
[Letter of Confirmation] Anyplex™ II HPV HR Detection (Cat. No. HP7E00X)

[Objective] Anyplex™ II HPV HR Detection fulfills the Meijer's criteria for HPV screening purpose

To Whom it may concern,

Greetings, this is Jun Hyung William Seo from Seegene, General Manager who runs the business in Northern Europe where it includes Lithuania, Diamedica UAB official partner distributing Seegene assays exclusively in the territory of Lithuania.

Please note that Anyplex™ II HPV HR Detection (Cat. No. HP7E00X) fulfills the below international consensus validation metric for HPV DNA tests for cervical cancer screening.

Meijer CJLM et al. (2009) Int J Cancer 124(3):516~20

Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women of 30 years and older

Thank you.



Jun Hyung William Seo, Ph.D, General Maanger
Sales Dept. of Northern Europe
Seegene, Inc.

Anyplex™ II

HPV HR Detection

(liet. Aukštos rizikos ŽPV aptikimas)

(Kat. nr. HP7E00X)

Anyplex™ II PGR sistema, skirta žmogaus papilomos viruso - 14 aukštos rizikos ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) aptikimui skystos terpės citologiniuose ir gimdos kaklelio nuograndų mėginiuose.

Skirta naudoti su

1. CFX96™ tikro laiko PGR sistema (CFX Manager™, programinė įranga - IVD v1.6)
2. CFX96™ Dx sistema (CFX Manager™ Dx, programinė įranga - v3.1)



Tik in vitro diagnostiniam naudojimui.

Seegene Inc.,



Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Korėjos Respublika 05548



Medical Technology PromedT Consulting GmbH

Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Vokietija

JAV produktas negalimas.

TURINYS

PASTABOS	-----	3
PASKIRTIS	-----	5
PRINCIPAI IR PROCEDŪROS APŽVALGA	-----	6
PAPILDOMA INFORMACIJA	-----	8
REAGENTAI	-----	9
LAIKYMAS IR NAUDOJIMAS	-----	10
REIKALINGOS NETEIKIAMOS MEDŽIAGOS	-----	10
PROTOKOLAS	-----	11
TIKRO LAIKO PGR INSTRUMENTO SĄRANKA IR REZULTATŲ ANALIZĖ	---	20
REZULTATAI	-----	52
TRIKČIŲ APTIKIMAS IR ŠALINIMAS	-----	57
VEIKSMINGUMAS	-----	59
LITERATŪROS NUORODOS	-----	63
SIMBOLIAI	-----	64
UŽSAKYMO INFORMACIJA	-----	65

PASTABOS

- Tik in vitro diagnostiniam naudojimui.
- Jei šis produktas naudojamas su **Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ir Seegene STARlet**, galima atlikti daugiausiai 5 atskirus tyrimo vykdymus.
- **Šis tyrimas yra patvirtintas naudojimui su šiais mėginių tipais: gimdos kaklelio nuograndų ir citologiniai mėginiai skystoje terpėje.** Šis tyrimas nėra patvirtintas naudojimui su kito tipo mėginiais.
- **Iki naudojimo DNR mėginius laikykite $\leq -70^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o naudojimo metu - ant ledo.**
- Tyrimo jautrumas gali sumažėti, jei mėginiai yra pakartotinai užšaldomi ir atšildomi arba ilgai sandėliuojami.
- Laboratorijos darbo eiga turi būti vienakryptė.
- Tyrimo rezultatų patikimumas priklauso nuo adekvataus mėginio paėmimo, laikymo, transportavimo ir apdorojimo procedūros.
- Dėvėkite vienkartines pirštines ir, prieš patenkant į kitą darbo vietą, jas keiskite. Užterštumo atveju, pirštines nedelsiant keiskite naujomis arba naudokite DNR nuklenksminantį reagentą.
- Darbui reikalingos medžiagos ir priemonės turi būti laikomos joms skirtose vietose ir negali būti pernešamos iš vienos vietos į kitą.
- Nepipetuokite burna.
- Laboratorijos darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Tvarkant mėginius ir reagentus, dėvėkite vienkartines pirštines be pudros, laboratorinį chalata ir akių apsaugą. Po mėginių ir tyrimo reagentų naudojimo, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Iš reagentų mėgintuvėlių pilstant alikvotas, venkite reagentų užteršimo. Rekomenduojama naudoti sterilius aerzoliams atsparius vienkartinis pipečių antgalis.
- Nepuluokite skirtingų partijų ar skirtingų tos pačios partijos mėgintuvėlių reagentų.
- Nenaudokite produkto pasibaigus jo galiojimo datai.
- Vienkartinis priemonis nenaudokite pakartotinai.
- Naudokite užsukamus mėgintuvėlius ir venkite galimo taškymosi ar kryžminio mėginių užteršimo mėginių paruošimo metu.
- Būkite atidūs ir neužterškite reagentų išskirtomis nukleino rūgštimis, PGR produktais ar teigiama kontrole. Norint išvengti reagentų užteršimo, rekomenduojama naudoti filtrinius antgalis.
- Kiekvieną tyrimą atlikite atskiroje izoliuotoje darbo vietoje.
- Norint išvengti darbo vietos užteršimo amplifikacijos produktais po amplifikacijos, PGR reakcijos mėgintuvėlius atidarykite tik tam skirtoje darbo vietoje.

- Teigiamas medžiagas laikykite atskirai nuo rinkinio reagentų.
- Tvarkant mėginius, būtina laikytis laboratorijos saugos procedūrų (skaitykite biologinės saugos mikrobiologijos ir biomedicinos laboratorijoje rekomendacijas ir CLSI dokumentus). Visus darbo paviršius kruopščiai išvalykite ir dezinfekuokite 0,5% natrio hipochloritu (dejonizuotame ar distiliuotame vandenyje). Produkto komponentai, įskaitant produkto likučius ir pakuotę, gali būti laikomi laboratorinėmis atliekomis. Nepanaudotus reagentus ir atliekas išmeskite laikydamiesi taikomų federalinių, valstybinių ir vietinių taisyklių.
- Galiojimo laikas yra 13 mėnesių po pagaminimo datos, laikant $\leq -20^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Galiojimo data nurodyta etiketėje.
- Seegene NIMBUS ir Seegene STARlet yra tokia pati įranga kaip Microlab NIMBUS IVD ir Microlab STARlet IVD, nors jų gamintojai yra skirtingi. Kadangi nėra jokių prietaisų techninės įrangos skirtumų, tyrimų rezultatai yra tokie patys.
- Prekybinis „CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD” pavadinimas yra pakeistas į „CFX96™ Dx system”. Kadangi nėra jokių sistemos techninės įrangos skirtumų, tikima, jog abi sistemos pateikia tokius pat tyrimų rezultatus.
- „CFX Manager™ Dx Software v3.1” yra pagerinta „CFX Manager™ Software-IVD v1.6” versija. Atnaujintoje programinėje įrangoje yra įdiegti „Run” meniu patobulinimai. Šie patobulinimai neįtakoja duomenų analizės rezultatų, todėl rezultatai išlieka tokie patys.
- Šis rinkinys yra skirtas naudoti kaip papildoma priemonė atliekant diferencinę taikinio patogenų infekcijų (žmogaus papilomavirusų) diagnozę.

PASKIRTIS

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas yra kokybinis *in vitro* tyrimas, skirtas 14 aukštos rizikos ŽPV tipų aptikimui skystos terpės citologiniuose ir gimdos kaklelio nuograndų mėginiuose. Šis tyrimas specifiškai identifikuoja ne tik ŽPV 16 ir ŽPV 18, bet ir kitus 12 individualius aukštos rizikos ŽPV genotipus (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ir 68) kliniškai reikšmingu infekcijos lygiu.

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas yra atliekamas:

- a) Atliekant pacientų su ASC-US (nenustatytos reikšmės plokščiojo epitelio ląstelėmis) gimdos kaklelio citologijos rezultatais profilaktinį tikrinimą, dėl nukreipimo kolposkopijai. Šio tyrimo rezultatai nėra naudojami kaip kolposkopijos atmetimo kriterijus.
- b) Atliekant profilaktinį patikrinimą pacientų su ASC-US gimdos kaklelio citologijos rezultatais, siekiant nustatyti ŽPV 16, HPV 18 ir kitų 12 aukštos rizikos ŽPV genotipų (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ir 68) buvimą ar nebuvimą.
- c) Naudojant kartu su gimdos kaklelio citologijos tyrimu, kaip papildomą profilaktinį patikrinimą, siekiant nustatyti ŽPV 16, HPV 18 ir kitų 12 aukštos rizikos ŽPV genotipų (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ir 68) buvimą ar nebuvimą.
- d) Naudojant kaip pirminį profilaktinio patikrinimo tyrimą, siekiant identifikuoti moteris, kurios yra priskiriamos padidintos rizikos grupei dėl gimdos kaklelio vėžio išsivystymo ar aukštos rizikos susirgimo tikimybės buvimo.
- e) Naudojant kaip pirminį profilaktinio patikrinimo tyrimą, siekiant nustatyti ŽPV 16, HPV 18 ir kitų 12 aukštos rizikos ŽPV genotipų (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ir 68) buvimą ar nebuvimą.

