

NÁVOD K POUŽITÍ

NeoPlex™ HPV HR

REF

NS03A

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagencie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



OBSAH

1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ	1
2. OBSAH SADY	1
3. KOMPATIBILNÍ PŘÍSTROJ	1
4. EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN	1
5. DALŠÍ POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A MATERIÁLY	1
6. SKLADOVÁNÍ A STABILITA SOUPRAVY	1
7. UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ	1
7. ZKUŠEBNÍ POSTUP	2
9. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTŮ	3
10. KONTROLA KVALITY	4
11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	4
12. VÝKONNOSTNÍ CHARAKTERISTIKY	4
14. SYMBOLY	6
13. OMEZENÍ TESTU.....	6
Dodatek. Obsluha přístroje PCR	7

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagensie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



1. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

NeoPlex™ HPV HR je kvalitativní *in vitro* test pro současnou detekci a potvrzení 14 genotypů HPV (lidský papilomavirus) způsobujících rakovinu děložního čípku (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) z tekutého cytologického vzorku. Tato testovací souprava je určena pro odborné použití.

2. OBSAH SOUPRAVY

Složky "NeoPlex™ HPV HR" jsou uvedeny v tabulce níže.

Obsah	Objem(96T)	Podmínky skladování	Doba použitelnosti
4X NeoPlex PCR Master Mix	500 µl x 1 lahvička		12 měsíců
HPV HR PPM	500 µl x 1 lahvička		(Před otevřením)
HPV HR Positive Control(PC)	100 µl x 1 lahvička	Horní hranice -20°C	
HPV HR Internal Control (IC)	1 ml x 1 lahvička		6 měsíců
DW(DNase-free Water)	1 ml x 1 lahvička		(po otevření)

3. KOMPATIBILNÍ PŘÍSTROJE

- CFX96TM Dx System (Bio-Rad, Cat No.1845097-IVD)

4. EXTRAKCE NUKLEOVÉ KYSELINY

Výrobce	Přístroj (Kat č.)	Extrakční souprava (Kat č.)
Qiagen	N/A (Manual)	QIAamp DSP DNA Blood Minikit (61104)
Roche Life Science	Roche MagNA Pure 96 system (06 541 089 001)	DNA and Viral NA Small Volume Kit (06543588001)
Hanwool TPC	NC-15 PLUS (HWTD-01-48)	AlphaPrep™Viral DNA/RNA Extraction Kit (VDR-B096V)

5. DALŠÍ POTŘEBNÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL

- 0,2 ml 8 zkumavek PCR Strips bez uzávěru, nízký profil, bílá barva (Bio-Rad, Inc., kat. č. TLS0851)
- Optické ploché stripy s 8 uzávěry pro zkumavky PCR (Bio-Rad, Inc., kat. č. TCS0803)
- Sada pipet, aerosolové bariérové špičky P2/P10, P20, P200 a P1000.
- Mikrocentrifuga
- Vortex - mixer
- Jednorázové bezprašné rukavice



Používejte pouze víčka PCR destiček se stripy. Nepoužívejte těsnicí fólii na PCR destičky.

6. SKLADOVÁNÍ SOUPRAVY

- Soupravu skladujte při teplotě pod -20 °C.
- Reagensie soupravy jsou v neotevřeném stavu stabilní do data expirace uvedeného na štítku.
- Skladovatelnost soupravy je dvanáct (12) měsíců.
- Reagensie použijte do šesti (6) měsíců po otevření.

7. VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

1. Tento prostředek je určen pouze pro použití *in vitro*. Nepoužívejte k jiným účelům.
2. Při manipulaci se soupravou NeoPlex™ HPV HR a/nebo vzorky používejte osobní ochranné pomůcky, například rukavice a laboratorní pláště.
3. Při manipulaci se soupravou NeoPlex™ HPV HR a/nebo vzorky nekuřte, nepijte ani nejezte.
4. Při manipulaci se vzorky buďte opatrní, abyste zabránili infekci uživatele a/nebo nepřímému kontaktu s osobou. Vzorky obsahují riziko infekcí a neznámých onemocnění.
5. Nepoužívejte reagensie z různých šarží nebo z různých zkumavek stejné šarže.
6. Pokud výrobek často nekontrolujete, uchovávejte soupravu po určitou dobu v chladničce. Nezmrazujte/rozmrazujte více než čtyřikrát. Opakované zmrazení/rozmrazení produktu může mít za následek falešně negativní a falešně pozitivní výsledky.
7. Při extrakci nukleové kyseliny, amplifikaci produktu PCR, použít pozitivní kontroly (PC) dávejte pozor, abyste produkt nekontaminovali.
8. Doporučuje se používat filtrační špičky, aby se zabránilo kontaminaci produktu.
9. Doporučuje se vzorek nebo pozitivní kontrolu(PC) obsaženou v produktu zmrazit a skladovat odděleně od mrazničky, ve které je uložen produkt.
10. Používejte sterilizovaný spotřební laboratorní materiál. Nepoužívejte je opakovaně.
11. Přidejte extrahovaný vzorek nukleové kyseliny a pozitivní kontrolu (PC, Positive Control) do reakčního roztoku v prostoru odděleném od prostoru pro přípravu reakčního roztoku PCR.
12. Před použitím si pečlivě přečtěte tento návod k použití.
13. Používejte kalibrované měřicí nástroje. (např. pipeta)
14. Před použitím činidla zkontrolujte datum použitelnosti.
15. Při použití uchovávejte pozitivní kontrolu (PC) odděleně, aby nedošlo ke kontaminaci.
16. Před zahájením PCR se ujistěte, že je víčko řádně uzavřeno.
17. Produkt zlikvidujte v souladu s místními nebo národními předpisy.
18. Výsledek testu konzultujte s lékařem.

