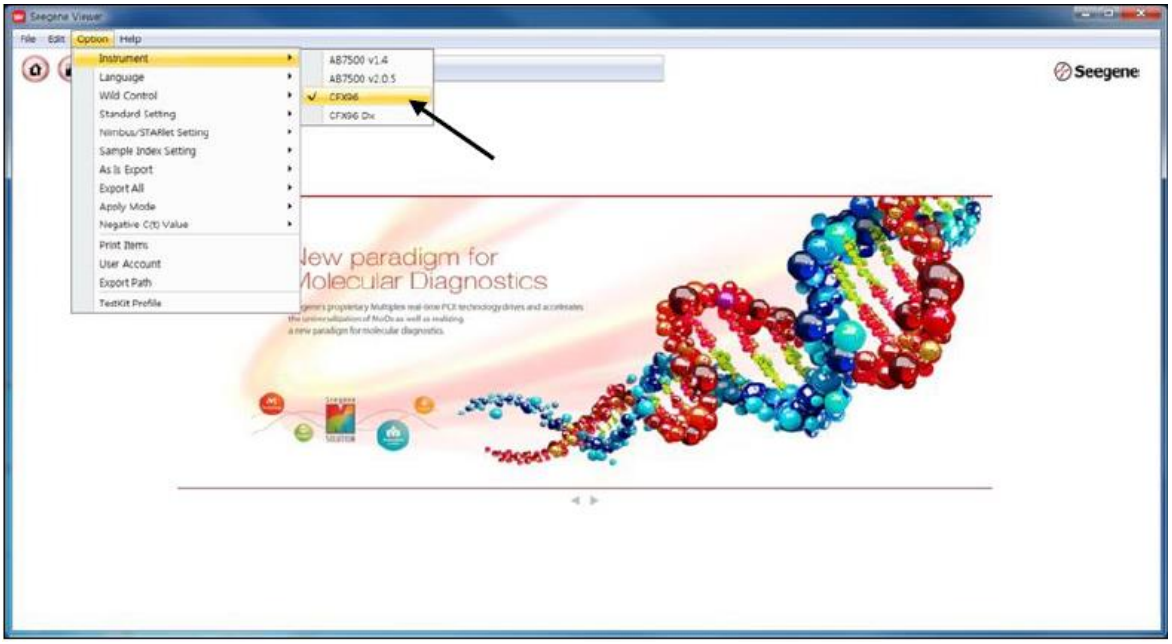
3) Vyberte složku, do které budou data uložena, a klikněte na tlačítko OK.



Obr. 17**. Seegene Export dat z tabulek analýzy do určené složky.**

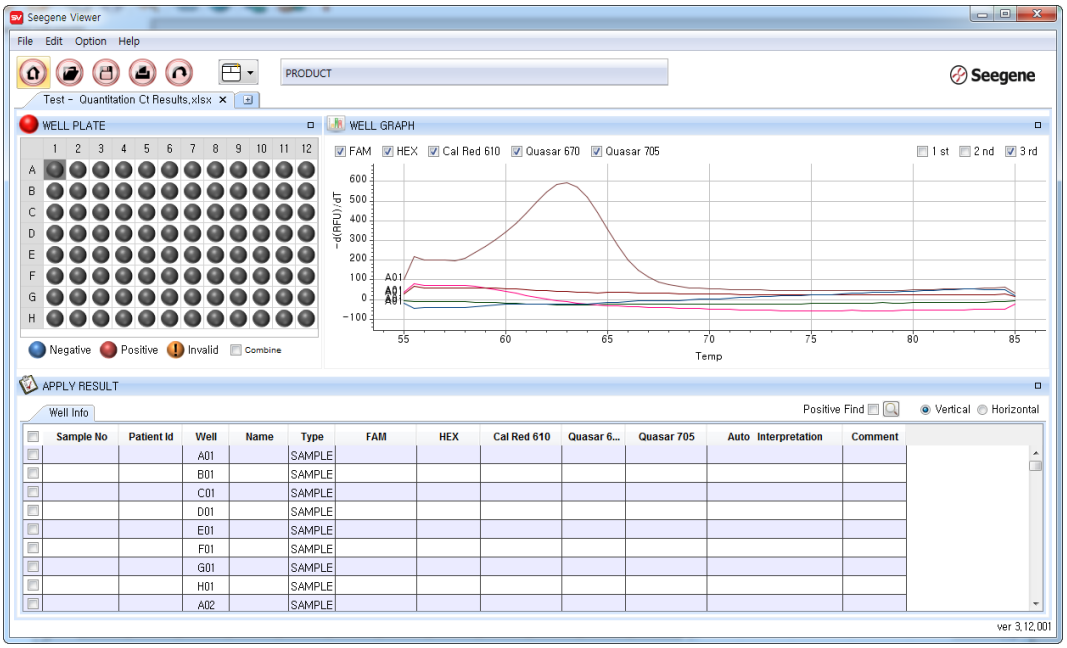
C. Nastavení pro analýzu dat v Seegene Viewer

1) Na obrazovce spusťte program Seegene Viewer, klikněte na tlačítko Option, a vyberte **CFX96** v záložce Instrument.



Obr. 18. **Seegene viewer**

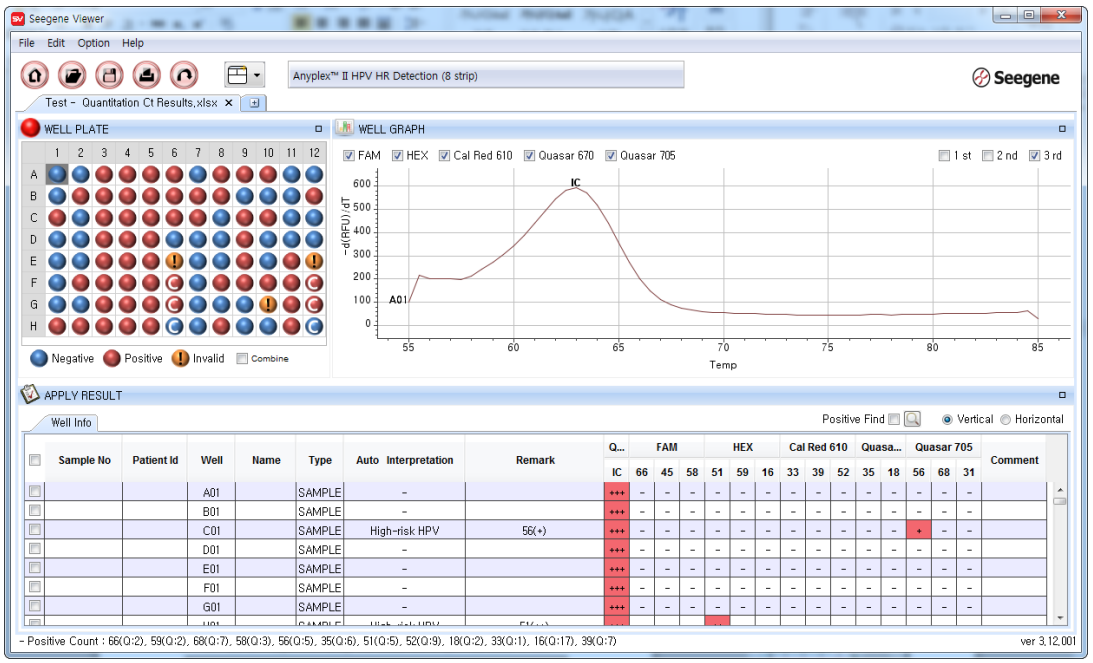
2) Po otevření souboru výsledků klikněte na PRODUCT a ze seznamu vyberte testovací soupravu.



Obr. 19. **Nastavení pro analýzu dat v Seegene Viewer.**

Poznámka: Současně s výběrem testovací soupravy zaškrtněte typ zkumavky (8-strip nebo 96 plate).

3) Zkontrolujte výsledky u jednotlivých jamek.



Obr. 20. **Výsledek testu CFX96™ na Seegene Viewer.**

2. CFX96™ Dx System (CFX ManagerTM Dx Software v3.1)

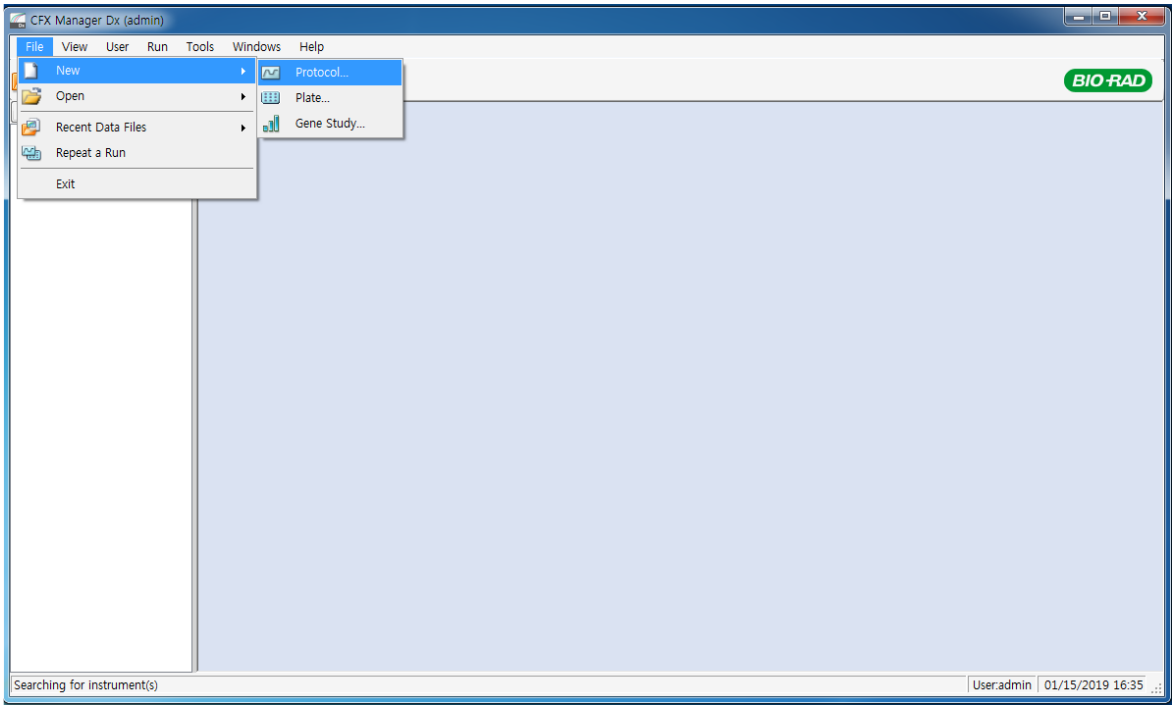
2.1. Nastavení přístroje RT PCR

Poznámka: Nastavení přístroje CFX96™ Real-time PCR System(Bio-Rad) lze rozdělit do následujících tří kroků:

- Nastavení Protocol
- Nastavení Plate
- Start Run

A. Nastavení Protocol

1) V hlavní nabídce klikněte na Protocol, otevře se okno Experiment Setup.



Obr. 1. Nastavení **Protocol.**

Pro prováděné měření vytvořte nový nebo načtěte již existující protokol.