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo rezultatai, kartu su gydytojo citologijos tyrimų ir kitų rizikos faktorių įvertinimu bei remiantis profesinėmis gairėmis, gali būti naudojami kaip gairės planuojant tolimesnius veiksmus pacientui.

PRINCIPAI IR PROCEDŪROS APŽVALGA

1. Principai

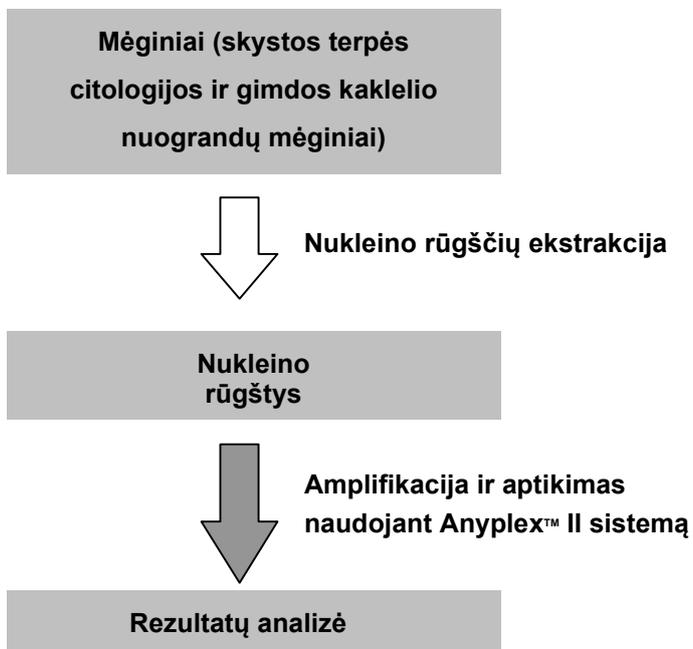
Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas yra paremtas Seegene patentuota TOCE™ technologija, kurios dėka viename fluorescencijos kanale galima aptikti keletą patogenų, naudojant tikro laiko PGR instrumentą.

Atliekant lydimosi kreivės analizę, dažnai pastebimi temperatūros skirtumai tarp DNR su variabilia seka, kurie yra reikšmingi klinikinėje diagnostikoje, kai tikslūs ir atkartojami rezultatai yra kritiškai svarbūs. Tačiau TOCE™ technologija neįtakoja sekų variacijų, taip užtikrinant nuoseklias Tm reikšmes.

Su Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimu galima atlikti sudėtinį tyrimą naudojant galutinio taško CMTA (galutinio taško lydimosi temperatūros analizės) arba ciklinės CMTA (ciklinės lydimosi temperatūros analizės) metodą. Ciklinės CMTA metodas yra priskiriamas naujai molekulinį tyrimų klasei, kuri gali išskirti tiriamą patogeną iš daugelio patogenų, esančių mėginyje. Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas yra sudėtinis tikro laiko PGR tyrimas, kurio dėka vienu metu galima atlikti 14 aukštos rizikos ŽPV tipų (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) taikinių nukleino rūgščių bei vidinės kontrolės (VK) amplifikaciją, aptikimą ir diferenciaciją.

Atliekant PGR, veiksmingumas gali sumažėti dėl inhibitorių, esančių klinikuose mėginiuose. Vidinė kontrolė (VK) yra integruota į produktą kaip endogeninė viso proceso kontrolė, skirta nukleino rūgščių ekstrakcijos stebėjimui ir galimos PGR inhibicijos aptikimui. VK yra amplifikuojama kartu su nukleino rūgštimis klinikuose mėginiuose. Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrime yra naudojamas žmogaus ląstelės koduojantis genas kaip endogeninė VK, kuri užtikrina DNR išgryninimą, PGR reakcijos patvirtinimą ir mėginio paėmimo tinkamumą.

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrime yra naudojama Uracil-DNR glikozilazės (UDG)-dUTP sistema. UDG - dUTP sistema yra plačiai naudojama atliekant PGR amplikono pernešimo eliminavimui, UDG pašalinant uracilo likučius nuo DNR ir išardant N-glikozilo jungtis.

2. Procedūros apžvalga

PAPILDOMA INFORMACIJA

Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcija yra susijusi su gimdos kaklelio vėžiu. ŽPV galima skirstyti į “aukštos rizikos” (AR) ir “žemos rizikos” (ŽR) grupes, remiantis gimdos kaklelio pakitimais. Taigi, labai svarbu žinoti ŽPV tipą, taip užkertant kelią vėžio vystymuisi ir ligos pernešimui. Šiuo metu komerciškai įsigijami produktai, skirti ŽPV diagnostikai, yra paremti zondo hibridizacijos metodu, aptinkant ir (ar) nustatant ŽPV genotipą. Tačiau pagrindinis šio metodo trūkumas – didelis klaidingai teigiamų rezultatų koeficientas dėl kryžminio reaktyvumo tarp zondų ir įvairių virusinių DNR ar PGR amplikonų, naudojamų hibridizacijai. Pristatome inovatyvią ŽPV aptikimo/genotipo nustatymo tyrimų sistemą, kuri amplifikuoja tik specifinius taikinius be jokio kryžminio reaktyvumo, o aptikimas yra automatizuotas naudojant tikro laiko PGR metodą. Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas specifiškai aptinka tikrąjį ŽPV ir tiksliai nustato genotipą. Sistemoje yra endogeninė vidinė kontrolė, kuri tikrina, ar PGR reakcijos metu nėra inhibicijos.

Gimdos kaklelio vėžio, kuris progresuoja nuo priešvėžinės būklės iki invazinio vėžio, priešvėžinė būklė gali tęstis 7-20 metų; todėl, įtarus ŽPV infekciją, galima atlikti ankstyvąją diagnozę. Aukštos rizikos ŽPV genotipai gali sukelti gimdos kaklelio vėžio išsivystymą; ypatingai ŽPV 16 ir 18 – jie yra siejami su 70% gimdos kaklelio vėžio atvejų. Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas tuo pat metu gali identifikuoti 14 aukštos rizikos ŽPV tipų, įskaitant ŽPV16 ir 18.

REAGENTAI

Rinkinio reagentų pakanka 100 reakcijų. Užsakymo informacija

(**REF** HP7E00X).

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas			
Simboliai	Turinys	Tūris	Aprašymas
PRIMER	4X HPV HR TOM	500 µl	TOCE oligo mišinys (TOM): - Amplifikacijos ir aptikimo reagentai
PREMIX	EM1	500 µl	- DNR polimerazė - Uracil-DNR glikozilazė (UDG) - Buferis su dNTPs
CONTROL +	HPV HR PC1	50 µl	Teigiama kontrolė (angl. PC (positive control)): - Patogenų klonų mišinys
CONTROL +	HPV HR PC2	50 µl	Teigiama kontrolė (angl. PC (positive control)): - Patogenų klonų mišinys
CONTROL +	HPV HR PC3	50 µl	Teigiama kontrolė (angl. PC (positive control)): - Patogenų klonų mišinys
WATER	Vanduo be RN-azių	1000 µl	Ypač grynas, PGR laipsnio
	Naudotojo vadovas		

LAIKYMAS IR NAUDOJIMAS

Visi Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo komponentai turi būti laikomi $\leq -20^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Visi komponentai yra stabilūs iki jų galiojimo laiko (nurodyta etiketėje) pabaigos, jei yra laikomi rekomenduojamomis sąlygomis. Rinkinio komponentų veiksmingumo neįtakoja 5 užšaldymo ir atšildymo ciklai. Jei reagentai bus naudojami su pertraukomis, išpilstykite juos alikvotomis ir užšaldykite.

REIKALINGOS NETEIKIAMOS MEDŽIAGOS

- Vienkartinės pirštinės be pudros (latekso ar nitrilo)
- Pipetės (reguliuojamos) ir sterilūs pipečių antgaliai
- 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėliai
- Nukleino rūgščių ekstrakcijos rinkinys (žr. skyrių Nukleino rūgščių ekstrakcija)
- Proteinazė K (skirta SEEPREP12™, kat. nr.P4850, SIGMA)
- Ledo gaminimo aparatas
- Stalinė centrifuga
- Sūkurinė maišyklė (Vortex tipo)
- CFX96™ tikro laiko PGR aptikimo sistema (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx sistema (Bio-Rad)
- Optical Flat 8-Cap Strips (kat. nr. TCS0803, Bio-Rad)
- Low-Profile 0.2 mL 8-Tube Strips without Caps (balti, kat. nr. TLS0851, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white (kat. Nr. HSP9655, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white, barcoded (kat. nr. HSP9955, Bio-Rad)
- Kamštelių atsukimo / užsukimo sistema (kat. nr. 6600532-01, Hamilton)
- Permanent Clear Heat Seal (kat. nr. 1814035, Bio-Rad)*
- PX1 PCR plate sealer (automatinis užlydymo prietaisas, kat. nr. 181-4000, Bio-Rad)*
- Švarus darbatalis

* Užtikrinkite, kad su aukščiau minimu užlydymo prietaisu būtų naudojamos aukščiau minimos plėvelės.