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagenie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



8. TESTOVACÍ POSTUP



KROK 1. Příprava před testováním

- Příprava před testováním
 - Před použitím připravte všechny přístroje a činidla.
 - Při rozmrazování součástí a přípravě PCR Master Mix umístěte soupravu na led.
 - Po přípravě PCR master mixu je umístěte na led.



Nezmrazujte/rozmrazujte více než čtyřikrát (4).

- Odběr, přeprava a skladování vzorků
 - Vzorky k použití: Vzorek pro cytologii na bázi tekutin.
 - B. Vzorky skladujte při teplotě 2~8 °C nejdéle po dobu 4 týdnů. Pro dlouhodobé skladování zmrazte při -20 °C.
 - Extrahované nukleové kyseliny by měly být skladovány při teplotě -20 °C nebo nižší.
 - Přeprava klinických vzorků musí být v souladu s místními předpisy pro přepravu etiologických agens.
 - Používejte pouze typ vzorku uvedený v návodu k použití.
 - Při manipulaci se vzorky používejte ochranu očí, laboratorní pláště a jednorázové rukavice.
 - Vzorky by měly být skladovány za výše uvedených skladovacích podmínek. V opačném případě může dojít k získání nesprávných výsledků testu.
 - Informace o vzorku by měly být zaznamenány, aby nedošlo k záměně.



KROK 2. Extrakce nukleové kyseliny

Po předúpravě extrahujte ze vzorku nukleovou kyselinu. Extrakci nukleové kyseliny lze provést pomocí automatického purifikačního systému nebo pomocí manuálních izolačních souprav.

Pro extrakci nukleových kyselin doporučujeme postupovat podle tabulky v dolní části soupravy pro extrakci nukleových kyselin/automatického zařízení. Při extrakci nukleové kyseliny postupujte také podle protokolu výrobce.

Přístroj (Kat č.)	Reagenie (Kat č.)	Výrobce	Eluční objem	Objem vzorku
N/A (Manual)	QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (61104)	Qiagen	80 µL	200 µL
MagNA Pure 96 system	MagNA Pure 96 DNA and Viral Small Volume Kit	Roche Life Science	50 µL	200 µL
NC-15 PLUS (HWTD-01-48)	AlphaPrep™ Viral DNA/RNA Extraction Kit (VDR-B096V)	Hanwool TPC	50 µL	200 µL

KROK 3. PCR Master Mix a příprava vzorku

Název	Objem (1 test)
4X NeoPlex PCR Master Mix	5 µl
HPV HR PPM	5 µl
DW (DNase-free Water)	5 µl
Total Volume	15 µl

- Pětkrát promíchejte převrácením nebo vířením a krátkým odstředěním.
- Umístěte 15 µl alikvotů PCR Master mixu do 0,2 ml PCR zkumavek a uzavřete je víčky.
- Přidejte 5 µl každého vzorku nukleové kyseliny do odpovídající zkumavky.

Název	Objem (1 test)
PCR Směs	15 µL
Vzorek nukleové kyseliny	5 µL
Celkový objem	20 µL

- Doporučuje se připravit PCR směs těsně před použitím.
- Při přípravě vzorků by se měly používat filtrační špičky odolné proti aerosolům a těsné rukavice.
- Dbejte zvýšené opatrnosti, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.
- Reagenie zcela rozmrazte.
- Zkumavky s činidly krátce odstředte, abyste odstranili kapky z vnitřní strany víček.



- Přidejte kontrolní amplifikační reakce.
 - Negativní kontrola (NC): Místo vzorku nukleové kyseliny přidejte do zkumavky 5 µl DW (voda bez DNázy).
 - Positivní kontrola (PC): Přidejte do zkumavky 5 µl HPV HR pozitivní kontroly (PC) místo vzorku nukleové kyseliny.
 - Pro každý vzorek použijte novou pipetovací špičku.
 - Zabraňte křížové kontaminaci PCR Master Mix a vzorků s pozitivní kontrolou.
 - Neoznačujte víčko reakčních zkumavek, protože fluorescence je detekována přes víčko.
 - Zkumavku PCR důkladně odstředte po dobu 30 sekund.



NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagenie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



KROK 4. Nastavení Real-time přístroje

1) Výběr fluorescenčních kanálů.