2) V Protocol Editoru zadejte teplotní profily podle následující tabulky:

i) Cyclic-CMTA (Melt analysis of three times)

Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 29 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	GOTO 9, 9 more times		
13	55°C	30 sec	
14*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
15	95°C	30 sec	10
16	60°C	1 min	
17	72°C	30 sec	
18	GOTO 15, 9 more times		
19	55°C	30 sec	
20*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

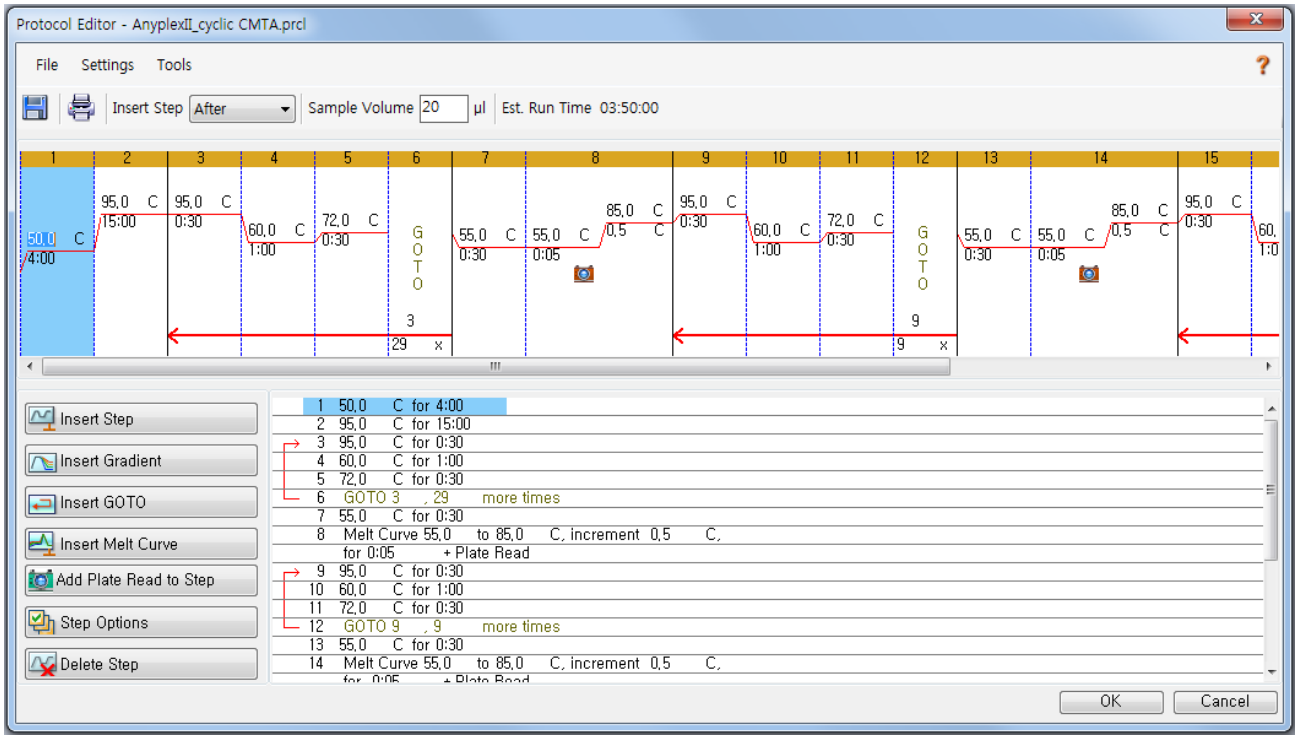
Poznámka: Plate Read na Segment 8, 14 and 20.

Fluorescence je detekována při tání(melting).

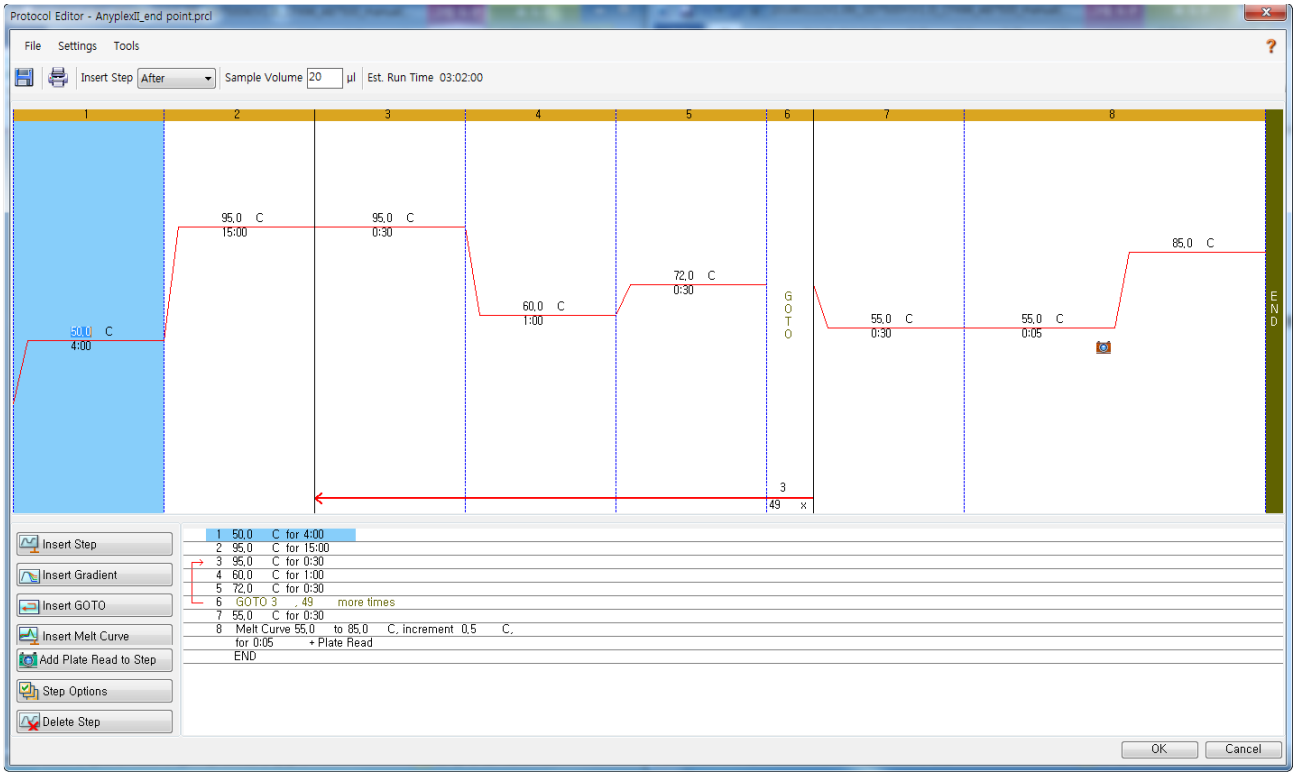
ii) End point-CMTA (Melt analysis of one time)

Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	50
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 49 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		

Poznámka: Plate Read na Segment 8. Fluorescence je detekována při tání (melting)**.**



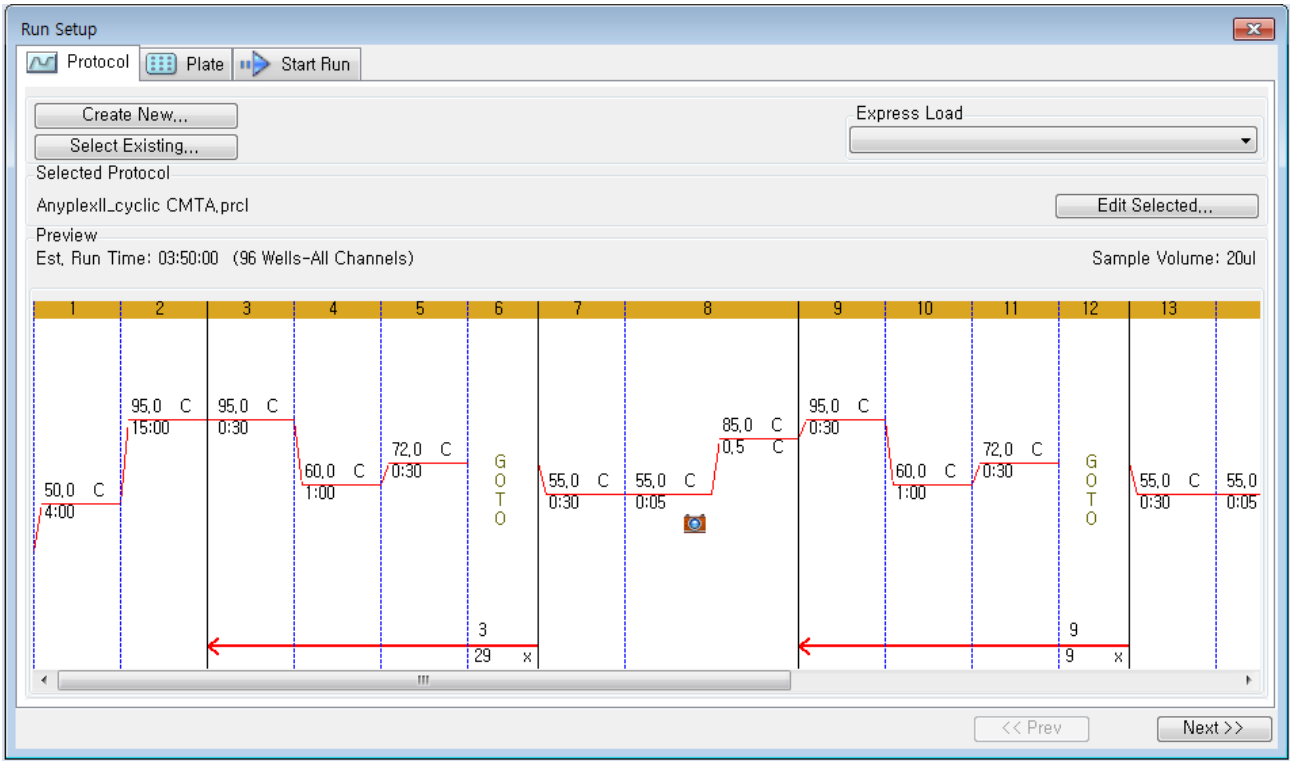
Obr. 2. **Protocol Editor** (Cyclic-CMTA)



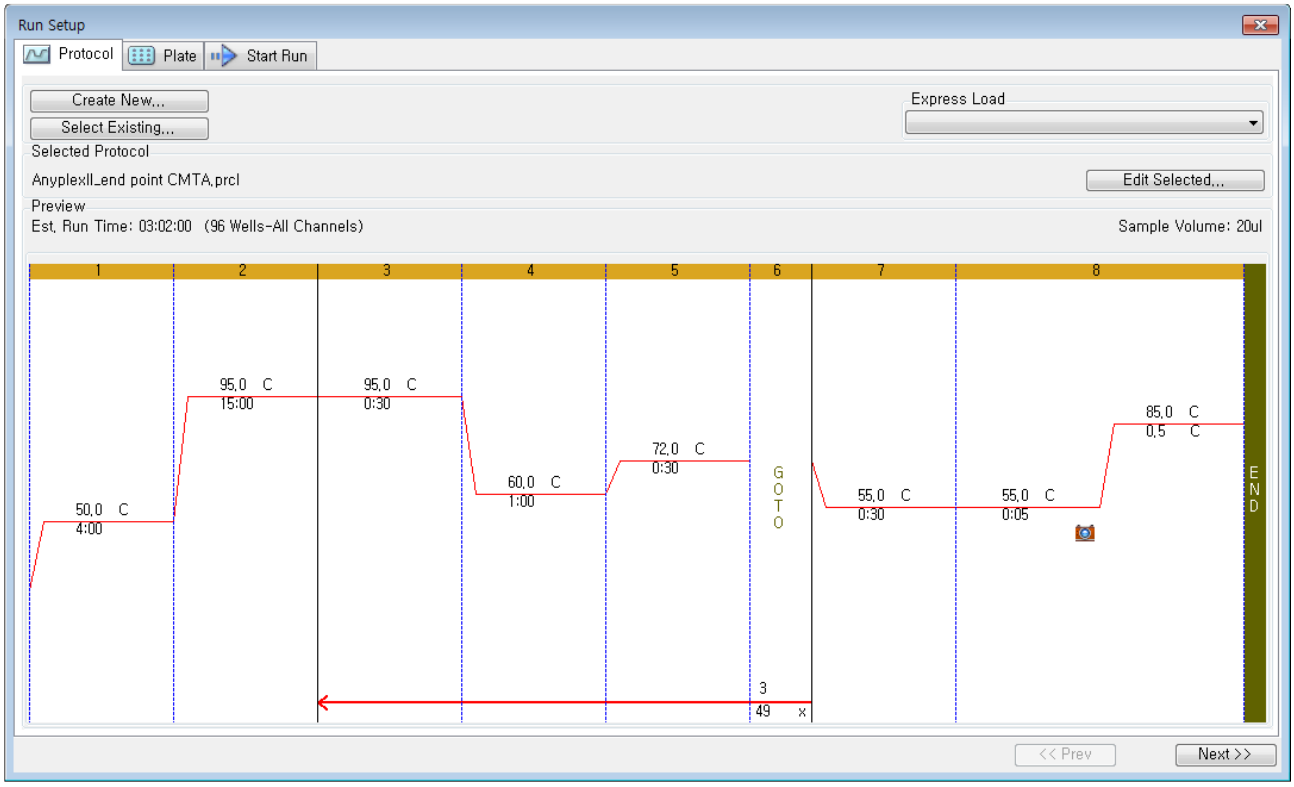
Obr. 3. **Protocol Editor** (End point-CMTA)

3) Klikněte na okno **Sample Volume** a zadejte 20 µl.