PROTOKOLAS**1. Mėginių paėmimas, laikymas ir transportavimas**

Pastaba. Su visais mėginiais elkitės kaip su potencialiai infekcinėmis medžiagomis. Leidžiama naudoti tik tuos mėginius, kurie buvo paimti, transportuojami ir sandėliuojami griežtai laikantis žemiau pateikiamų taisyklių ir instrukcijų.

Skystos terpės citologiniai mėginiai**Gimdos kaklelio nuograndų mėginiai**

Pastaba. Aukštos mėginių kokybės užtikrinimui, paimti mėginiai turi būti kuo greičiau transportuojami ištyrimui. Mėginiai turi būti transportuojami nurodytomis temperatūros sąlygomis.

A. Mėginių paėmimas**Skystos terpės citologiniai mėginiai**

- Laikykitės gamintojo pateiktų instrukcijų dėl gimdos kaklelio ląstelių mėginių paėmimo ir talpinimo į ThinPrep® (HOLOGIC, JAV), SurePath™ (Becton-Dickinson, JAV) ar CellPreserv (Kolplast, Brazilija) terpę.

Gimdos kaklelio nuograndų mėginiai

Gimdos kaklelio mėginio paėmimui naudokite šias medžiagas:

- Gimdos kaklelio mėginiai gali būti paimami ir transportuojami šiose terpėse:
 - eNAT™ (COPAN, Italia)

Gimdos kaklelio mėginio paėmimo rinkinys	Gamintojas	Kat. nr.
ENAT PM 2ML L-SHAPE APPLICATOR	COPAN	606CS01L

- Tamponėlį palikite transportavimo terpėje. Uždarykite ir pažymėkite mėginio konteinerį. Griežtai laikykitės pateikiamų laikymo ir transportavimo instrukcijų.
- Prašome laikytis rekomenduojamo protokolo paimant kolonines ir plokščiojo epitelio ląsteles po gimdos kaklelio gleivių pašalinimo.

B. Mėginių laikymas ir transportavimas

Laikymas ir transportavimas				
Mėginys	Terpė	Temp.	Trukmė*	Pastaba
Gimdos kaklelio mėginys	eNAT™			- Veiksmingumą gali įtakoti prailgintas mėginių sandėliavimo laikas. - Būtina laikytis vietinių ir valstybinių reikalavimų dėl patogeninių medžiagų transportavimo.
Skystos terpės citologiniai mėginiai	ThinPrep®	2~8°C** ir kambario temperatūra**	90 dienų	
	SurePath™			
	CellPreserv			

* Trukmė: laikas nuo mėginio paėmimo, įskaitant mėginio sandėliavimą ir transportavimą iki ištyrimo.

** Optimali transportavimo temperatūra yra 2~25°C.

2. Nukleino rūgščių ekstrakcija

Įvairūs gamintojai siūlo skirtingus nukleino rūgščių ekstrakcijos rinkinius. Naudokite tinkamą mėginio kiekį, laikydamiesi pateikto protokolo. Žemiau yra pateikiami ekstrakcijos rinkiniai, patvirtinti naudojimui su šiuo rinkiniu.

A. Išankstinis skystos terpės citologinių mėginių apdorojimas

- Leiskite mėginiams pasiekti kambario temperatūrą (19~25°C).
- 15 minučių centrifuguokite 1 ml skystos terpės citologinio mėginio prie 15,000 x g (13,000 aps./min.).
- Supernatantą išpilkite. Vėliau rekomenduojamas tūris (200~450 µl, žr. rekomenduojamą tūrį 2-C, D) turi būti resuspenduojamas 1X PBS vorteksuojant, kad turinys visiškai ištirptų.

Pastaba. Išankstinio apdorojimo etapą atlikite naudojant ekstrakcijos rinkinyje esantį lizuojantį buferį, o ne 1X PBS, jei mėginiai yra surinkti į SurePath™ terpę ir bus tiriami su Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ar Seegene STARlet.

Pastaba. Naudojant Thinprep® ir SurePath™ terpę, išankstinis apdorojimas nėra būtinas, jei mėginiai bus tiriami su Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ar Seegene STARlet.

Pastaba. CellPreserv terpei nereikalingas išankstinio apdorojimo etapas.

Pastaba. SurePath™ ir CellPreserv terpės nėra patvirtintos naudojimui su STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C rinkiniu.

Pastaba. CellPreserv terpė nėra patvirtinta naudojimui su STARMag 96 ProPrep C (Plate Type) ir STARMag 96 ProPrep C (Tube Type).

- Laikykitės gamintojo pateikiamo protokolo.

B. Gimdos kaklelio nuograndų mėginiai

- Leiskite mėginiams pasiekti kambario temperatūrą (19~25°C).
- Tamponėlis, esantis transportavimo terpėje turi būti gerai išmaišomas vorteksuojant.
- Norint išvengti užterštumo, mėgintuvėlių kamšteliai turi būti atidaromi labai atsargiai. Mėginyje esantis gleivių perteklius turi būti pašalinamas, jį surenkant ant tampono. Bet kokios likusios gleivės turi būti pašalintos spaudžiant tamponą į mėgintuvėlio sienelę. Galiausiai, tamponas ir gleivės turi būti atitinkamai išmetami.
- ENAT mėginiai gali būti apdorojami tiesiogiai iš jų pirminio konteinerio.

C. Rankinio paruošimo nukleino rūgščių ekstrakcijos rinkiniai

Pastaba. Prašome naudoti žemiau nurodytus mėginių ir eliacijos tūrius. Kita informacija yra pateikta gamintojo tiekiamame protokole.

Ekstrakcijos rinkinys	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
QIAamp® DNA Mini Kit*	QIAGEN	51304	Mėginys: 200 µl Eliucija: 50 µl
Ribo_spin vRD** (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	GeneAll	302-150 SG1701***	Mėginys: 200 µl Eliucija: 50 µl

* Lizavimo etapą atlikite naudodami 180 µl ATL buferio vietoje AL buferio, jei yra naudojama SurePath™ terpė.

**Ribo_spin vRD rinkinys nėra suderinamas su SurePath™ terpe.

***Jei norite pirkti aukščiau paminėtus Seegene, Inc. produktus, prašome naudoti nurodytus katalogo numerius.

D. Automatinės ekstrakcijos sistemos

Pastaba. Prašome naudoti žemiau nurodytus mėginių ir eliacijos tūrius. Kita informacija yra pateikta gamintojo tiekiamame protokole.

D-1. Microlab NIMBUS IVD

Pastaba. Skaitykite Microlab NIMBUS IVD naudotojo vadovą.

Automatinės ekstrakcijos sistemos	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4.UC384	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit**	Seegene	EX00013C	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl

* Jei norite pirkti aukščiau paminėtus Seegene, Inc. produktus, prašome naudoti nurodytus katalogo numerius.

**SurePath™ ir CellPreserv terpės nėra patvirtintos naudojimui su STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C rinkiniu.

D-2. Microlab STARlet IVD

Parinktis: preanalitinė sistema (skaitykite kamštelių atsukimo / užsukimo sistemos naudotojo vadovą).

Automatinė preanalitinė sistema	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
Kamštelių atsukimo / užsukimo sistema	Hamilton	6600532-01*	-

* Jei norite pirkti aukščiau paminėtus Seegene, Inc. produktus, prašome naudoti nurodytus katalogo numerius.

Pastaba. Skaitykite Microlab STARlet IVD naudotojo vadovą. 

Automatinės ekstrakcijos sistemos	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4.UC384	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit**	Seegene	EX00013C	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl

* Jei norite pirkti aukščiau paminėtus Seegene, Inc. produktus, prašome naudoti nurodytus katalogo numerius.

**SurePath™ ir CellPreserv terpės nėra patvirtintos naudojimui su STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C rinkiniu.

D-3. Seegene NIMBUS

Pastaba. Skaitykite Seegene NIMBUS naudotojo vadovą.

Automatinė ekstrakcijos sistema	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit*	Seegene	EX00013C	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl

*SurePath™ ir CellPreserv terpės nėra patvirtintos naudojimui su STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C rinkiniu.

D-4. Seegene STARlet

Parinktis: preanalitinė sistema (skaitykite kamštelių atsukimo / užsukimo sistemos naudotojo vadovą).