Cíl	Barva	Cíl	Barva
HPV 33	FAM	HPV 39	Quasar 670
HPV 16	FAM	HPV 56	Quasar 670
HPV 35	FAM	HPV 52	Quasar 670
HPV 18	HEX	HPV 45	Quasar 705
HPV 66	HEX	HPV 59	Quasar 705
HPV 68	Cal Red 610	HPV 51	Quasar 705
HPV 58	Cal Red 610	IC	HEX
HPV 31	Cal Red 610	-	-

2) Nastavení PCR protokolu

Segment	Tm(°C)	Time	Cycles
1	50	4 min	1
2	95	15 min	1
3	95	30 sec	40
4	65	75 sec	
5	73	10 min	
6	55	30 sec	
7*	Melting curve 55 °C ~ 91 °C (5s/0.5°C)		

* Segment 7: Měření křivky tání

KROK 5. Analýza výsledků

Pro analýzu výsledku testu po amplifikaci PCR vezměte výsledek RFU a interpretujte jej podle "9. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU".

9. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ TESTU

1. Interpretací kritéria pro analýzu výsledků

Target	Dye	Melt Tm	Cut-off(RFU*)
HPV 33	FAM	65.0 ± 1.5°C	≥ 93.5
HPV 16	FAM	73.0 ± 1.5°C	≥ 98.3
HPV 35	FAM	80.5 ± 1.5°C	≥ 93.9
HPV 18	HEX	75.0 ± 1.5°C	≥ 95.1
HPV 66	HEX	83.5 ± 1.5°C	≥ 98.2
HPV 68	Cal Red 610	64.0 ± 1.5°C	≥ 93.0
HPV 58	Cal Red 610	71.5 ± 1.5°C	≥ 91.5
HPV 31	Cal Red 610	77.5 ± 1.5°C	≥ 94.5
HPV 39	Quasar 670	64.5 ± 1.5°C	≥ 99.7
HPV 56	Quasar 670	73.0 ± 1.5°C	≥ 97.8
HPV 52	Quasar 670	79.0 ± 1.5°C	≥ 97.3
HPV 45	Quasar 705	66.0 ± 1.5°C	≥ 92.0
HPV 59	Quasar 705	73.5 ± 1.5°C	≥ 95.1
HPV 51	Quasar 705	80.5 ± 1.5°C	≥ 98.7
IC	HEX	66.0 ± 1.5°C	≥ 100

* RFU(-d(RFU)/dT): Relative fluorescence units

2. Interpretace výsledků

Cíl	IC	Interpretace*
+	+	Detekován Cílový patogen je detekován
-	+	Není detekován Cílový patogen není detekován
-	-	Nevalidní -.Negativní (-) výsledek IC je výsledkem inhibice PCR reakce v důsledku přítomnosti inhibitoru PCR obsaženého ve vzorku a vzorek není pro test vhodný. -.Doporučuje se odstranit inhibitor PCR a provést extrakci nukleové kyseliny znovu. -.Pokud po opakovaném testu není IC detekována, lze proces extrakce nukleové kyseliny a případná přítomnost inhibitorů PCR ověřit experimentálně přidáním 10 µl vnitřní kontroly HPV HR (IC) obsažené v produktu ke vzorku s následnou extrakcí nukleové kyseliny.
+	-	Detekován -.Pokud je koncentrace nukleové kyseliny ve vzorku vysoká, může být IC signál oslaben. -.Pokud je ve vzorku detekován cílový patogen a není detekována IC je možné pokládat daný patogen za detekovaný. -.Pro kontrolu IC: Naředte templátovou nukleovou kyselinu v destilované vodě a opakujte PCR se zředěnou.

*IC není nutná pro interpretaci pozitivních nebo negativních výsledků a vysoká nálož nukleové kyseliny patogenu vede k nízkému nebo negativnímu signálu IC.

* Pokud je PC detekována nad jeho mezní hodnotou, může to znamenat, že se soupravou bylo zacházeno nesprávným způsobem a měla by být vyměněna za novou.

3. Příklady použití klinických vzorků

No	Target														Result	
	33	16	35	18	66	68	58	31	39	56	52	45	59	51		IC
Sample 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	HPV 16, 68, 45
Sample 2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	HPV 18, 39
Sample 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	HPV 33
Sample 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Not detected
Sample 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Not detected (IC Invalid)
Positive Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Positive Control
Negative Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negative Control

4. Opatření pro analýzu výsledků

- 1) Pokud je hodnota pozitivní kontroly (HPV HR Positive Kontrol(PC)) a RFU(-d(RFU)/dT) mimo přijatelný rozsah, znehodnotte všechny příslušné testy a proveďte je znovu.
- 2) Pokud je pozorována amplifikace v jamce negativní kontroly (NC), znamená to, že během pokusu došlo ke kontaminaci, a provede se opakovaný test. Pokud se však po opakovaném testu potvrdí stejný výsledek, doporučuje se odstranit zdroj kontaminace a znovu provést proces extrakce nukleové kyseliny.