4) Klikněte na tlačítko **OK,** otevře se okno **Experiment Setup**.



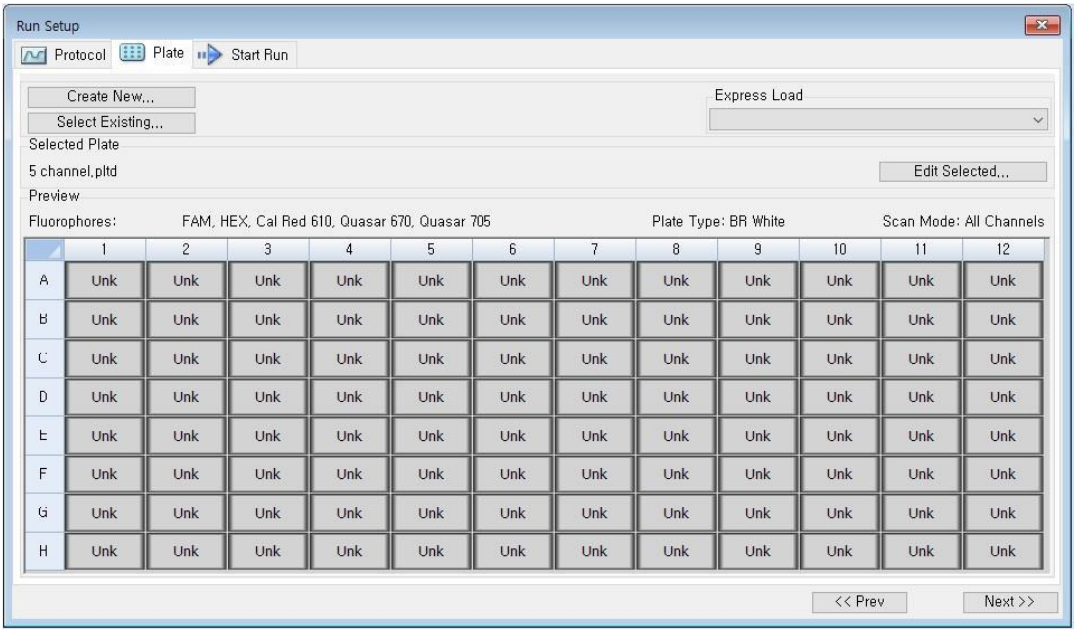
Obr. 4. **Experiment Setup Protocol** (Cyclic-CMTA)



Obr. 5. **Experiment Setup Protocol** (End point-CMTA)

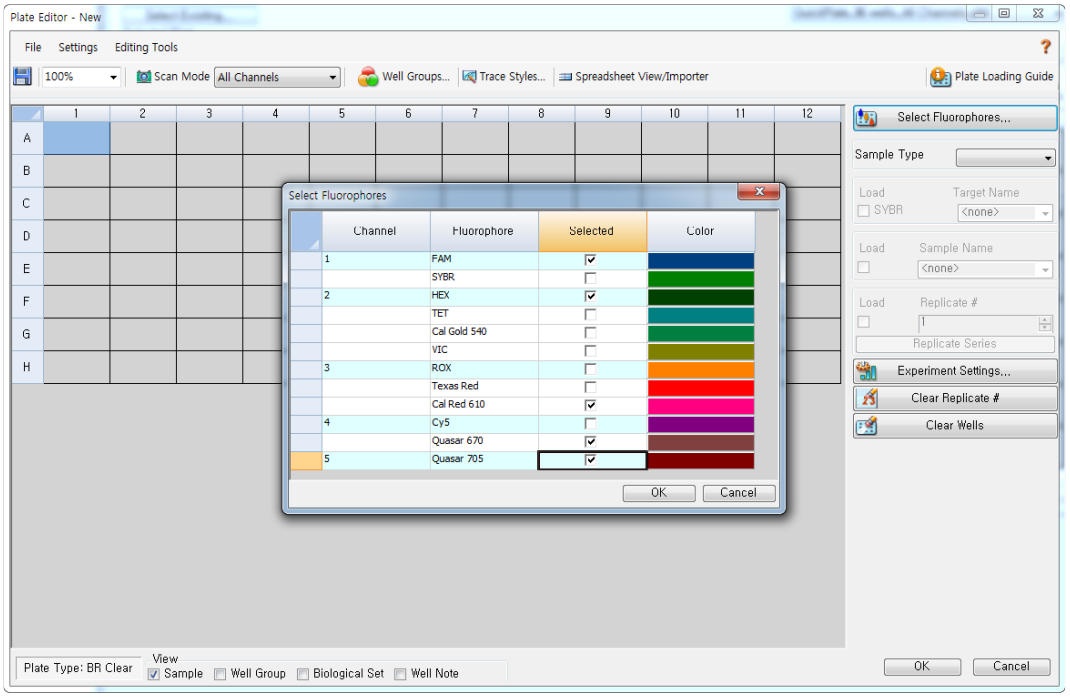
B. Nastavení Plate

1) V okně **Experiment Setup Plate** klikněte na tlačítko **Create New.** Tím otevřete **Plate Editor,** kde můžete zadat nové parametry.



Obr. 6. **Plate Editor**. Zadejte nové parametry plata nebo načtěte již uložené.

2) Klikněte na tlačítko **Select Fluorophores**, v zobrazeném okně vyberte kanály, které budou při měření použity (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610, Quasar 670** a **Quasar 705**).

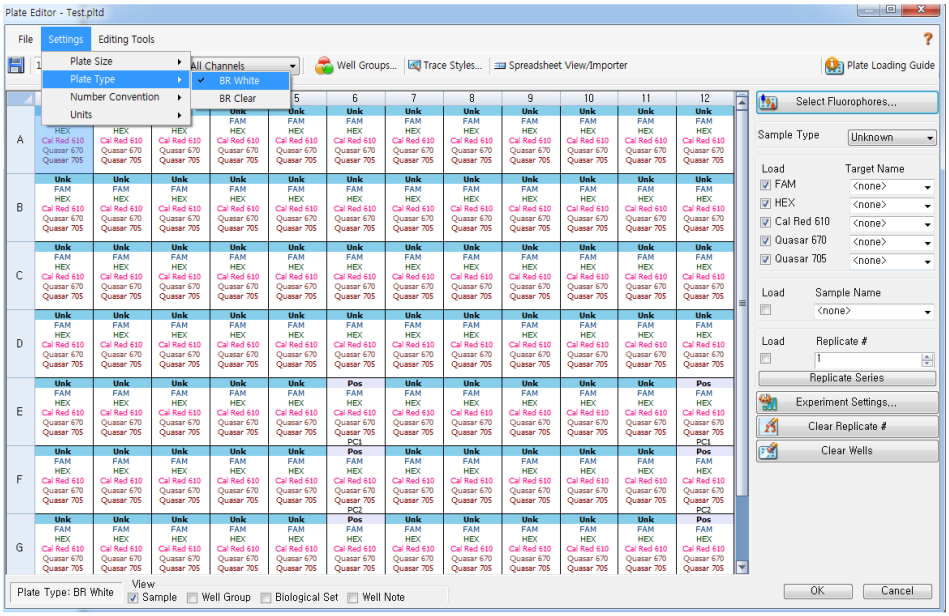


Obr. 7. **Select Fluorophores**(**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610, Quasar 670** a **Quasar 705**).

3) Vyberte jamku a následně v roletovém menu **Sample Type** vyberte typ vzorku v jamce.
   - **Unknown**: klinické vzorky
   - **Negative Control** (negativní kontrola)
   - **Positive Control** (pozitivní kontrola)

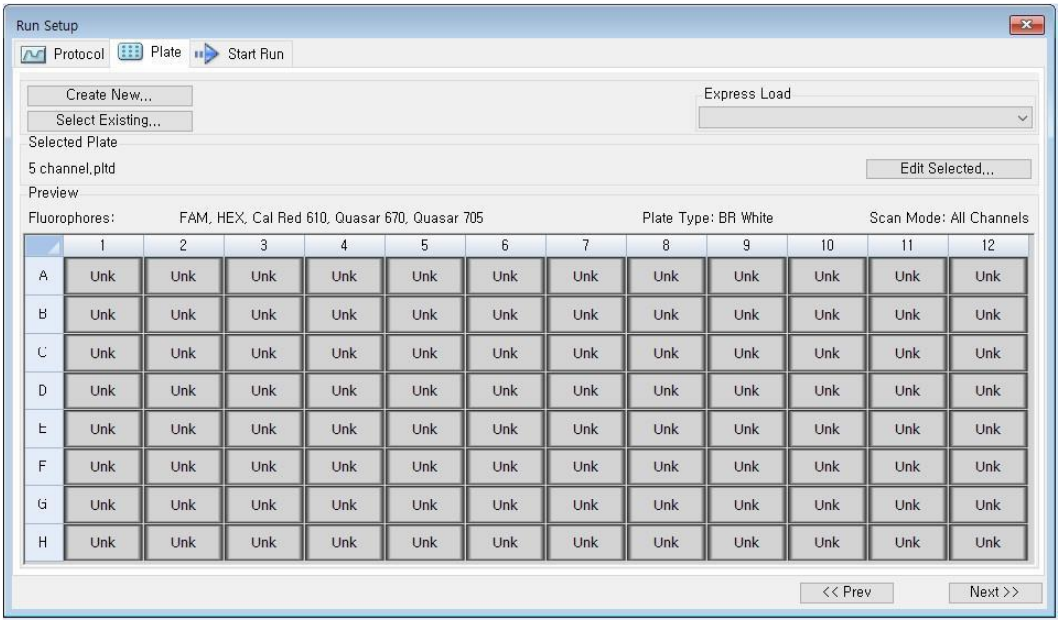
---

4) Kliknutím na příslušná zaškrtávací okénka (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610, Quasar 670** a **Quasar 705**) vyberte měřící kanály pro zvolené jamky.
5) Zadejte **Sample Name** a **PC(PC1, PC2** a **PC3)**, poté stiskněte tlačítko Enter.
6) Ve volbě **Settings** hlavního menu **Plate Editoru** zvolte **Plate Size(96 Wells)** a **Plate Type (BR White)**.