Automatinė preanalitinė sistema	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
Kamštelių atsukimo / užsukimo sistema	Hamilton	6600532-01*	-

*Jei norite pirkti aukščiau paminėtus Seegene, Inc. produktus, prašome naudoti nurodytus katalogo numerius.

Pastaba. Skaitykite Seegene STARlet naudotojo vadovą.

Automatinė ekstrakcijos sistema	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	Seegene	744300.4. UC384	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit*	Seegene	EX00013C	Mėginys: 300 µl Eliucija: 100 µl

*SurePath™ ir CellPreserv terpės nėra patvirtintos naudojimui su STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C rinkiniu.

D-5. SEEPREP12™

Automatinės ekstrakcijos sistemos	Gamintojas	Kat. nr.	Rekomenduojamas tūris
SEEPREP12™	DiaSorin	SPN1200*	-
SEEPREP12™ Viral NA Kit**	DiaSorin	SPN1004*	Mėginys: 240 µl Eliucija: 60 µl

*Jei norite pirkti aukščiau paminėtus Seegene, Inc. produktus, prašome naudoti nurodytus katalogo numerius.

** Šiame rinkinyje nėra proteinazės K (20mg/ml).

- Į kiekvieną 1,5 ml mėginio mėgintuvėlį dozuokite 10 µl proteinazės K (20 mg/ml; įsigyjama atskirai).
- 240 µl mėginio perneškite į mėgintuvėlį su 10 µl proteinazės K, švelniai tapšnodami išmaišykite mėgintuvėlio turinį.
- Kasetė ir uždėti pompos antgaliai yra įdėti į instrumentą.
- Į instrumentą įdėkite 1,5 ml eliucijos mėgintuvėlį.
- Pirmajame lange paspauskite „**CONTINUE**“ (tęsti) – instrumentas inicijuos procesą.
- Pagrindiniame SEEPREP12™ meniu paspauskite „**START PROTOCOL**“ (vykdyti protokolą).
- „**Select protocol**“ (protokolo pasirinkimo) meniu paspauskite „SPN Viral NA-HT v.2.0“.
- „**Select sample volume**“ (mėginio tūrio pasirinkimo) meniu paspauskite „**250 µL**“, o „**Select elution volume**“ (eliucijos tūrio pasirinkimo) meniu paspauskite „**60 µL**“.
- Laikykitės ekrane pateikiamų instrukcijų dėl instrumento įkrovimo.
- Baigę visus etapus, uždarykite dureles ir pradėkite tyrimą.

D-6. NucliSENS® easyMAG®

- Ekstrakcijos procesą atlikite naudodami „generic protocol“.

Automatinė ekstrakcijos sistema	Gamintojas	REF	Rekomenduojamas tūris
NucliSENS® easyMAG®	bioMérieux	200111	Mėginys: 200 µl Magnetinės silicio dioksido dalelės: 50 µl Eliucija: 100 µl

D-7. SGprep32

- Ekstrakcijos procesą atlikite naudodami „Uni-Protocol A“.

Automatinė ekstrakcijos sistema	Gamintojas	REF	Rekomenduojamas tūris
SGprep32	hanwoolTPC	SGprep32-180701*	-
STARMag 96 Uniplate	Seegene	EX00003P	Mėginys: 200 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 UniTube	Seegene	EX00004P	Mėginys: 200 µl Eliucija: 100 µl

*Perkant produktus iš Seegene Inc., pateikite aukščiau nurodytus katalogo numerius.

D-8. SEEPREP32

- Ekstrakcijos procesą atlikite naudodami „Uni-Protocol A“.

Automatinė ekstrakcijos sistema	Gamintojas	REF	Rekomenduojamas tūris
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	Seegene	EX00009P	Mėginys: 200 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	Seegene	EX00009T	Mėginys: 200 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)*	Seegene	EX00017P	Mėginys: 200 µl Eliucija: 100 µl
STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)*	Seegene	EX00017T	Mėginys: 200 µl Eliucija: 100 µl

*CellPreserv terpė nėra patvirtinta naudojimui su STARMag 96 ProPrep C (Plate Type) ir STARMag 96 ProPrep C (Tube Type).

E. Santrauka

Ekstrakcijos metodas	Mėginio paėmimo priemonė
Microlab NIMBUS IVD / Microlab STARlet IVD / Seegene NIMBUS / Seegene STARlet	ENAT, ThinPrep®, SurePath™ 1,2, CellPreserv 1
SEEPREP12™ 3	ENAT, ThinPrep®, SurePath™
NucliSENS® easyMAG® 4	ENAT, ThinPrep®, CellPreserv
QIAamp® DNA Mini Kit	ENAT, ThinPrep®, SurePath™ 5, CellPreserv
Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	ENAT, ThinPrep®, CellPreserv
SGprep32	ENAT, ThinPrep®, CellPreserv
SEEPREP32	ENAT, ThinPrep®, CellPreserv 6

1. SurePath™ ir CellPreserv terpės nėra patvirtintos naudojimui su STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C rinkiniu.

2. Jei DNR yra išskiriama iš SurePath™ mėginių su Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ar Seegene STARlet, jautrumas gali būti mažesnis, lyginant su kitais ekstrakcijos metodais.

3. SEEPREP12™ Viral NA rinkinys

4. NucliSENS® easyMAG sistema

5. Lizavimo etapą atlikite naudodami 180 µl ATL buferio vietoje AL buferio, jei yra naudojama SurePath™ terpė.

6. CellPreserv terpė nėra patvirtinta naudojimui su STARMag 96 ProPrep C (Plate Type) ir STARMag 96 ProPrep C (Tube Type).

* Parinktis: su Microlab STARlet IVD ir Seegene STARlet galima naudoti kamštelių atsukimo / užsukimo sistemą.

3. Pasiruošimas tikro laiko PGR

Pastaba. Naudojant Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ar Seegene STARlet, skaitykite atitinkamą naudotojo vadovą.

Pastaba. Naudokite tinkamus mėgintuvėlius ir kamštelius (skaitykite skyrių REIKALINGOS NETEIKIAMOS MEDŽIAGOS).

Pastaba. Ruošiant mėginius, būtina naudoti aerzoliams atsparius filtrų antgalius ir dėvėti pirštines. Imkitės ypatingų atsargumo priemonių, kad užkirstumėte kelią kryžminiam užterštumui.

Pastaba. Visus reagentus pilnai atšildykite laikydami juos ant ledo.

Pastaba. Trumpai centrifuguokite reagentų mėgintuvėlius, kad pasišalintų lašeliai, esantys vidinėje kamštelio pusėje.

Pastaba. A~D etapai yra automatiškai atliekami Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ir Seegene STARlet. Skaitykite atitinkamo instrumento naudotojo vadovą.

A. Pasiruoškite pagrindinį PGR mišinį (Mastermix).

5 µl	4X HPV HR TOM
5 µl	EM1
5 µl	Vanduo be RN-azių
15 µl	Bendras PGR Mastermix tūris

Pastaba. Kiekvieno reikiamo reagento bendrą tūrį apskaičiuokite remdamiesi reakcijų (įskaitant mėginius ir kontroles) skaičiumi.

B. Trumpai išmaišykite sūkurinėje purtyklėje ar pavartykite 5 kartus ir trumpai centrifuguokite.
C. Į PGR mėgintuvėlius reakcijos Mastermix mišinį išpilstykite 15 µl alikvotomis.
D. Į kiekvieną mėgintuvėlį su PGR Mastermix mišiniu dozuokite 5 µl mėginio nukleino rūgščių.

15 µl	PGR Mastermix (pagrindinis reakcijos mišinys)
5 µl	mėginio nukleino rūgštys
20 µl	Bendras reakcijos tūris

Pastaba. Kiekvienam mėginiui naudokite naują sterilių pipetės antgalį.

Pastaba. Neigiamai kontrolei (NC), vietoje mėginio nukleino rūgščių naudokite 5 µl vandens be RN-azių.

Pastaba. Teigiamai kontrolei (PC) naudokite 5 µl HPV HR PC1, PC2 ir PC3.

Pastaba. Būkite atidūs ir neužterškite pagrindinio reakcijos mišinio bei mėginių teigiama kontrole.

Pastaba. Nežymėkite reakcijos mėgintuvėlių kamštelių, kadangi fluorescencija yra nuskaityta per kamštelių.

● Teigiamą kontrolę

Rinkinyje yra trys teigiamos kontrolės mėgintuvėliai; HPV HR PC1, PC2 ir PC3.

Kiekvienoje TK yra klonai, skirti 5 taikiniams.

Pastaba. Teigiamos kontrolės reakcijos atlikimui, paruoškite tris PGR mėgintuvėlius.

Rezultatai pateikti žemiau.