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagensie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



- 3) Vnitřní kontrola (IC) by měla být vždy amplifikována, a pokud je koncentrace nukleové kyseliny ve vzorku vysoká, může být signál IC oslaben, což vede ke snížení nebo posunu signálu. Pokud chcete zkontrolovat IC, doporučujeme vzorek naředit a znovu otestovat.
- 4) Pokud jsou cíl i IC určeny jako negativní, přítomnost inhibitorů v extrahované nukleové kyselině bránila PCR reakci. Doporučuje se provést proces extrakce nukleové kyseliny znovu.

10. KONTROLA KVALITY

NeoPlex™ HPV HR obsahuje HPV HR pozitivní kontrolu (PC) jako pozitivní kontrolu a DW (voda bez DNázy) jako negativní kontrolu. Pro všechny běhy musí být získány platné výsledky testů pro PC a NC. Výsledek pozitivní kontroly musí být pozitivní (platný). Výsledek negativní kontroly musí být negativní (platný). Pokud jsou výsledky pozitivní a negativní kontroly trvale neplatné, kontaktujte nás a požádejte o technickou pomoc.

11. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

1. Pokud signály nejsou detekovány

Možné příčiny	Řešení
Chyba při odběru vzorku	Pokud nebyl pozorován cíl a signál IC, PC, znovu odeberte vzorek.
Selhání extrakce nukleové kyseliny	Pečlivě si přečtěte návod k použití soupravy pro extrakci nukleové kyseliny a znovu extrahujte nukleovou kyselinu ze vzorku.
Nesprávné nastavení PCR	Zopakujte postup detekce se správným nastavením.
Nesprávný cyklus PCR nebo teplota	Zkontrolujte podmínky PCR a v případě potřeby opakujte PCR při správném nastavení.
Fluorescence pro analýzu dat neodpovídá protokolu	Zvolte správnou fluorescenci pro každý cíl uvedený v tomto návodu k použití pro analýzu dat.
Ponechání činidel při pokojové teplotě po dlouhou dobu nebo nesprávné podmínky skladování	Zkontrolujte podmínky skladování a datum expirace reagensů a použijte novou soupravu.
Použití více než čtyřikrát (4) zmrazeného/rozmrazeného činidla	Nezmrazujte a nerozmrazujte opakovaně více než čtyřikrát(4). Může dojít ke snížení citlivosti činidla. Zkontrolujte dobu zmrazení/rozmrazení a použijte novou soupravu.
Přítomnost inhibitoru	Zředte templátovou nukleovou kyselinu v destilované vodě (10-100x) a opakujte PCR se zředěnou nukleovou kyselinou (pokud je vzorek dostupný, začněte znovu od postupu extrakce nukleové kyseliny).
Vysoké zatížení nukleovou kyselinou patogenu	Zředte templátovou nukleovou kyselinu v destilované vodě (10-100x) a opakujte PCR se zředěnou nukleovou kyselinou.

2. Pokud je pozitivní signál na negativní kontrole(Falešně pozitivní

Možné příčiny	Řešení
Přítomnost zkřížené reakce / kontaminace	Dekontaminujte všechny povrchy a nástroje chlornanem sodným nebo etanolem. Při extrakci používejte filtrační špičky. Vyměňujte špičky mezi zkumavkami. Opakujte extrakci nukleových kyselin s novou sadou činidel.

3. Pokud je na pozitivní kontrole negativní signál/ Falešně negativní

Možné příčiny	Řešení
Chyba při odběru vzorku	Znovu odeberte vzorek a celý proces zopakujte. Ujistěte se, že je přípravek skladován za doporučených podmínek
Chyba při extrakci nukleové kyseliny	Znovu extrahujte nukleovou kyselinu
Nesprávné nastavení PCR	Opakujte PCR s opraveným nastavením
Chyba při přidávání nukleové kyseliny do příslušných zkumavek PCR	Zkontrolujte čísla vzorků pro zkumavky obsahující nukleovou kyselinu a ujistěte se, že jste během detekčního procesu přidali nukleovou kyselinu do správných zkumavek PCR.
Nesprávná směs PCR	Zkontrolujte, zda jsou přidány všechny složky (pokud použijete předem připravenou premix, měla by být snížena citlivost) Každé činidlo by mělo být použito po homogenizaci a před vložením do PCR reakce by mělo být centrifugováno.
Pokud je signál PC neplatný	Pokud je PC identifikován nad mezní hodnotou, může to znamenat, že se soupravou bylo zacházeno nesprávným způsobem, měla by být nahrazena novou.

12. CHARAKTERISTIKA TEST

1 Analytická senzitivita

1.1 Mez detekce (LoD)

Tato studie byla provedena za účelem stanovení citlivosti pomocí testování tekutého cytologického vzorku. Podíl pozitivních výsledků získaných z každé koncentrace byl podroben testování 95% míře shody pomocí probitové analýzy a LoD každého cíle byly získány provedením 24 krát provedením testů.