Obr. 8. **Plate Setup**.

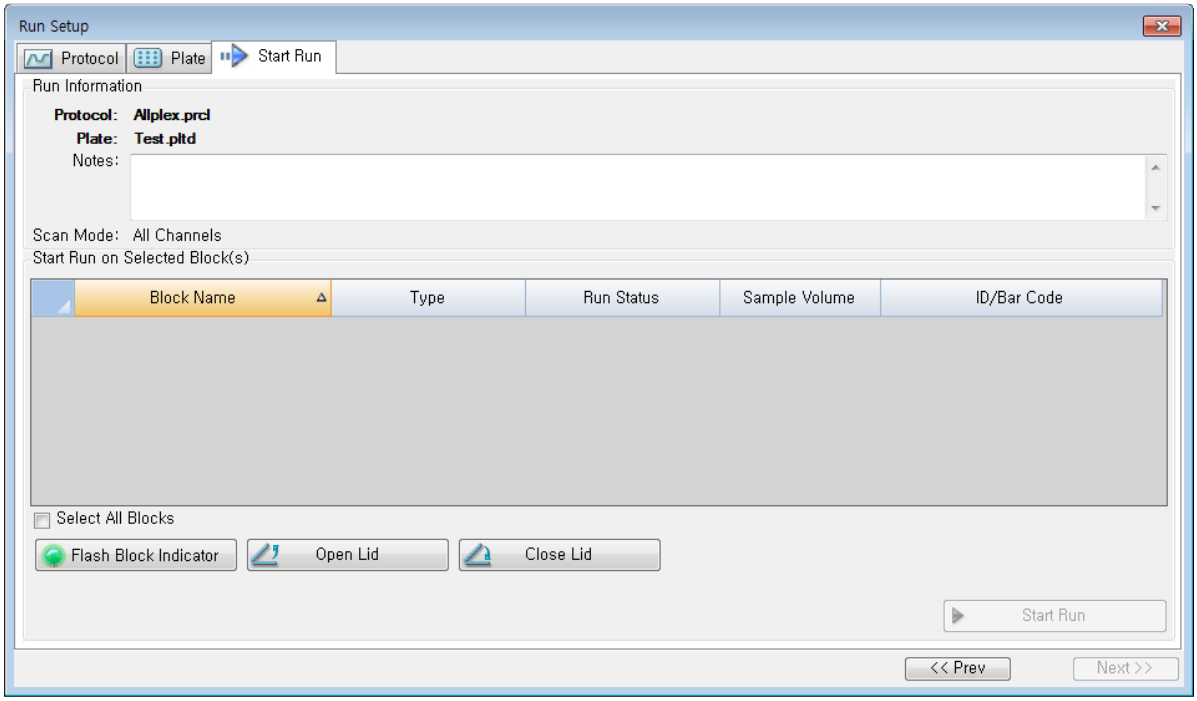
7) Klikněte na tlačítko **OK** a soubor s údaji nastavení nového plata uložte.
8) Poté bude zobrazeno okno **Experiment Setup**.
9) Klikněte **Next** pro přechod na **Start Run menu**



Obr. 9. **Run Setup: Plate**.

C. Start Run

1) V okně **Experiment Setup Start Run** klikněte na tlačítko **Close Lid**, dojde k zavření víka.



Obr. 10. **Close Lid.**

2) Klikněte na tlačítko **Start Run**.
3) Soubor měření uložte buď ve složce My documents nebo v jiné, k tomu určené složce.
   Zadejte název souboru a stiskněte tlačítko **SAVE**, tím dojde ke spuštění přístroje.

2.2. Analýza dat

A. Vytvoření složky určené k uložení dat

A-1. Cyclic-CMTA

• Použití funkce 'Export All Data Sheet to excel' function (viz str. 44)

3) Za účelem uložení dat ze souboru výsledků pro každý bod tání vytvořte tři složky.

4) Název složky pro data prvního bodu tání je "1", pro data druhého bodu tání "2" a pro data třetího bodu tání "3".

• Použití funkce 'Seegene Export' (viz str. 47)

4) Pro uložení dat ze souboru výsledků pro bod tání vytvořte jednu složku.

5) Název složky zadejte dle Vaší volby.

6) Při využití funkce 'Seegene Export' jsou v rámci složky vytvořené uživatelem automaticky vytvořeny podsložky 1, 2 a 3, do kterých budou uložena data pro jednotlivé body tání.

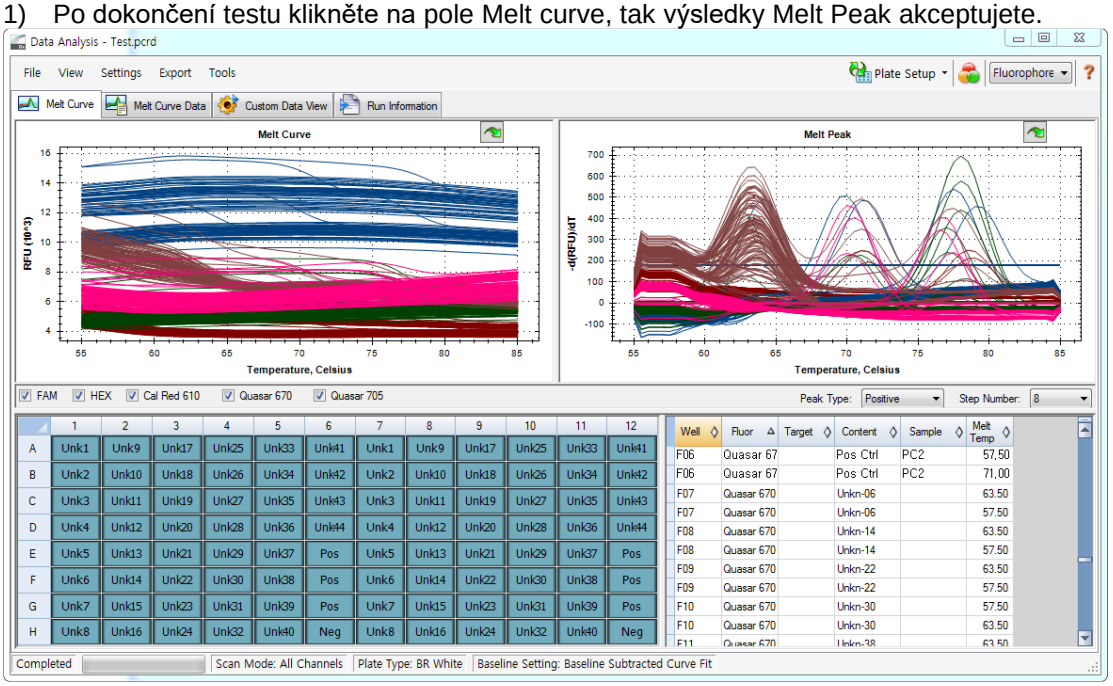
A-2. End point-CMTA

1) Pro uložení dat ze souboru výsledků pro bod tání vytvořte jednu složku.
2) Název složky zadejte podle vlastní volby.

B. Přednastavní pro analýzu dat CFX96™

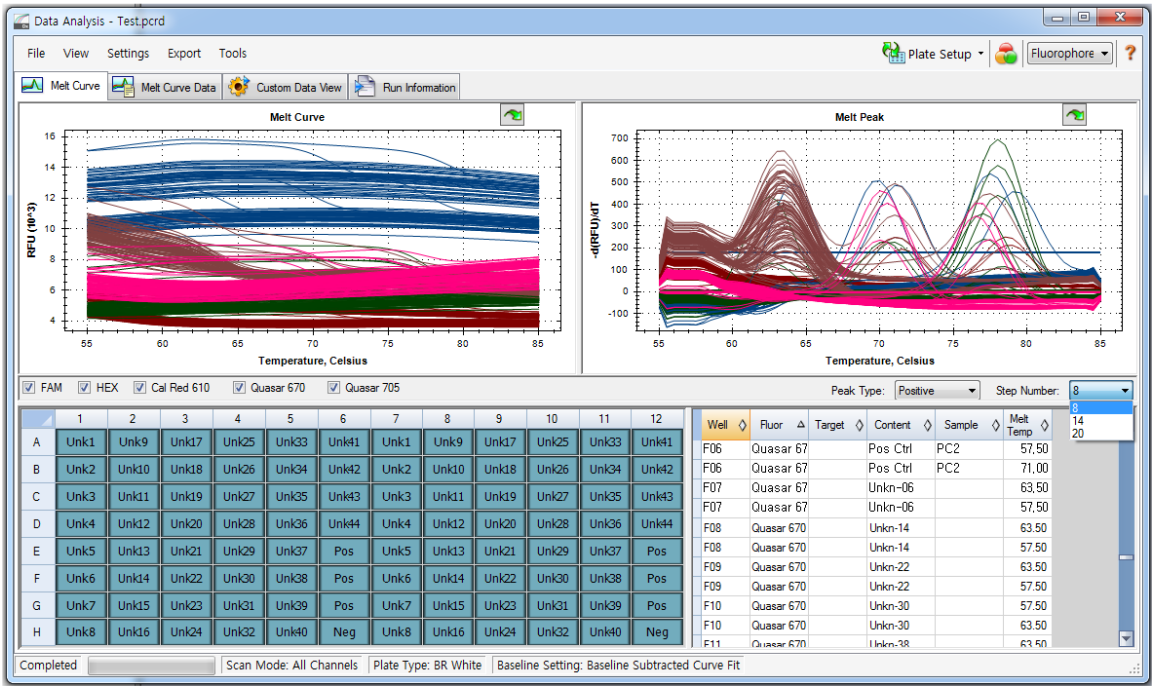
B-1. Použití funkce ‘Export All Data Sheet to excel’

1) Po dokončení testu klikněte na pole Melt curve, tak výsledky Melt Peak akceptujete.

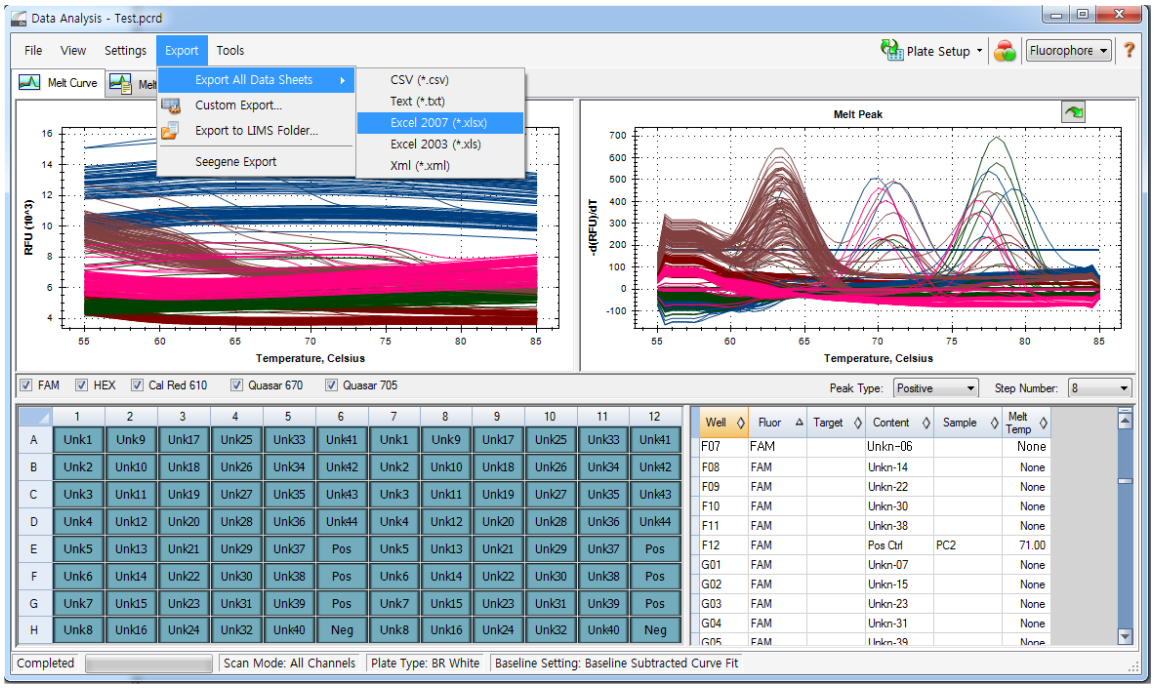


Obr. 11. **Výsledek Melting peak.**

2) Na nástrojové listě zvolte **Step number** "**8**" a vyberte "**Export All Data Sheets to Excel**".**Poznámka: V případě End point-CMTA zvolte rovnou "Export All Data Sheets to Excel".**