Teigiama kontrolė

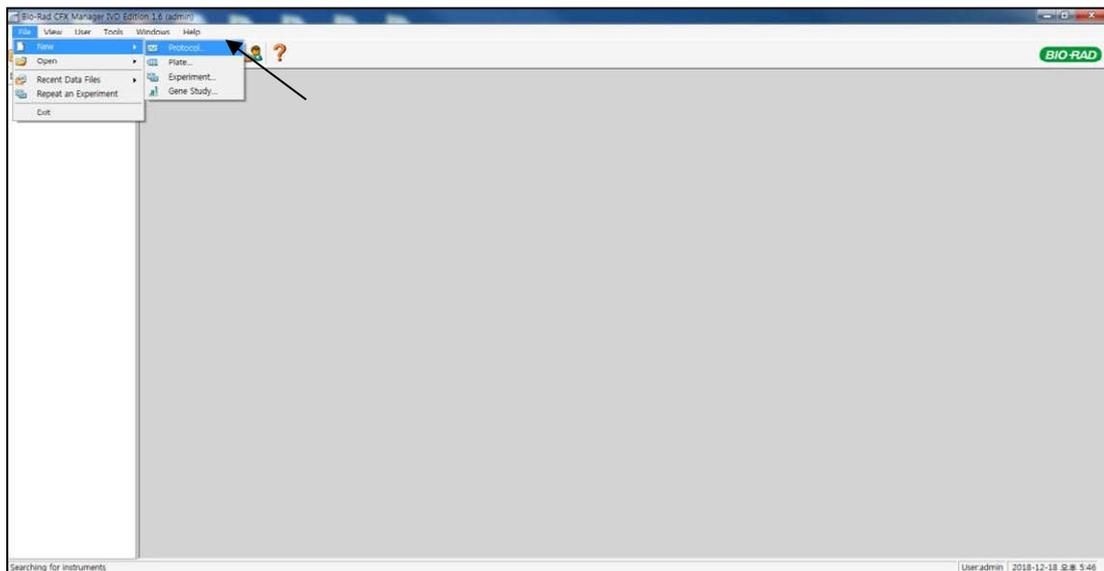
Pavadinimas	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670			Quasar 705			Automatinė interpretacija
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC (VK)	35	18	56	68	31	
PC1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Teigiama kontrolė (+)
PC2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Teigiama kontrolė (+)
PC3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Teigiama kontrolė (+)

TIKRO LAIKO PGR INSTRUMENTO SĄRANKA IR REZULTATŲ ANALIZĖ**1. CFX96™ tikro laiko PGR sistema (CFX Manager™, programinė įranga - IVD v1.6)****1.1. Tikro laiko PGR instrumento sąranka**

Pastaba. CFX96™ tikro laiko PGR aptikimo sistemos (Bio-Rad) tyrimo sąranka yra skirstoma į tris etapus: protokolo sąranką, plokštelės sąranką ir tyrimo vykdymą.

A. Protokolo sąranka

1) Pagrindiniame meniu pasirinkite „**File**“ (failas) → „**New**“ (naujas) → „**Protocol**“ (protokolas), kad atidarytumėte „**Protocol Editor**“ (protokolo redagavimas).



1 iliustracija. Protokolo sąranka

2) „Protocol Editor” (protokolo redagavimo) lange nustatykite terminį profilį:

i) cyclic-CMTA (trijų pakartojimų lydymosi analizė)

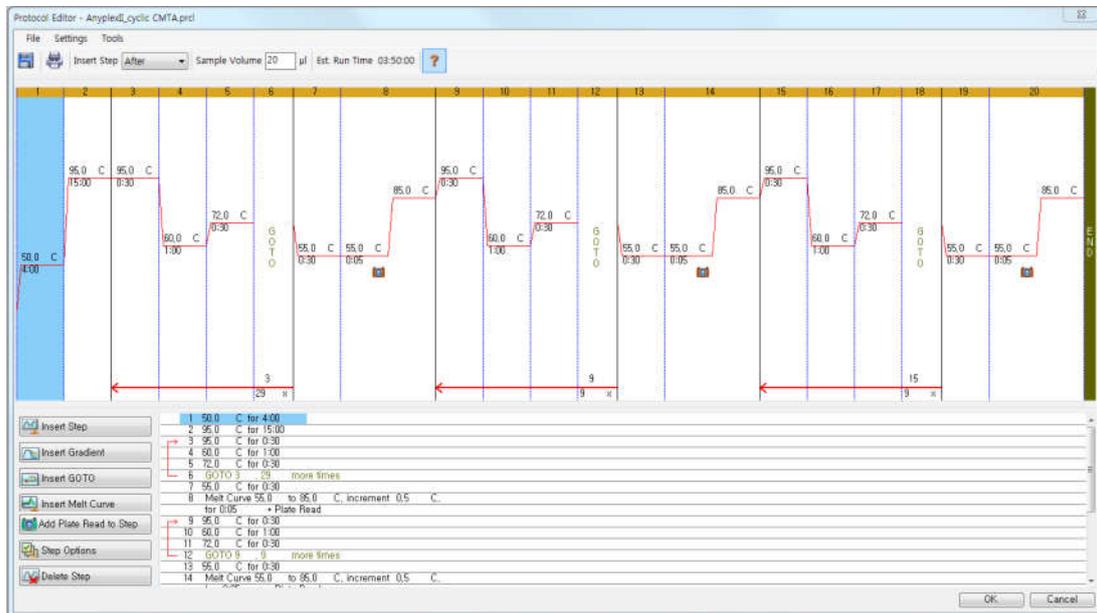
Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 29 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	GOTO 9, 9 more times		
13	55°C	30 sec	
14*	Melting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

***Pastaba. Plokštelė nuskaityama 8, 14 ir 20 etape. Fluorescencija nuskaityama lydymosi etape.**

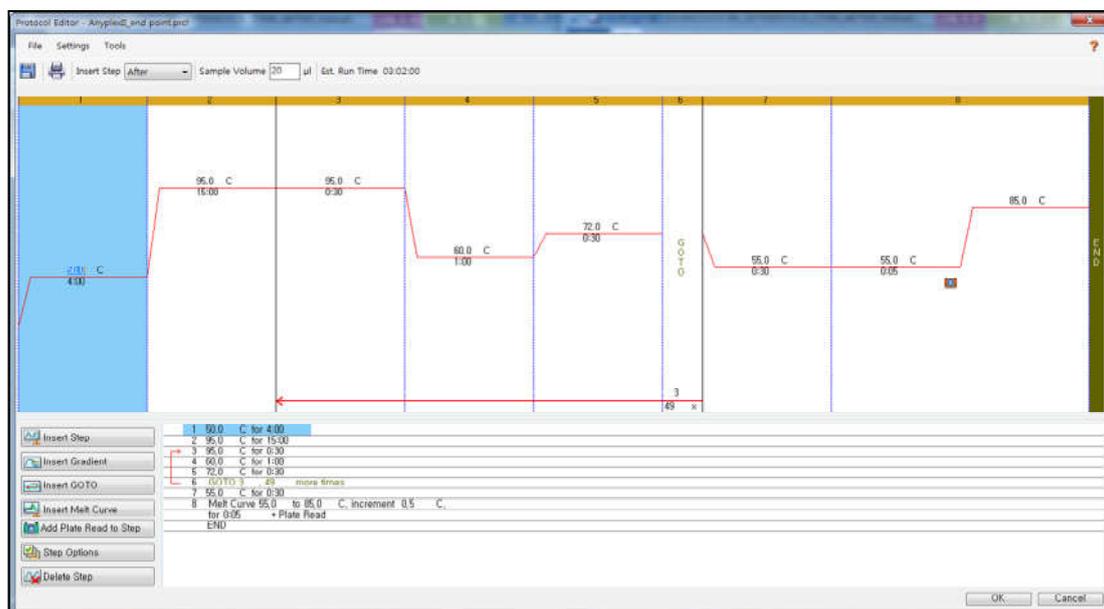
ii) End point-CMTA (vienkartinio lydymosi analizė)

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)		