Target	LoD	Target	LoD
HPV 33	0.51 copies/ul	HPV 31	1.72 copies/ul
HPV 16	0.46 copies/ul	HPV 39	0.53 copies/ul
HPV 35	1.30 copies/ul	HPV 56	1.94 copies/ul
HPV 18	0.59 copies/ul	HPV 52	1.50 copies/ul
HPV 66	1.04 copies/ul	HPV 45	0.56 copies/ul
HPV 68	1.12 copies/ul	HPV 59	0.55 copies/ul
HPV 58	1.68 copies/ul	HPV 51	0.51 copies/ul

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagentie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



1.2 Mezní hodnota cut-off

Pro stanovení mezní hodnoty byla hodnota RFU stanovena pro každý cíl viz Tab.:

Target	Cut-off (RFU*)	Target	Cut-off (RFU*)
HPV 33	≥93.5	HPV 39	≥99.7
HPV 16	≥98.3	HPV 56	≥97.8
HPV 35	≥93.9	HPV 52	≥97.3
HPV 18	≥95.1	HPV 45	≥92.0
HPV 66	≥98.2	HPV 59	≥95.1
HPV 68	≥93.0	HPV 51	≥98.7
HPV 58	≥91.5	IC	≥100
HPV 31	≥94.5	-	-

* RFU(-d(RFU)/dT): Relative fluorescence units

2 Analytická specifita

2.1 Interference

Č.	Řešení	Interferující substance	Koncentrace
1		Krevní plasma	5%
2	Endogenní substance	Červené krvinky	5%
3		Krevní tělíska	5%
4		Lidská genomová DNA	1µg
5		PBS	1%
6	Exogenní látky	Výplachy	2%
			5%
7		Antimykotická mast	2%
			5%
8		Vaginální lubrikanty	2%
			5%

2.2 Zkřížená reaktivita

Pro stanovení analytické specifity byla provedena třikrát (3) studie křížové reaktivity s použitím jednadvaceti (21) různých patogenů. Výsledkem bylo, že amplifikace PCR a zkřížená reaktivita nebyly u níže uvedených patogenů pozorovány.

No	Strain No.	Strain	Concentration
1	ATCC 49145D-5	Gardnerella vaginalis	1.11X10 ⁷ copies/ul
2	ATCC 700724D-5	Haemophilus ducreyi	1.09X10 ⁷ copies/ul
3	ATCC 10231D-5	Candida albicans	1.16X10 ⁵ copies/ul
4	ATCC VR-539	Human herpesvirus 1 DNA	1X10 ⁶ copies/ul
5	ATCC VR-540	Human herpesvirus 2 DNA	1X10 ⁶ copies/ul
6	ATCC 4357D-5	Lactobacillus acidophilus	7.89X10 ⁸ copies/ul
7	ATCC 700669D-5	Streptococcus pneumoniae	4.3X10 ⁸ copies/ul
8	ATCC 700928D-5	Escherichia coli	7.14X10 ⁷ copies/ul
9	ATCC 25285D-5	Bacteroides fragilis	8.4X10 ⁷ copies/ul
10	ATCC 13047D-5	Enterobacter cloacae	6.09X10 ⁷ copies/ul
11	ATCC 12453D	Proteus mirabilis	1.14X10 ⁸ copies/ul
12	ATCC 700802D-5	Enterococcus faecalis	1.32X10 ⁸ copies/ul
13	ATCC 12228D-5	Staphylococcus epidermidis	1.41X10 ⁸ copies/ul
14	HPKTCC B3204	Neisseria meningitidis	1x10 ⁵ copies/ul
15	ATCC VR-348BD	Chlamydia trachomatis(CT)	8.89X10 ⁵ copies/ul
16	ATCC 53420D-5	Neisseria gonorrhoeae(NG)	2.15X10 ⁷ copies/ul
17	ATCC 23114D	Mycoplasma hominis(MH)	1.39X10 ⁴ copies/ul
18	ATCC 33530D	Mycoplasma genitalium(MG)	1.6X10 ⁴ copies/ul
19	ATCC 30001D	Trichomonas vaginalis(TV)	4.3X10 ⁵ copies/ul
20	ATCC 33695	Ureaplasma urealyticum(UU)	1.06X10 ⁴ copies/ul
21	ATCC 27815	Ureaplasma parvum(UP)	10 ⁸ ccu/vial

Výsledkem testu zkřížené reaktivity pro necílové genotypy (82, 6, 53, 61, 70, 73, 26, 67, 40, 44, 11, 42, 54, 43, 69) NeoPlex™ HPV HR, bylo, že nebyly pozorovány žádné nespecifické signály způsobené zkříženými genotypy HPV.

2.3 Přenos a křížová kontaminace

Tato studie byla provedena za účelem vyhodnocení efektu přenosu a potenciální křížové kontaminace. Vysoce koncentrovaný pozitivní vzorek a negativní kontrolní vzorek byly křížově testovány pomocí stejného PCR přístroje a byly stanoveny 100% negativní výsledky (84/84) (95% CI: 95,70-100 %) pro každý negativní vzorek, resp.