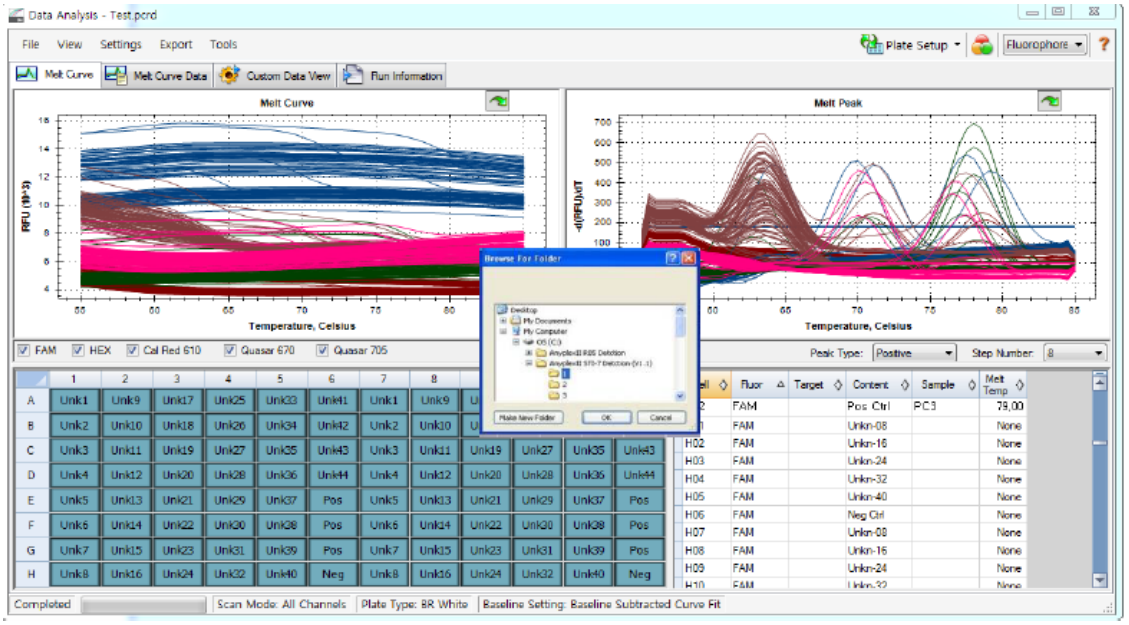
Obr. 12a. **Výsledek Melting peak**



Obr. 12b**. Export All Data sheets to excel.**

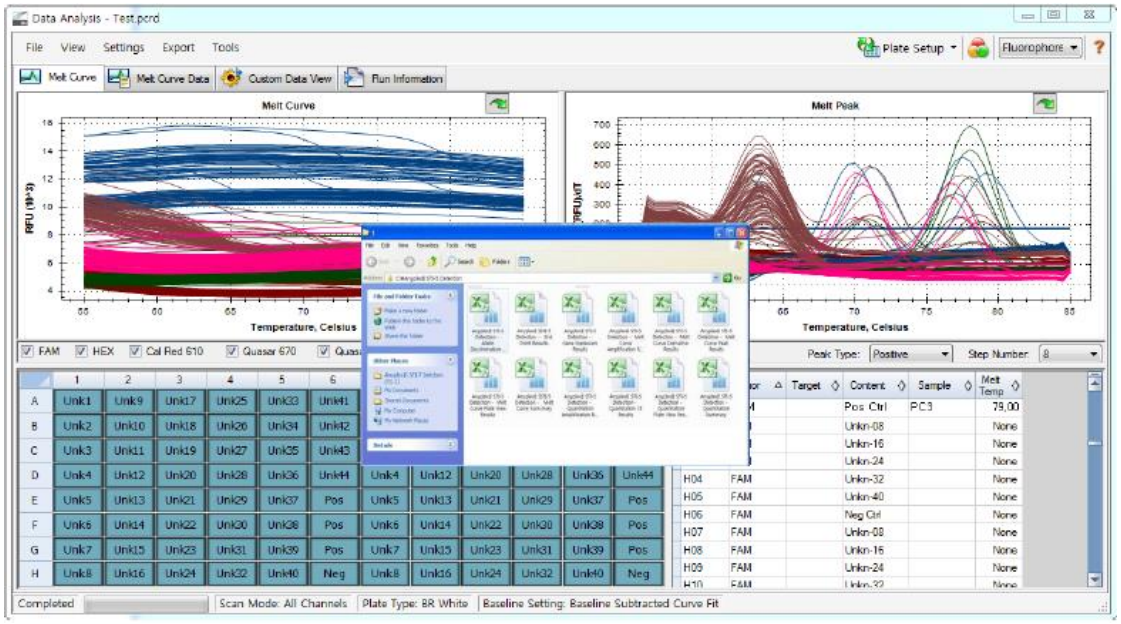
3) Po otevření nového okna uložte výsledek do **složky "1"**.

Poznámka: V případě End point-CMTA uložte výsledek do libovolné složky.



Obr. 13. **Export všech dat z tabulek analýzy dat do určené složky.**

4) Ujistěte se, že výsledek byl do složky uložen.



Obr. 14**. Exportované soubory výsledků.**

Poznámka: V případě End point-CMTA přeskočte kroky 5)~7) a pokračujte dalším krokem analýzy.

5) Vraťte se do kroku 2) a zvolte **Step number** "**14**". Opakujte kroky 3) a 4) a uložte datado **složky "2"**.

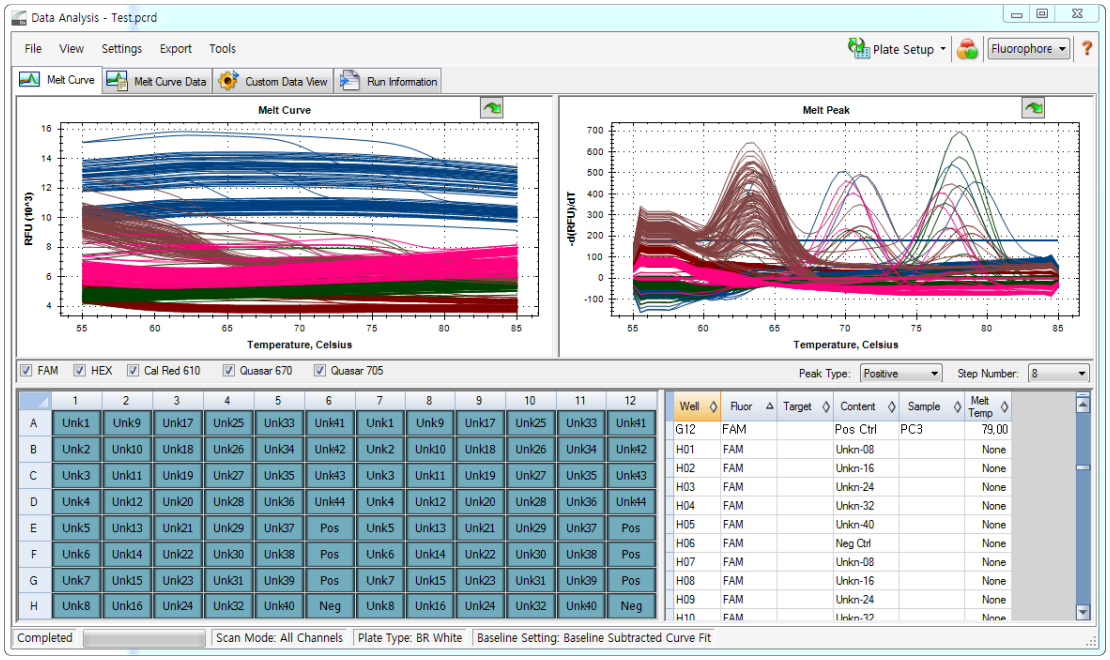
6) Vraťte se do kroku 2) a zvolte **Step number "20"**.

7) Opakujte kroky 3) a 4), data uložte do **složky "3"**. Data z jednotlivých kroků (Step number) jsou uložena následovně.

Step number	Složka
8	1
14	2
20	3

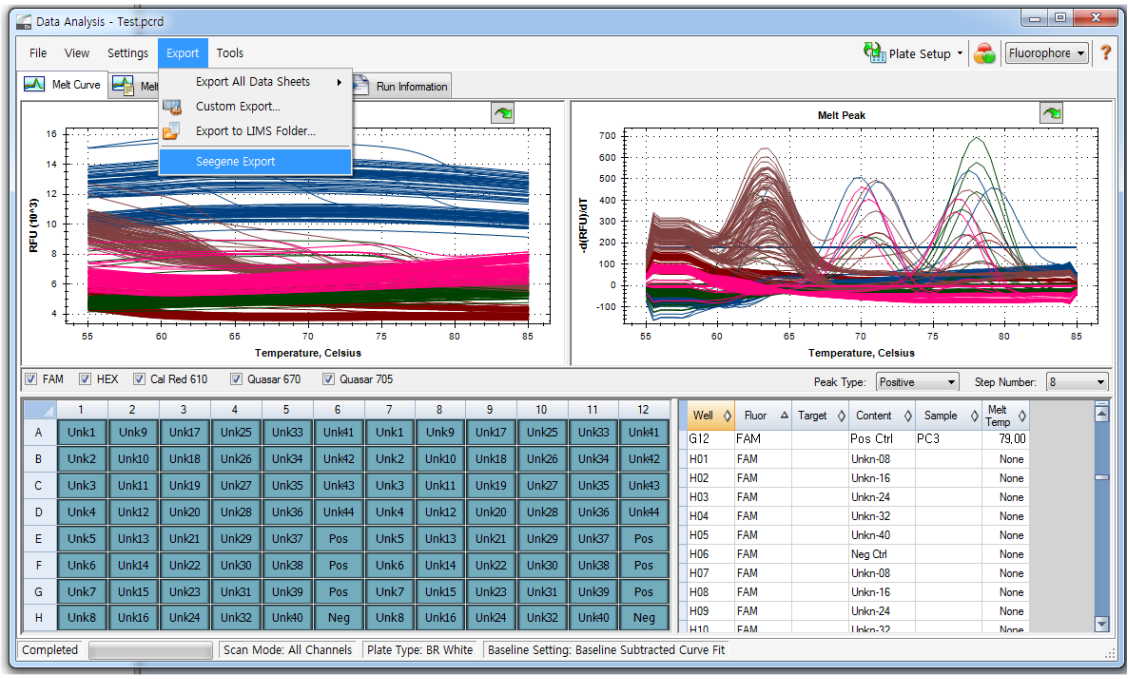
B-2. Použití funkce ‘Seegene Export’

3) Po dokončení testu klikněte na pole Melt curve, tím výsledky Melt peak akceptujete.