***Pastaba. Plokštelė nuskaitoma 8 etape.** Fluorescencija nuskaitoma lydymosi etape.



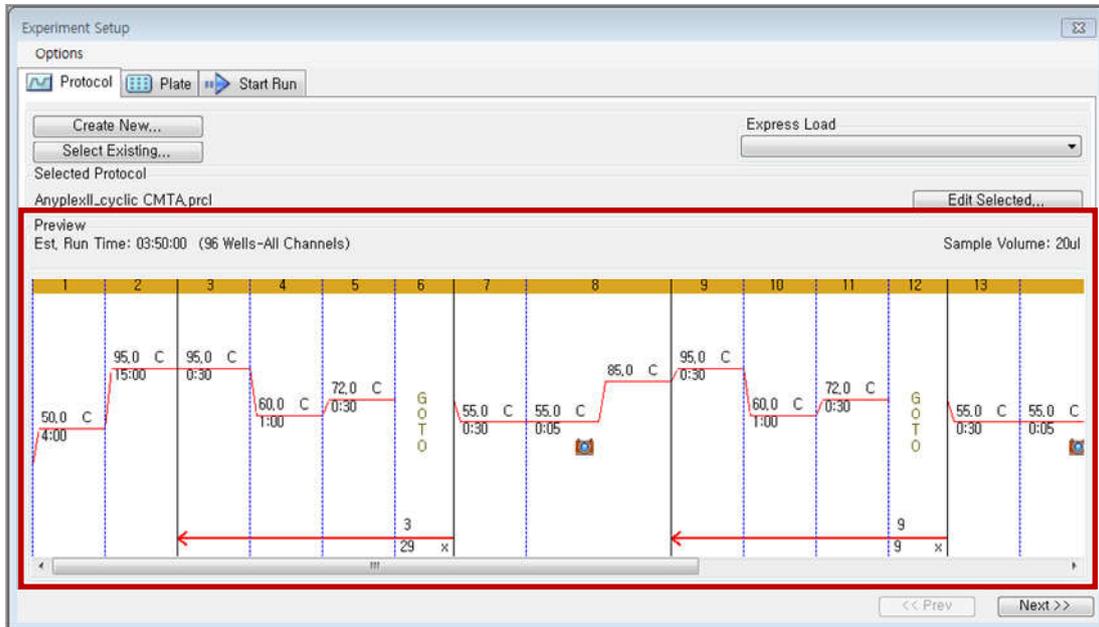
2 iliustracija. „Protocol Editor“ (protokolo redagavimo) langas (ciklinė CMTA).



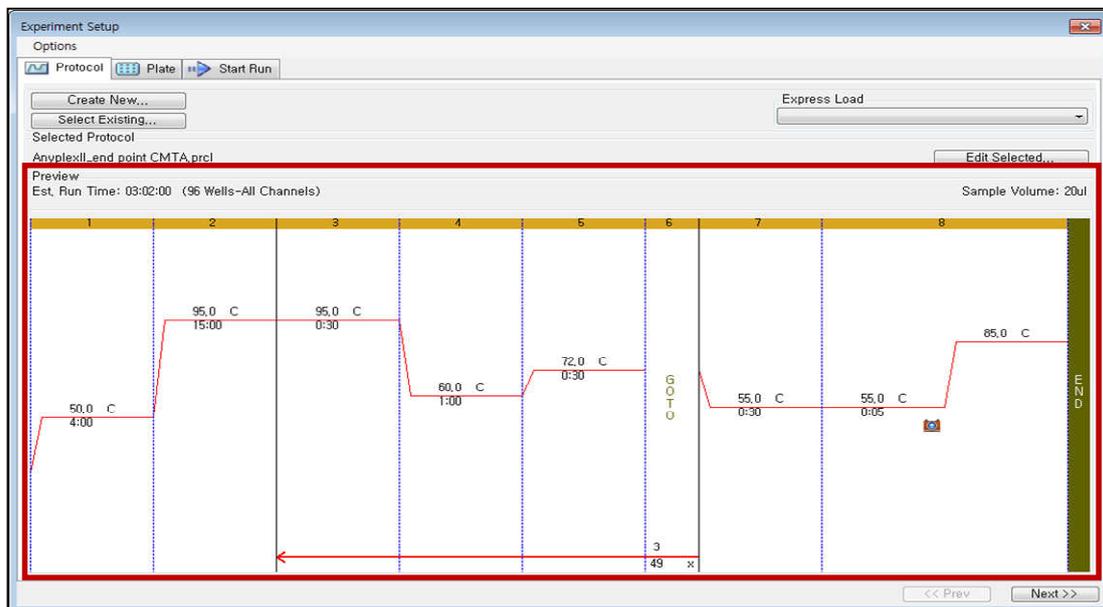
3 iliustracija. „Protocol Editor“ (protokolo redagavimo) langas (galutinio taško CMTA).

- 3) Paspauskite „**Sample Volume**“ (mėginio tūris) ir tiesiogiai įrašykite 20 µl.

4) Paspauskite „OK” ir išsaugokite protokolą. Atsidarys „**Experiment Setup**” (tyrimo sąrankos) langas.



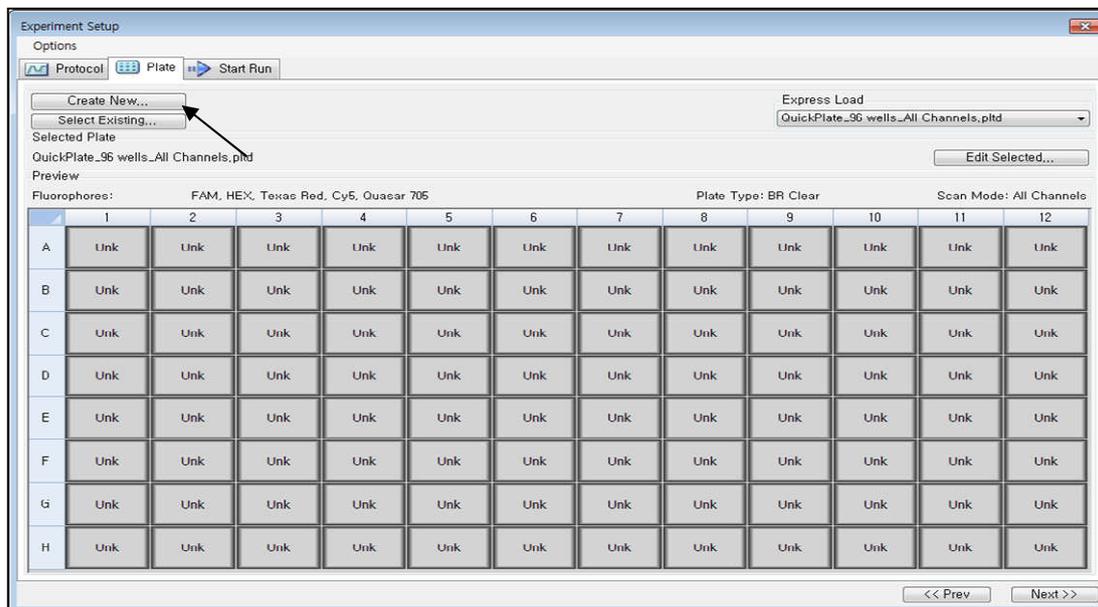
4 iliustracija. „**Experiment Setup Protocol**“ (tyrimo sąrankos protokolas) (ciklinė CMTA).



5 iliustracija. „**Experiment Setup Protocol**“ (tyrimo sąrankos protokolas) (galutinio taško CMTA).

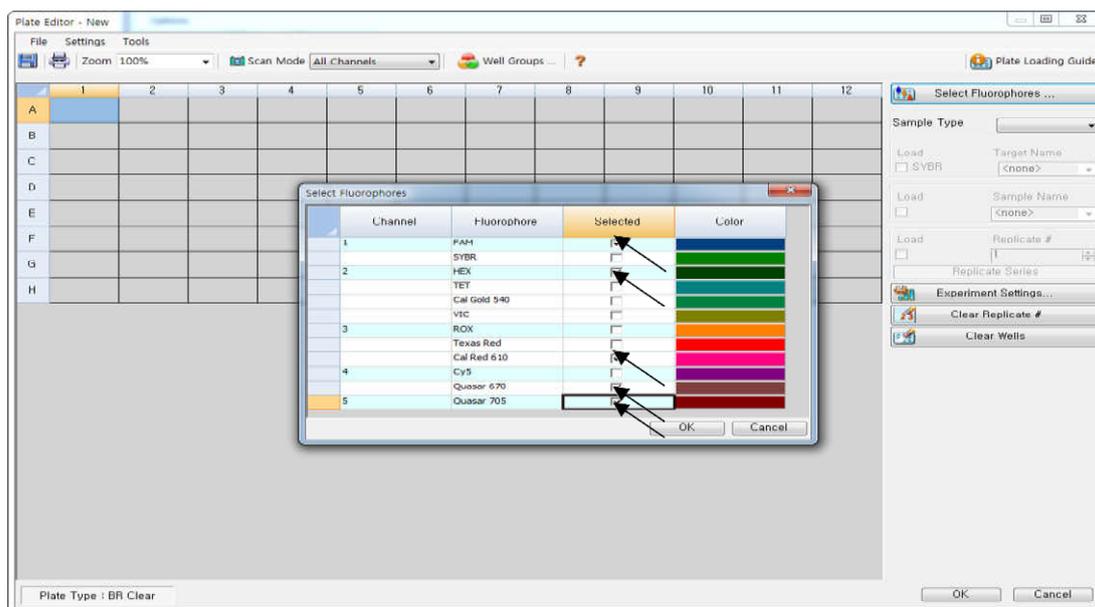
B. Plokštelės sąranka

- 1) „**Experiment Setup**” (tyrimo sąrankos) lango ašelėje „**Plate**” (plokštelė) paspauskite „**Create New**” (kurti naują). Atsidarys „**Plate Editor**” (plokštelės redagavimo) langas.