3 Přesnost

3.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla hodnocena testováním po dobu dvaceti (20) různých dnů, dva (2) běhy na den, tři (3) cykly na běh. Cílové hodnoty byly stanoveny ve třech (3) úrovních koncentrace (nízká, střední, vysoká) a byla zjištěna 100% shoda určující opakovatelnost. Kritérium CV, 10 %, bylo splněno u všech výsledků testu.

3.2 Reprodukovatelnost

Studie reprodukovatelnosti byla provedena se čtyřmi různými podmínkami: mezi šaržemi (3 šarže), mezi testery (3 testeři), mezi přístroji (3 přístroje) a mezi pracovišti (3 pracoviště). Všechny výsledky vykazovaly 100% shodu.

4 Klinické hodnocení

Studie klinického hodnocení klinické citlivosti, klinické specifčnosti a korelace byly provedeny u 3802 vzorků cytologie na bázi tekutin. Výsledky klinických studií byly analyzovány pomocí tabulky 2x2 a shrnuty níže:

4.1 Klinická přesnost (klinická senzitivita a specifita)

Došli jsme k závěru, že klinická citlivost a specifčnost testovací soupravy je platná a splňuje klinickou účinnost.

Target	Clinical sensitivity	Clinical specificity
HPV 33	98.02% [95% CI: 93.03 - 99.76]	99.84% [95% CI: 99.54-99.97]
HPV 16	99.54% [95% CI: 97.47 - 99.99]	99.89% [95% CI: 99.59 - 99.99]
HPV 35	98.90% [95% CI: 94.03 - 99.97]	99.79% [95% CI: 99.46 - 99.94]
HPV 18	99.19% [95% CI: 95.59 - 99.98]	100.00% [95% CI: 99.80 - 100.00]
HPV 66	98.32% [95% CI: 94.06 - 99.80]	99.89% [95% CI: 99.61 - 99.99]
HPV 68	100.00% [95% CI: 96.58 - 100.00]	99.84% [95% CI: 99.53 - 99.97]
HPV 58	98.80% [95% CI: 95.74 - 99.85]	99.95% [95% CI: 99.69 - 100.00]
HPV 31	100.00% [95% CI: 96.61 - 100.00]	99.89% [95% CI: 99.62 - 99.99]
HPV 39	99.35% [95% CI: 96.41 - 99.98]	99.89% [95% CI: 99.61 - 99.99]
HPV 56	98.90% [95% CI: 94.03 - 99.97]	99.84% [95% CI: 99.54 - 99.97]
HPV 52	100.00% [95% CI: 98.09 - 100.00]	99.89% [95% CI: 99.60 - 99.99]
HPV 45	100.00% [95% CI: 95.32 - 100.00]	100.00% [95% CI: 99.81 - 100.00]
HPV 59	100.00% [95% CI: 95.70 - 100.00]	99.95% [95% CI: 99.71 - 100.00]
HPV 51	98.99% [95% CI: 94.50 - 99.97]	99.95% [95% CI: 99.71 - 100.00]

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagenie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



4.2 Shoda mezi metodou NeoPlex™ HPV HR Detection a komparátorem (korelace)

Celková shoda mezi metodou NeoPlex™ HPV HR Detection a komparátorem byla potvrzena, jak je uvedeno níže.

Target	Positive agreement	Negative agreement	Total agreement	Kappa value
HPV33	99.01% [95% CI: 94.61-99.97]	99.89% [95% CI: 98.62-99.99]	99.85% [95% CI: 99.56-99.97]	0.984
HPV16	100.00% [95% CI: 98.32-100.00]	99.94% [95% CI: 99.69-100.00]	99.95% [95% CI: 99.72-100.00]	0.997
HPV35	98.91% [95% CI: 94.09-99.97]	99.84% [95% CI: 99.54-99.97]	99.80% [95% CI: 99.49-99.95]	0.977
HPV18	100.00% [95% CI: 97.02-100.00]	99.95% [95% CI: 99.70-100.00]	99.95% [95% CI: 99.72-100.00]	0.996
HPV66	99.16% [95% CI: 95.41-99.98]	99.95% [95% CI: 99.70-100.00]	99.90% [95% CI: 99.64-99.99]	0.991
HPV68	99.07% [95% CI: 94.95-99.98]	99.89% [95% CI: 99.62-99.99]	99.85% [95% CI: 99.56-99.97]	0.985
HPV58	100.00% [95% CI: 97.76-100.00]	99.84% [95% CI: 99.52-99.97]	99.85% [95% CI: 99.56-99.97]	0.990
HPV31	100.00% [95% CI: 96.55-100.00]	99.79% [95% CI: 99.46-99.94]	99.80% [95% CI: 99.49-99.95]	0.980
HPV39	98.71% [95% CI: 95.42-99.84]	99.95% [95% CI: 99.70-100.00]	99.85% [95% CI: 99.56-99.97]	0.989
HPV56	98.92% [95% CI: 94.15-99.97]	99.95% [95% CI: 99.71-100.00]	99.90% [95% CI: 99.64-99.99]	0.989
HPV52	100.00% [95% CI: 98.10-100.00]	99.94% [95% CI: 99.69-100.00]	99.95% [95% CI: 99.72-100.00]	0.997
HPV45	100.00% [95% CI: 95.32-100.00]	100.00% [95% CI: 99.81-100.00]	100.00% [95% CI: 99.81-100.00]	1.000
HPV59	100.00% [95% CI: 95.60-100.00]	99.84% [95% CI: 99.54-99.97]	99.85% [95% CI: 99.56-99.97]	0.981
HPV51	100.00% [95% CI: 96.27-100.00]	99.89% [95% CI: 99.62-99.99]	99.90% [95% CI: 99.64-99.99]	0.989