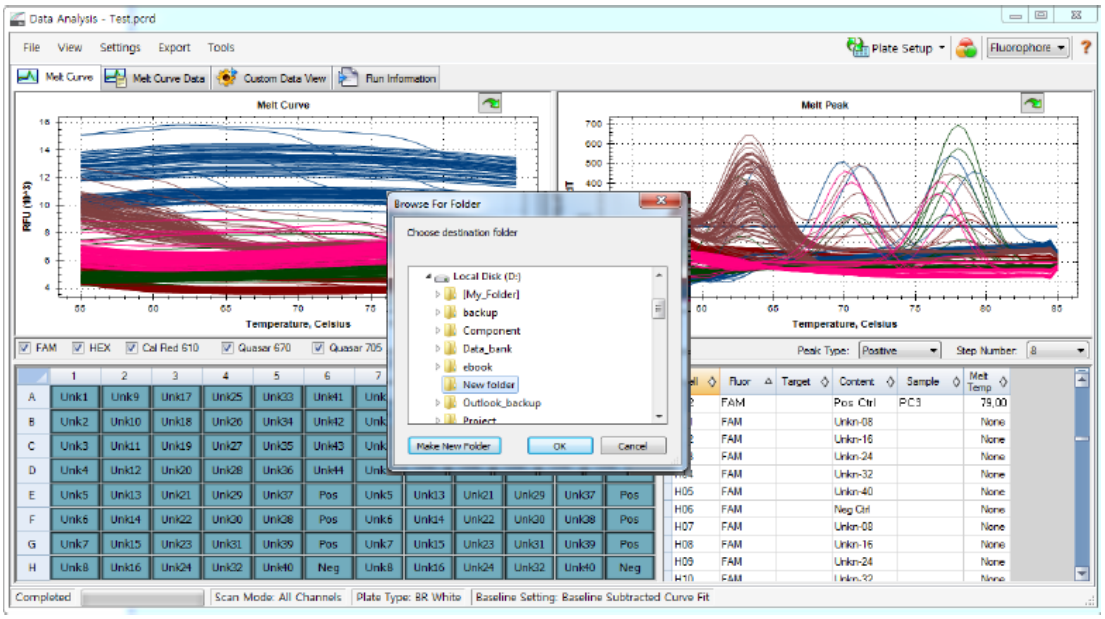
Obr. 15**. Výsledek Melt peak.**

4) V menu Tools zvolte **Seegene Export**.



Obr. 16**. Seegene Export.**

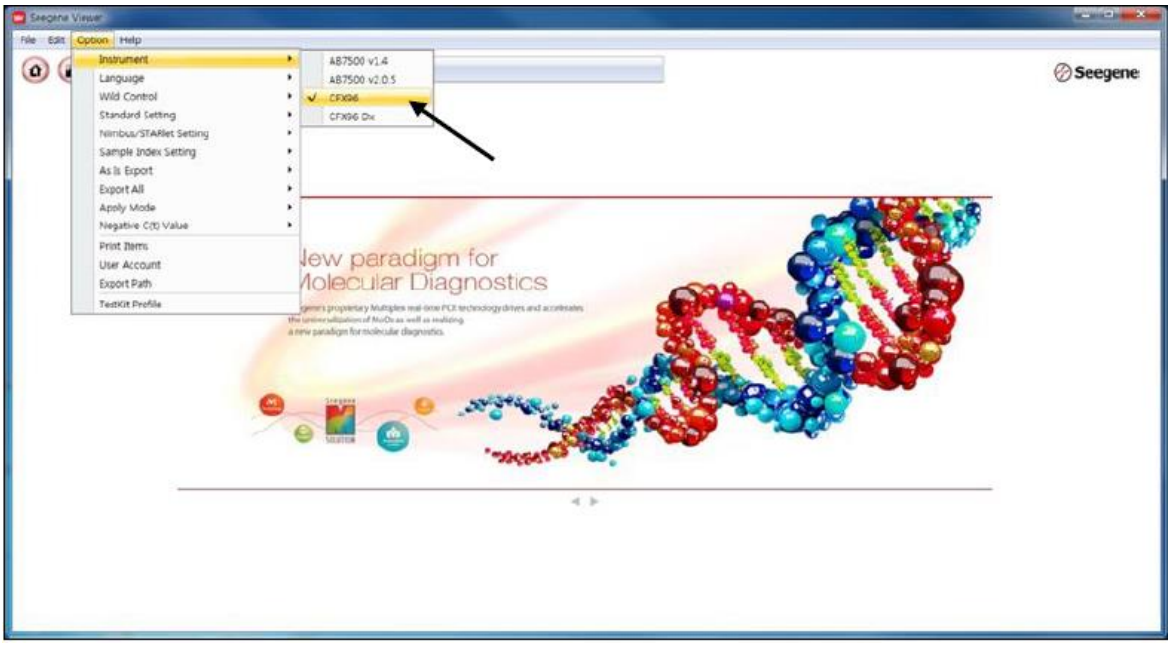
3) Vyberte složku, do které budou data uložena, a klikněte na tlačítko OK.



Obr. 17**. Seegene Export dat z tabulek analýzy do určené složky.**

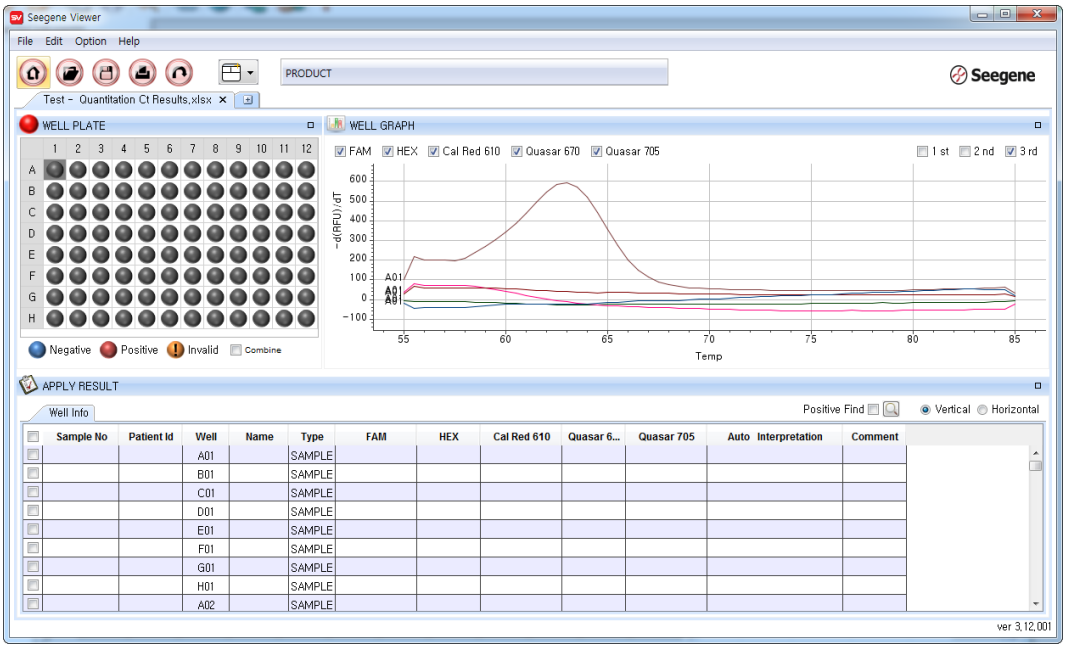
C. Nastavení pro analýzu dat v Seegene Viewer

2) Na obrazovce spusťte program Seegene Viewer, klikněte na tlačítko Option, a vyberte **CFX96** v záložce Instrument.



Obr. 18. **Seegene viewer**

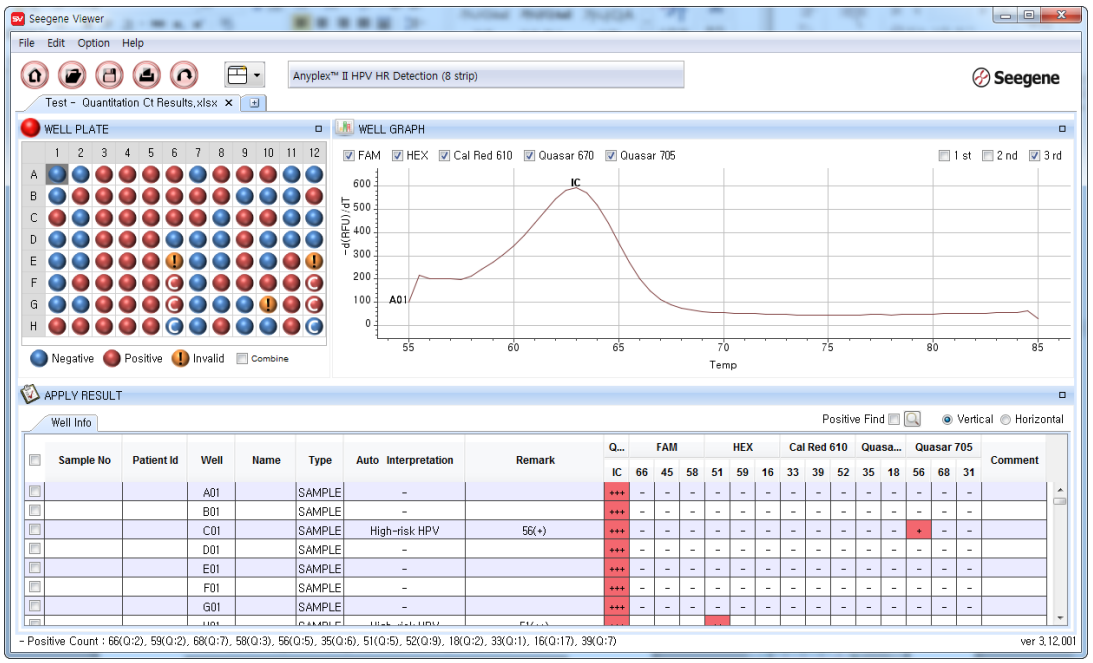
2) Po otevření souboru výsledků klikněte na PRODUCT a ze seznamu vyberte testovací soupravu.



Obr. 19. **Nastavení pro analýzu dat v Seegene Viewer.**

Poznámka: Současně s výběrem testovací soupravy zaškrtněte typ zkumavky (8-strip nebo 96 plate).

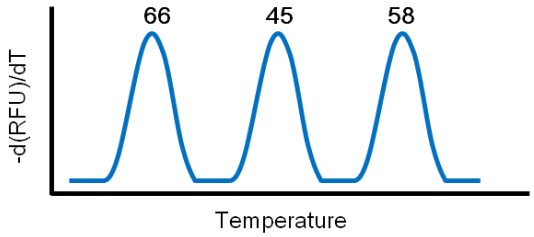
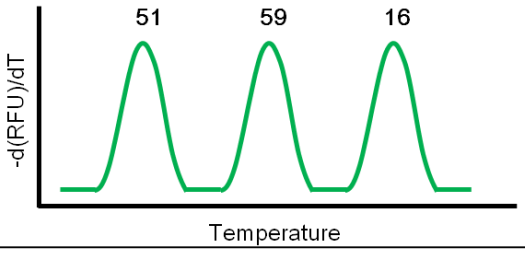
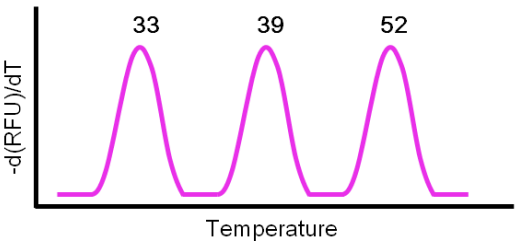
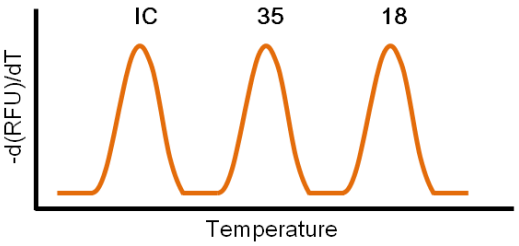
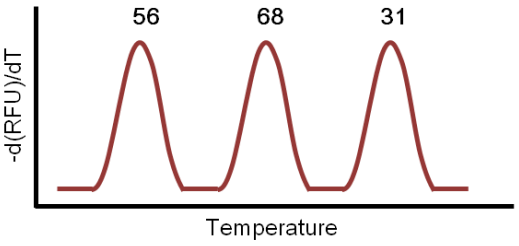
3) Zkontrolujte výsledky u jednotlivých jamek.