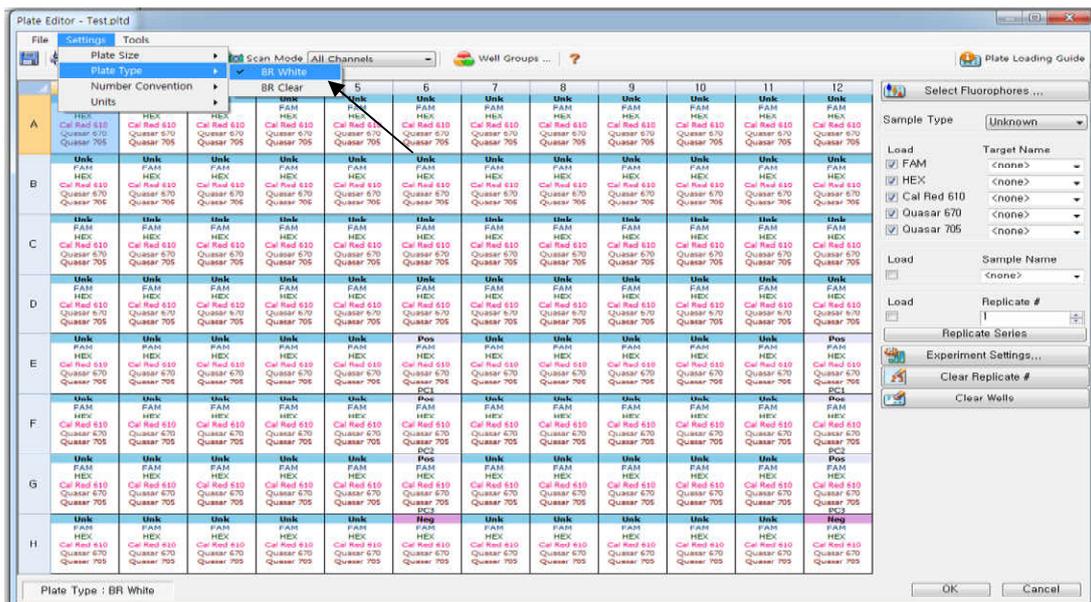
6 iliustracija. „**Plate Editor**“ langas.

- 2) Paspauskite „**Select Fluorophores**” (pasirinkti fluoroforus) ir nurodykite naudojamus fluoroforus (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 ir Quasar 705**), tuomet paspauskite „**OK**”.



7 iliustracija. **Fluoroforų pasirinkimas (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 ir Quasar 705).**

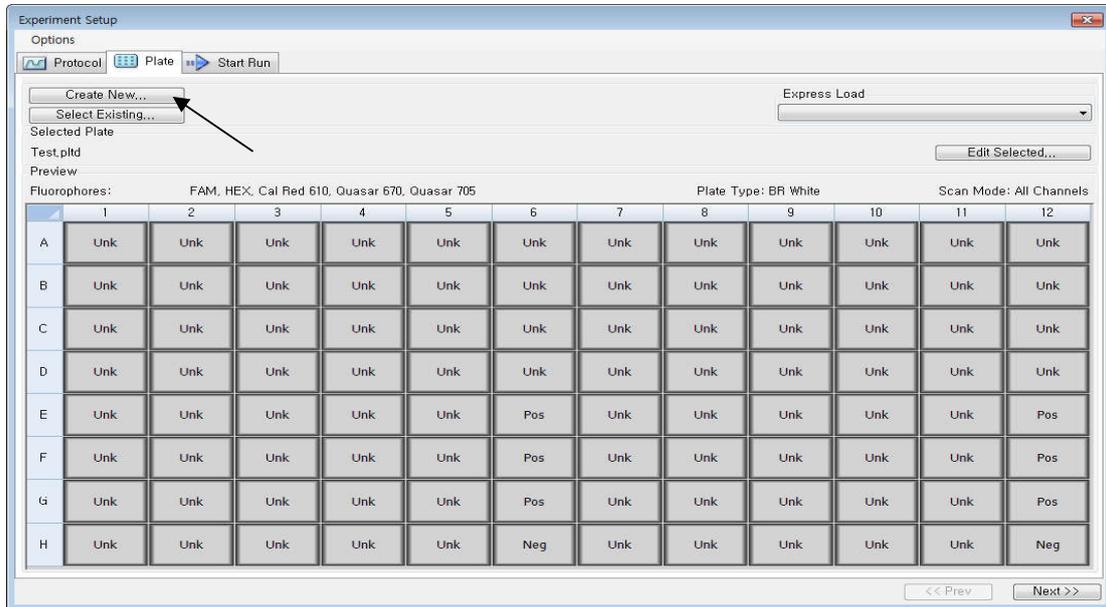
- 3) Pasirinkite atitinkamus šulinėlius ir išsiskleidžiančiame meniu „**Sample Type**” (mėginio tipas) pasirinkite mėginio tipą.
 - **Unknown** (nežinomas): klinikiniai mėginiai.
 - **Negative Control** (neigiama kontrolė)
 - **Positive Control** (teigiama kontrolė)
- 4) Pažymėkite atitinkamus laukelius (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 ir Quasar 705**), nurodant fluoroforus, kurie bus aptinkami pasirinktuose šulinėliuose.
- 5) Į laukelį „**Sample Name**” (mėginio pavadinimas) įrašykite mėginio pavadinimą ir teigiamą kontrolę į laukelį „**PC**” (**PC1, PC2 ir PC3**), tuomet paspauskite klavišą „**Enter**”.
- 6) „**Plate Editor**” (plokštelės redagavimo) lango pagrindinio meniu parinktyje „**Settings**” (nustatymai) pasirinkite „**Plate Size**” (plokštelės dydį) (**96 wells**) ir „**Plate Type**“ (plokštelės tipą) (**BR White**).



8 iliustracija. Plokštelės sąranka.

- 7) Paspaudę „**OK**”, išsaugosite naujos plokštelės sąranką.

8) Atsidarys „**Experiment Setup**” (tyrimo sąrankos) langas.

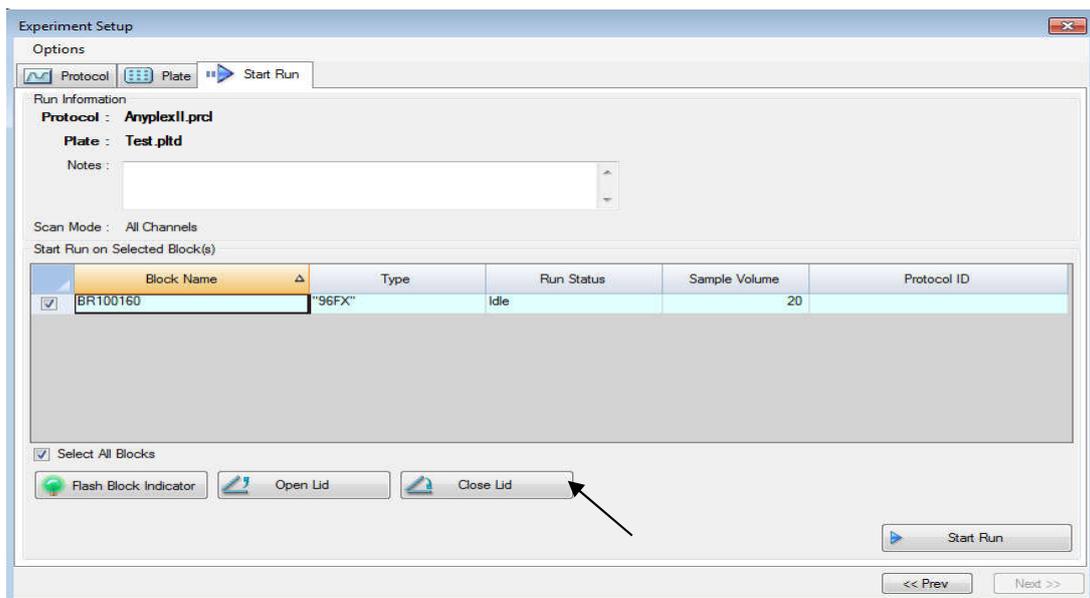


9 iliustracija. Tyrimo sąranka: plokštelė.

9) Paspaudę „**Next**” (toliau), pradėsite tyrimo vykdymą.

C. Tyrimo vykdymas

1) „**Experiment Setup**” (tyrimo sąrankos) lango ašelėje „**Start Run**” (pradėti tyrimo vykdymą) pasirinkite parinktį „**Close Lid**” (uždaryti dangtį). Užsidarys instrumento dangtis.



10 iliustracija. „**Close Lid**” parinktis.