14. SYMBOLY

Katalogové číslo	Šarže	Datum Výroby	Datum expirace	Distributor
<i>In vitro</i> diagnostický zdravotnický prostředek	Horní teplotní limit	Pozor	Čtěte návod k použití	Dovozce
Výrobce	Obsah stačí pro <n> testů	Autorizovaný zástupce pro Evropu	Shoda s Evropskou Direktivou 98/79/EC	Unikátní identifikace prostředku

13. OMEZENÍ TESTU

- Výsledky tohoto testu musí být korelovány s klinickou anamnézou, epidemiologickými údaji a dalšími údaji o pacientovi, které má lékař k dispozici.
- Pokud nepoužijete vzorky a další vzorky popsané v této příručce, můžete získat nepřesné výsledky.
- Přestože jsou výsledky tohoto testu negativní, nedoporučuje se vyloučit možnost, že je infekce skutečně přítomna.
- Není vyloučeno, že tato souprava vykazuje falešně pozitivní výsledky v důsledku přítomnosti křížové kontaminace.
- Mohou se vyskytnout falešně negativní výsledky v důsledku inhibice polymerázy. Vnitřní kontrola HPV HR(IC) může pomoci identifikovat jakoukoli látku existující ve vzorcích, která interferuje s izolací nukleové kyseliny a amplifikací PCR.
- Tato souprava je určena pouze pro profesionální použití. Tuto soupravu může používat pouze vyškolený poskytovatel zdravotní péče.



GeneMatrix Inc.
Manufacturing site
7F, #B, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro,
Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13488
REPUBLIC OF KOREA
Tel: +82-31-628-2045 Fax: +82-31-628-2002



MT Promed Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7
66386 St. Ingbert, Germany
Tel: +49-6894-581020, Fax: +49-6894-581021



Issue date: 2022.07

NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagentie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití

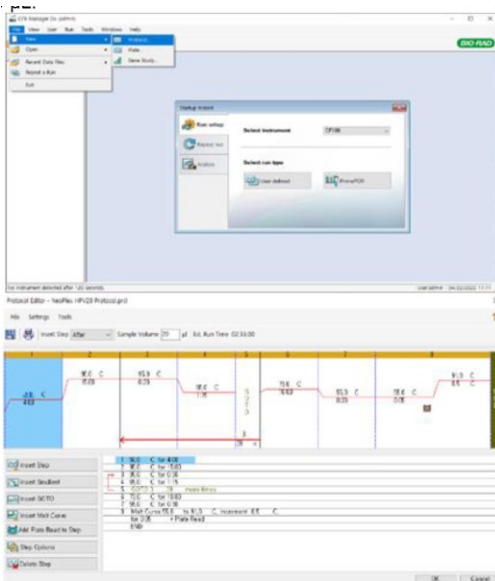


APPENDIX, OPERACE S PCR PŘÍSTROJEM

1) CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

1. Nastavení protokolu

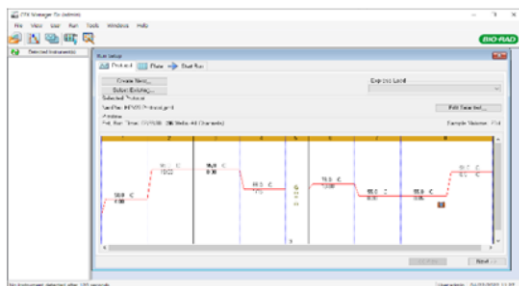
- ① Klikněte na Soubor -> Protokol, Vytvořit editor protokolu pro nastavení PCR.
- ② Podmínka PCR je nastavena takto a objem vzorku je nastaven na 20 µl.
- ③ Po nastavení protokolu PCR se vytvoří obrazovka nastavení



Segment	Tm(°C)	Time	Cycles
1	55	4 min	1
2	95	15 min	1
3	95	30 sec	40
4	65	75 sec	
5	73	10 min	1
6	55	30 sec	1
7*	Melting curve 55 °C ~ 90 °C (5s / 0.5°C)		

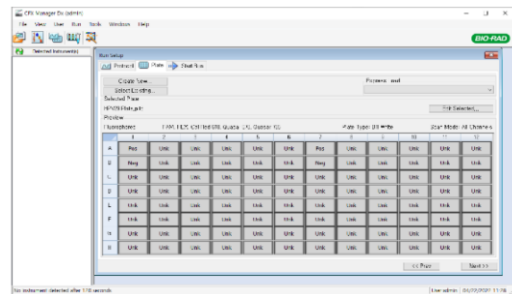
* Segment 7: Melting curve measurement

experimentu. Zaškrtněte protokol PCR a klikněte na tlačítko "Next".
(Nebo klikněte na záložku "Plate" (Destička).