Obr. 20. **Výsledek testu CFX96™ na Seegene Viewer.**

VÝSLEDKY

1. Informace o analytu

Fluorophore	Anyplex™ II HPV HR Detection
FAM	
HEX	
Cal Red610	
Quasar670	
Quasar705	

2. Interpretace výsledků

A. Cyclic-CMTA

Výsledek HPV*	Výsledek IC*	Interpretace
+++ nebo ++ nebo +	+++ nebo ++	**Nukleová kyselina cíle detekována** - Identifikace cíle – typu HPV
+++ nebo ++ nebo +	+ nebo -	**Nukleová kyselina cíle detekována**** - Identifikace cíle – typu HPV - Mohou být přítomny další typy HPV, které nebylydetekovány.
-	+++ nebo ++	**Nukleová kyselina cíle nedetekována.**
-	+ nebo -	**Neplatný výsledek** - Slabý nebo negativní signál IC ukazuje na nevyhovující odběr vzorku, nesprávné zpracovánínebo přítomnost inhibitorů. - Použijte jinou alikvotní část původního vzorku a test opakujte od kroku izolace nukleové kyseliny.

Výsledek	Cyclic-CMTA (Cyclic Catcher Melting Temperature Analysis)		
	First CMTA point	Second CMTA point	Third CMTA point
+++	+	+	+
++	-	+	+
+	-	-	+
-	-	-	-

* Není detekován signál interní kontroly nebo jiné signály: viz část ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ.

** Intenzita signálu interní kontroly může být snížena nebo zcela chybět z důvodu vysokých titrů patogenů.

B. End point-CMTA

Výsledek HPV*	Výsledek IC*	Interpretace
+	+	**Nukleová kyselina cíle detekována** - Identifikace cíle – typu HPV
+	-	**Nukleová kyselina cíle detekována**** - Identifikace cíle – typu HPV - Mohou být přítomny další typy HPV, které nebylydetekovány.
-	+	**Nukleová kyselina cíle nedetekována**
-	-	**Neplatný výsledek** - Negativní IC signál ukazuje na nevyhovující odběr čizpracování vzorku nebo na přítomnost inhibitorů. - Použijte jinou alikvotní část původního vzorku a testopakujte od kroku izolace nukleové kyseliny.

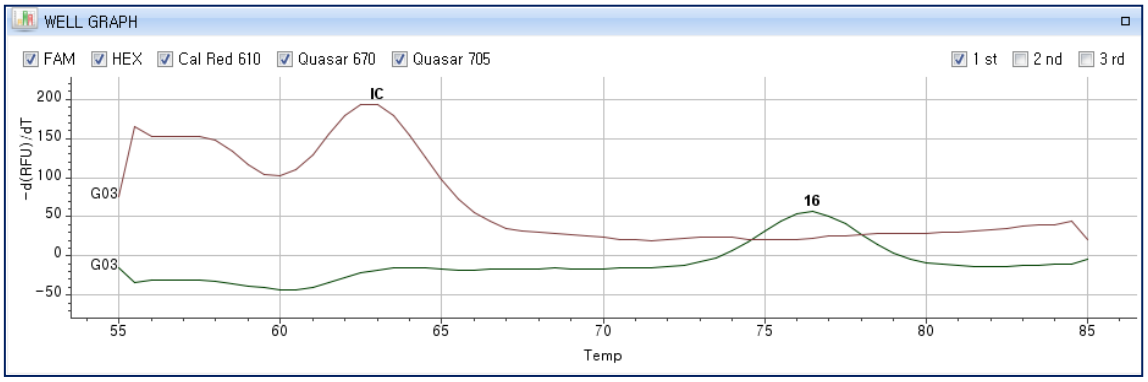
* Není detekován signál interní kontroly nebo jiné signály: viz část ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ.

** Intenzita signálu interní kontroly může být snížena nebo zcela chybět z důvodu vysokých titrů patogenů.

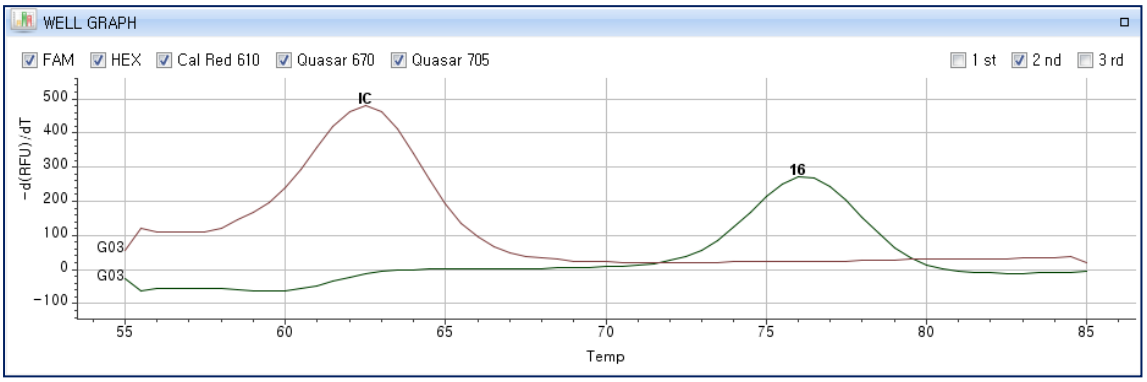
3. Testování klinických vzorků

A. Cyclic-CMTA

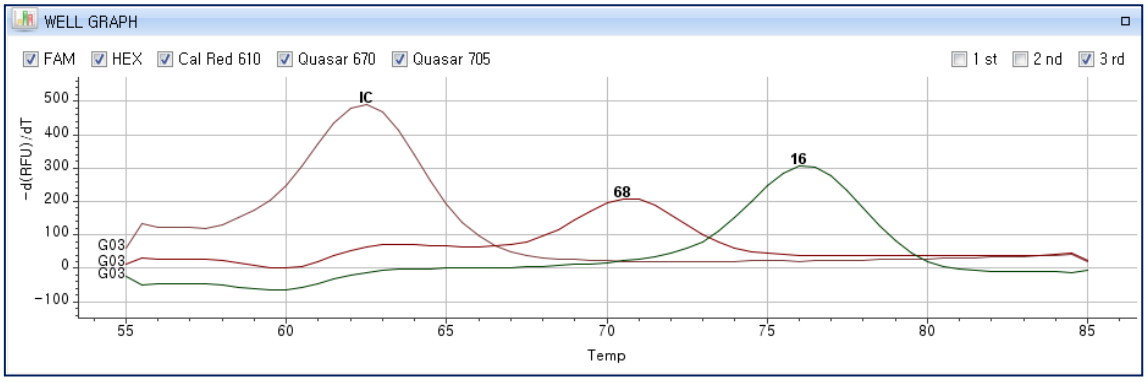
Melt Peak-1st (First CMTA point)



Melt Peak-2nd (Second CMTA point)

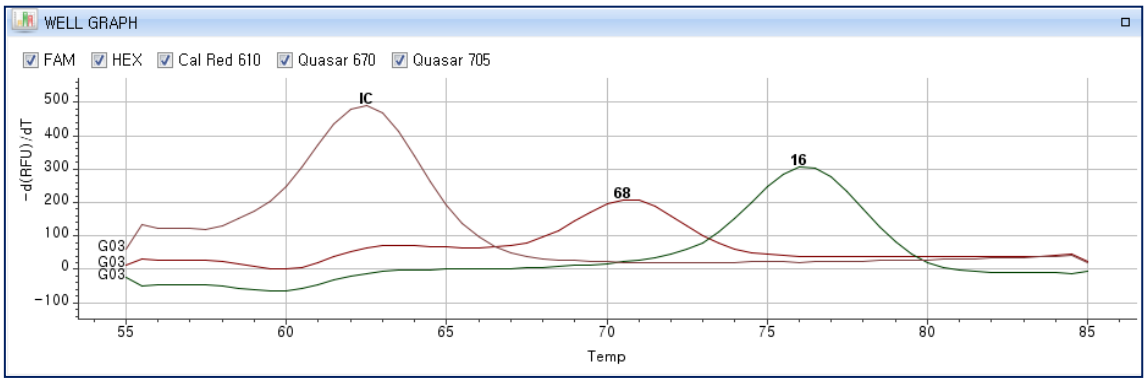


Melt Peak-3rd (Third CMTA point)



Autointerpretace	Poznámka	Quasar 670	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670		Quasar 705		
HPV s vysokým rizikem	16(+++), 68(+)	IC	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31
		+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	-

B. End point-CMTA



Autointerpretace	Poznámka	Quasar 670	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670		Quasar 705		
HPV s vysokým rizikem	16, 68	IC	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31
		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Anyplex™ II HPV HR Detection		
POZOROVÁNÍ	**PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY**	**ŘEŠENÍ**
Není pozorován signál interní kontroly nebo není pozorován některý z dalších signálů	Fluorofory pro analýzu dat nejsou ve shodě s protokolem	Zvolte správné fluorofory pro analýzu dat.
	Nesprávný PCR cyklus nebo teplota přístroje	Zkontrolujte podmínky PCR a je-li třeba, měření zopakuje se správným nastavením.
	Ponechání reagencií příliš dlouhou dobu při pokojové teplotě nebo jejich nesprávné skladování	Zkontrolujte podmínky skladování reagencií (viz str. 9) a datum exspirace (na štítku soupravy), v případě potřeby použijte novou soupravu.
	Nesprávné nastavení přístroje	Měření zopakuje se správným nastavením.
	Chyba při izolaci nukleové kyseliny	Ujistěte se, že používáte doporučenou metodu izolace nukleové kyseliny.
	Nesprávný postup při odběru vzorku	Pokud není pozorován signál cíle ani signál IC, nebyl vzorek správně odebrán. Odeberte vzorek znovu, dbejte na správný postup odběru.
Není pozorován signál interní kontroly	Vysoká koncentrace nukleové kyseliny patogenu	Je-li pozorován signál cíle, je výsledek detekce patogenu „detekováno“ i v případě, že není pozorován signál IC. Chcete-li provést kontrolu IC, nařeďte vzorek v PBS (10-100x) a opakujte od kroku izolace nukleové kyseliny s naředěným vzorkem.
	Přítomnost inhibitorů PCR	Nařeďte vzorek v PBS (10-100x) a opakujte od kroku izolace nukleové kyseliny.
Falešná pozitivita nebo pozorované signály negativní kontroly	Křížová kontaminace	Dekontaminujte všechny povrchy a nástroje chlornanem sodným a etanolem. Při izolaci nukleové kyseliny používejte pouze špičky s filtrem. Mezi jednotlivými zkumavkami špičky měňte. Opakujte izolaci nukleové kyseliny s novou sadou reagencií.
	Křížová kontaminace mezi PC 1, 2 a 3	Začněte znovu od kroku izolace nukleové kyseliny nebo začněte znovu od kroku RT PCR.

Anyplex™ II HPV HR Detection		
POZOROVÁNÍ	**PRAVDĚPODOBNÉ PŘÍČINY**	**ŘEŠENÍ**
Falešná negativita nebo není pozorován žádný signál pozitivní kontroly	Chyba při odběru vzorku	Znovu proveďte odběr vzorku.
	Nesprávné uchovávání vzorku	Znovu proveďte odběr vzorku a celý proces opakujte. Ujistěte se, že vzorek byl uchováván za doporučených podmínek.
	Chyba při izolaci nukleové kyseliny	Znovu proveďte izolaci nukleové kyseliny.
	Chyba při přidání nukleové kyseliny do příslušných PCR zkumavek	Zkontrolujte čísla vzorků u zkumavek obsahujících nukleové kyseliny a ujistěte se, že nukleová kyselina je přidávána vždy do správné PCR zkumavky.
	Přítomnost inhibitoru	Nařeďte vzorek v PBS (10-100x), proces opakujte s naředěným vzorkem od kroku izolace nukleové kyseliny.
	Fluorofory pro analýzu dat nejsou ve shodě s protokolem	Vyberte správné fluorofory pro analýzu dat.
	Nesprávné nastavení přístroje	Zopakujte PCR se správným nastavením.
	Nesprávná směs PCR	Zkontrolujte, zda byly přidány všechny komponenty. (V případě, že používáte předpřipravenou směs, může dojít ke snížení citlivosti). Každou reagencii před použitím ponechte zcela roztát, krátce vortexujte a krátce stočte.
	Ponechání reagencií dlouhou dobu při pokojové teplotě nebo jejich nesprávné skladování	Zkontrolujte podmínky skladování a datum exspirace reagencií (viz štítek soupravy), v případě potřeby použijte novou soupravu.

ÚČINNOST

1. Specificita

Velká specificita soupravy Anyplex™ II HPV HR Detection je dána primery specificky navrženými pro konkrétní cíle a reakční podmínky. Souprava Anyplex™ II HPV HR Detection byla testována z hlediska křížové reaktivity 80 různých patogenů: výsledkem testu byla PCR amplifikace pouze cílů.

Organismus	Č. kmene	Výsledek testu†
Acinetobacter baumannii	ATCC 15150	-
Bacteroides fragilis	ATCC 25285D	-
Chlamydia trachomatis	ATCC VR-577	-
Corynebacterium genitalium	ATCC 33030	-
Enterobacter cloacae	KCTC 13047	-
Enterococcus faecalis	ATCC 700802D-5	-
Escherichia coli	ATCC 15489	-
Fusobacterium nucleatum	ATCC 25586D-5	-
Gardnerella vaginalis	ATCC 14019	-
Haemophilus ducreyi	ATCC 33940	-
Klebsiella pneumoniae	ATCC 13883	-
Lactobacillus acidophilus	ATCC 4357D-5	-
Lactobacillus crispatus	ATCC 33820	-
Lactobacillus gasseri	ATCC 33323	-
Lactobacillus iners	ATCC 55195	-
Lactobacillus jensenii	ATCC 25258	-
Mobiluncus curtisii	ATCC 35241	-
Mobiluncus mulieris	ATCC 35243	-
Neisseria gonorrhoeae	ATCC 700825D	-
Neisseria meningitidis	ATCC 700532D	-
Neisseria sicca	ATCC 29256	-
Peptostreptococcus anaerobius	ATCC 49031D-5	-
Propionibacterium acnes	ATCC 6919	-
Proteus mirabilis	ATCC 12453	-

Organismus	Č. kmene	Výsledek testu†

Proteus vulgaris	ATCC 6059	-
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15522	-
Pseudomonas fluorescens	KCTC 49642	-
Serratia marcescens	ATCC 27137D-5	-
Staphylococcus aureus subsp.*aureus*	ATCC 29213	-
Streptococcus agalactiae	ATCC BAA-611D	-
Streptococcus mitis	ATCC 49456D-5	-
Streptococcus pyogenes	ATCC 700294D-5	-
Trichomonas vaginalis	ATCC 30001D	-
Ureaplasma urealyticum	ATCC 33695	-
Candida albicans	ATCC 14053	-
Cytomegalovirus	ATCC VR-807	-
Epstein-Barr virus	ATCC VR-602	-
Herpes simplex virus 1	ATCC VR-260	-
Herpes simplex virus 2	ATCC VR-734	-
Lidský adenovirus 1	ATCC VR-1	-
Lidský adenovirus 3	ATCC VR-3	-
Lidský adenovirus 8	ATCC VR-1368	-
Lidský adenovirus 18	ATCC VR-1095	-
Lidský adenovirus 23	ATCC VR-1101	-
Lidský adenovirus 40	ATCC VR-931	-
HPV1	ATCC 45021	-
HPV2	ATCC 45022	-
HPV6	ATCC 45150D	-
HPV11	ATCC 45151D	-
HPV26	korejský izolát	-
HPV34	korejský izolát	-
HPV40	korejský izolát	-
HPV42	korejský izolát	-
HPV43	ATCC 40339	-
HPV44	korejský izolát	-

Organismus	Č. kmene	Výsledek testu†
HPV53	korejský izolát	-
HPV54	korejský izolát	-

HPV61	korejský izolát	-
HPV62	korejský izolát	-
HPV69	korejský izolát	-
HPV70	korejský izolát	-
HPV71	korejský izolát	-
HPV72	korejský izolát	-
HPV73	korejský izolát	-
HPV81	korejský izolát	-
HPV82	korejský izolát	-
HPV83	korejský izolát	-
HPV84	korejský izolát	-
HPV102	korejský izolát	-
HPV16	ATCC 45113D	+ (HPV16)
HPV18	ATCC 45152D	+ (HPV18)
HPV31	ATCC 65446	+ (HPV31)
HPV33	korejský izolát	+ (HPV33)
HPV35	ATCC 40330	+ (HPV35)
HPV39	korejský izolát	+ (HPV39)
HPV45	korejský izolát	+ (HPV45)
HPV51	korejský izolát	+ (HPV51)
HPV52	korejský izolát	+ (HPV52)
HPV56	ATCC 40549	+ (HPV56)
HPV58	korejský izolát	+ (HPV58)
HPV59	korejský izolát	+ (HPV59)
HPV66	korejský izolát	+ (HPV66)
HPV68	korejský izolát	+ (HPV68)
SiHa Cell	KCLB 30035	+ (HPV16)
HeLa Cell	KCLB 10002	+ (HPV18)

†Z důvodu potvrzení platnosti výsledků byl test opakován třikrát.

※ATCC: American Type Culture Collection

KCTC: Korean Collection for Type Culture

KCLB: Korean Cell Line Bank

2. Citlivost

Ke stanovení citlivosti soupravy Anyplex™ II HPV HR Detection byla použita standardní metoda ředění plazmidové DNA v rozsahu 10^6 až 10^0 kopií/reakci a analýza pomocí soupravy AnyplexTM II HPV HR Detection. Detekční limit citlivosti je 50 kopií/reakci.

3. Reprodukovatelnost

Test reprodukovatelnosti byl realizován ve třech různých časech v průběhu 10 dnů třemi různými osobami. Ve všech případech byly získány shodné výsledky, reprodukovatelnost testu tak byla potvrzena.

ODKAZY

1 Burd EM. [Human papillomavirus and cervical cancer.] Clin Microbiol Rev. (2003) 16(1): 1-17

2 Castle PE. [The potential utility of HPV genotyping in screening and clinical management.] J Natl Compr Canc Netw. (2008) 6(1): 83-95 Review

3 Chris JM, Peter JS, Philip EC. [Clinical utility of HPV genotyping.] Gynecol Oncol. (2006) 103: 12-17

4 Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Res. (2007) 35(6): e40

5 Chun JY. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin (2012) 1: 1-4

6 Giorgi Rossi P, Bisanzi S, Paganini I, Di Iasi A, Angeloni C, Scalisi A, Macis R, Pini MT, Chini F, Carozzi FM. [HPV Prevalence Italian Working Group Prevalence of HPV high and low risk types in cervical samples from the Italian general population: a population based study.] BMC Infect Dis. (2010) 20(10): 214

7 Hwang IT. [Cyclic-CMTA: An Innovative Concept in Multiplex Quantification.] Seegene Bulletin (2012) 1: 11-15

8 Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. [Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases.] Cancer. (2001) 93(1): 8-15

9 Lee DH. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin (2012) 1: 5-10

10 Li J, Mei J, Wang X, Hu L, Lin Y, Yang P. [Human papillomavirus type-specific prevalence in women with cervical intraepithelial neoplasm in Western China.] J Clin Microbiol. (2012) 50(3): 1079-1081

11 Novaes LC, Novaes MR, Simes-Barbosa A. [Diagnosis of human papillomatosis by polymerase chain reaction in cases of divergence between results of hybrid capture and papanicolaou cytology.] Braz J infect Dis. (2006) 10(3):169-172

12 Son S, Noh HT, An S. [Human papillomavirus status in cervical scrapes and biopsy specimens using the HPV genotyping DNA microarray.] Int J Gynaecol Obstet. (2006) 93(3): 258-259

13 Sun ZR, Ji YH, Zhou WQ, Zhang SL, Jiang WG, Ruan Q. [Characteristics of HPV prevalence among women in Liaoning province, China.] Int J Gynaecol Obstet. (2010) 109(2): 105-109

14 Wallace J, Woda BA, Pihan G. [Facile, Comprehensive High-Throughput Genotyping of Human Genital Papillomaviruses Using Spectrally Addressable Liquid Bead Microarrays.] J Mol Diagn. (2005) 7(1): 72-80

15 Ursu RG, Onofriescu M, Nemescu D, Iancu LS. [HPV prevalence and type distribution in women with or without cervical lesions in the Northeast region of Romania.] Virol J. (2011) 22(8): 558

VÝZNAM SYMBOLŮ

Význam symbolů použitých na štítku produktu a v návodu k použití.

Symbol	Význam
	Pro použití v In vitro diagnostice
	Použití pouze pro výzkumné účely
	Číslo šarže
	Katalogové číslo
	Datum exspirace
	Teplotní limit
	Výstraha
	Směs oligonukleotidů pro amplifikaci a detekci
	RNase-free Water
	Pozitivní kontrola
	Anyplex™ PCR Master Mix
	Výrobce
	Datum výroby
	Návod k použití
	Autorizovaný zástupce v ES
	Obsahuje dostatek reagencie pro „n“ testů

UDI	Unikátní identifikátor produktu
rxns	Reagenční barkód pro automatický izolační systém

INFORMACE PRO OBJEDNÁNÍ

Cat. No.	Product	Size
Anyplex™ II HPV Series		
HP7E00X	**Anyplex™ II HPV HR Detection**	**100 rxns**
HP10380Z	**Anyplex™ II HPV HR Detection**	**25 rxns**
HP7S00X	Anyplex™ II HPV28 Detection	100 rxns
HP10379Z	Anyplex™ II HPV28 Detection	25 rxns
Seeplex® HPV Series		
HP6401Y	Seeplex® HPV4A ACE Screening	50 rxns
Accessory products		
SG1701	Ribo_spin vRD(Viral RNA/DNA Extraction Kit)	50 preps
Automated extraction system		
65415-02	Microlab NIMBUS IVD	EA
173000-075	Microlab STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384T / 1box
EX00013C	STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit	384T / 1box
EX00003P	STARMag 96 UniPlate	96 T / 1box
EX00004T	STARMag 96 UniTube	96 T / 1box
EX00036P	STARMag™ S96H N kit	480T / 1box
EX00037P	STARMag™ S96H N kit	960T / 1box
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T / 1box
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T / 1box
EX00017P	STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	96T / 1box
EX00017T	STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	96T / 1box
6600532-01	Vial Cap Management System	EA
SG72100	AIOS	EA