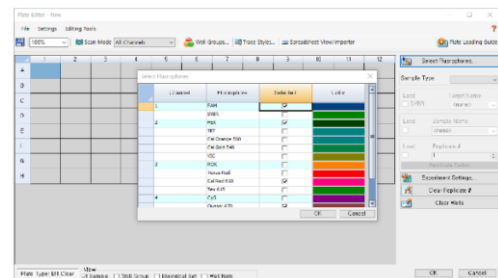


2. Nastavení protokolu

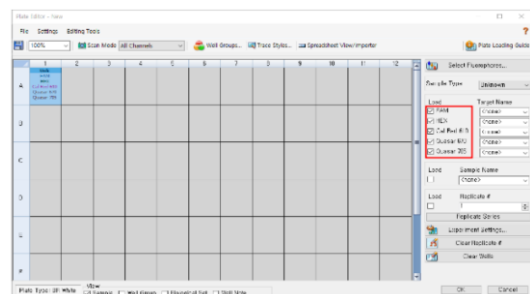
- ① Klikněte na tlačítko "Create New" (nebo klikněte na tlačítko "Sect Existing" a načtěte destičku pro experiment).



- ② Klikněte na "Select Fluorophores" (Vybrat fluorofory). Zaškrtněte políčko (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, Quasar 705) pro fluorescenční látku použitou pro experiment a klikněte na tlačítko OK.



- ④ Klikněte na zaškrťovací políčko pro fluorescenční látku (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, Quasar 705) vybrané jamky.



⑤

Kliknutím na "Settings" (Nastavení) nastavte typ destičky.
(Settings -> Plate Type -> BR white)

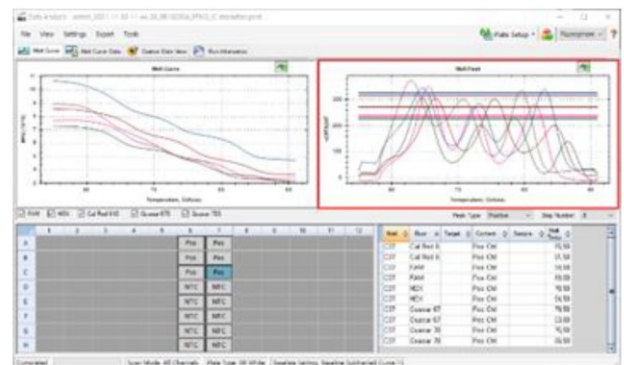
NeoPlex™ HPV HR Detection

Multiplex Real-time PCR reagentie pro detekci lidského papilloma viru
Pouze pro odborné *in vitro* diagnostické použití



4. Předběžné nastavení pro analýzu dat

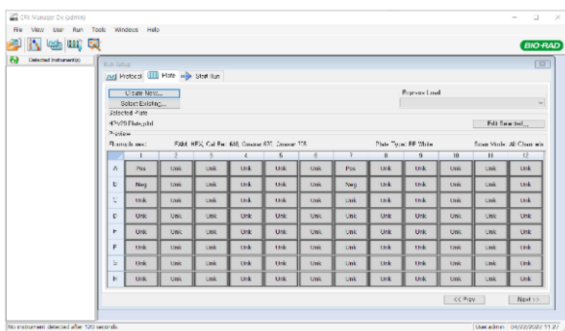
- ① Po testu vyberte křivku tání, abyste zkontrolovali výsledky vrcholu tání.
- ② Vyberte každou analytickou fluorescenční látku (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670, Quasar 705) a nastavte prahovou lištu Melt Peak na "0".



⑥ Klikněte na "OK" a uložte nový soubor nastavení desky.

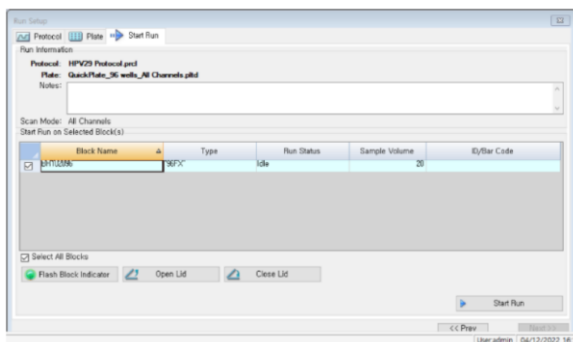
⑦ Otevře se obrazovka Experimental Setup (Experimentální nastavení) a zkontroluje se nastavená deska.

Klikněte na "Next" (nebo klikněte na záložku "Start Run").



3. Spustit běh

① Na obrazovce karty Experiment Setup Start Run klikněte na tlačítko "Close Lid", čímž zavřete víko zařízení. (Pokud je víko zavřené, přeskočte tento krok).



② Klikněte na tlačítko "Start Run" (Spustit běh).

③ Provozní soubor se uloží do složky určené uživatelem a začne pracovat.