- 2) Pažymėkite naudojamo instrumento žymimąjį laukelį ir paspauskite „**Start Run**“ (pradėti tyrimo vykdymą).
- 3) Vykdymo failą išsaugokite aplanke „My Documents“ ar kitame paskirties aplanke. Įrašykite failo pavadinimą ir paspauskite „**SAVE**“ (išsaugoti). Prasidės tyrimo vykdymas.

1.2. Duomenų analizė

A. Aplanų kūrimas duomenų eksportavimui

A-1. Ciklinė CMTA

- **Naudojant funkciją „Export All Data Sheet to excel“ (visų duomenų eksportavimas į excel programą) (žr. 29 psl.)**

1) Norėdami išsaugoti kiekvieno lydimosi taško duomenis iš rezultatų failo, sukurkite tris aplanus: 8 etapo lydimosi taško duomenų saugojimo aplanke pavadinimas yra „1“, 14 etapo duomenų aplanke pavadinimas yra „2“ ir 20 etapo duomenų aplanke pavadinimas yra „3“.

- **Naudojant funkciją „Seegene Export“ (Seegene eksportavimas) (žr. 33 psl.)**

1) Norėdami išsaugoti visų lydimosi kreivės aptikimo etapų duomenis iš rezultatų failo, sukurkite vieną aplaną.

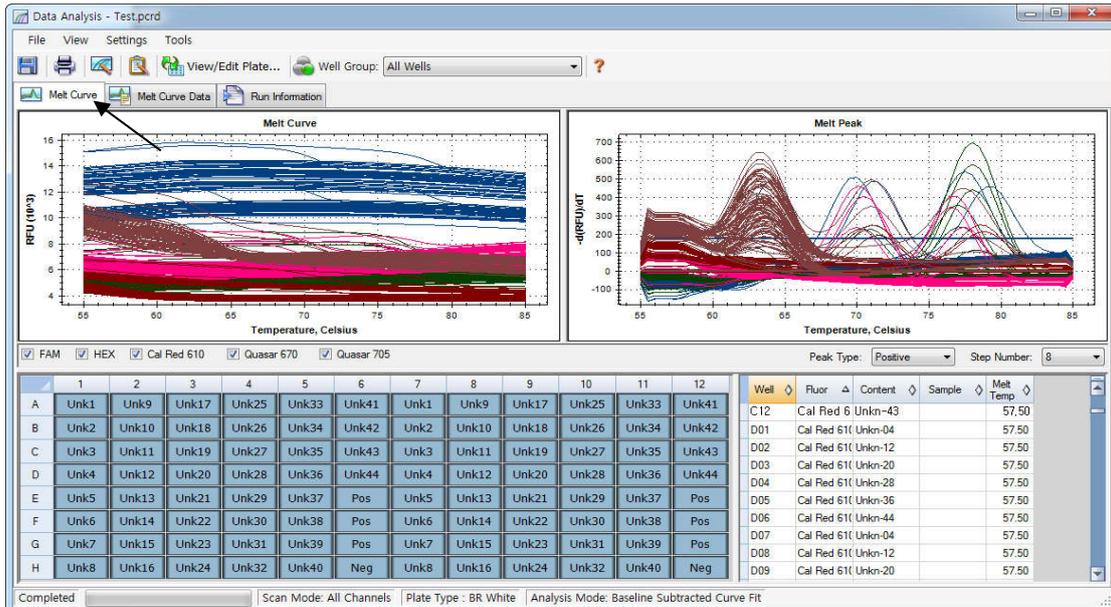
2) Naudotojas gali sukurti aplanke pavadinimą (naudojant „Seegene Export“ funkciją, aplanke pavadinimai „MeltSep8“, „MeltStep14“ ir „MeltStep20“ yra sukurti automatiškai kiekvienos amplifikacijos kreivės duomenų išsaugojimui naudotojo sukurtame aplanke).

A-2. Galutinio taško CMTA

- 1) Norėdami išsaugoti lydimosi taško duomenis iš rezultatų failo, sukurkite vieną aplaną.
- 2) Aplanke pavadinimą sukuria naudotojas.

B. Išankstiniai duomenų analizės nustatymai CFX Manager™
B-1. Naudojant funkciją „Export All Data Sheet to excel“ (visų duomenų eksportavimas į excel programą)

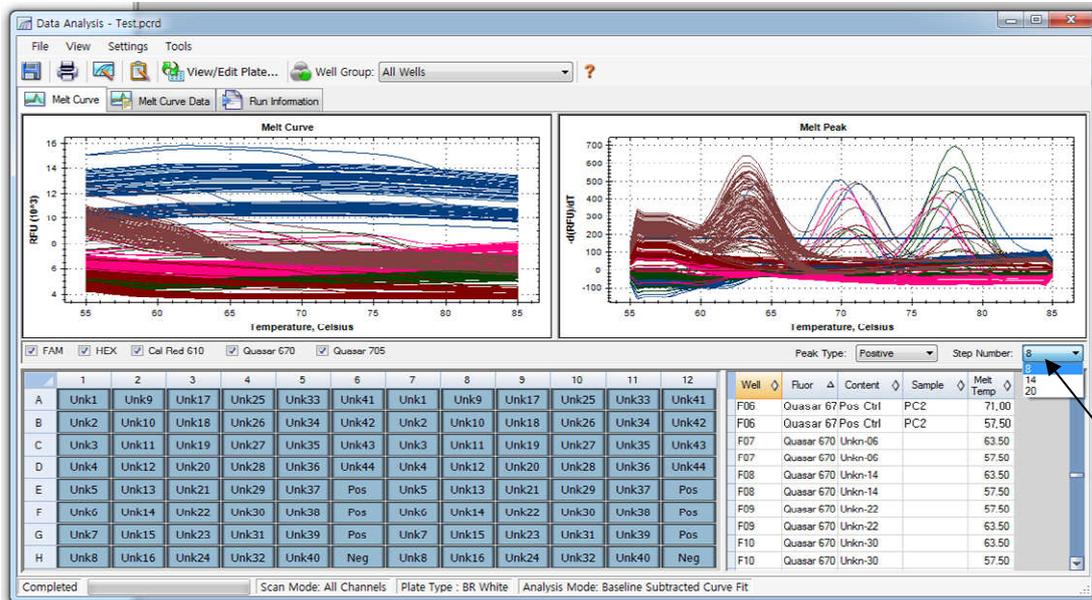
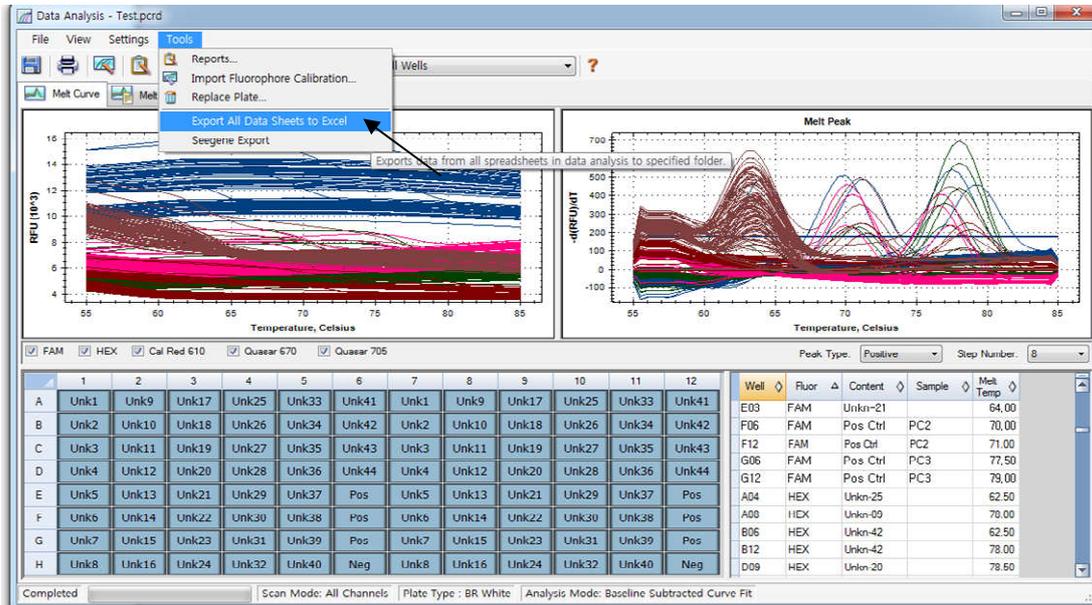
1) Po tyrimo, paspauskite „Melt curve“ (lydymosi kreivės) sąselę, kad patvirtintumėte „Melt Peaks“ (lydymosi pikų) rezultatus.



11 iliustracija. Lydymosi piko rezultatai.

2) Pasirinkite „**Step number “8”**“ (etapą nr. 8) ir „**Tools**“ (įrankių) meniu pasirinkite „**Export All Data Sheets to Excel**“ (visų duomenų eksportavimas į excel programą).

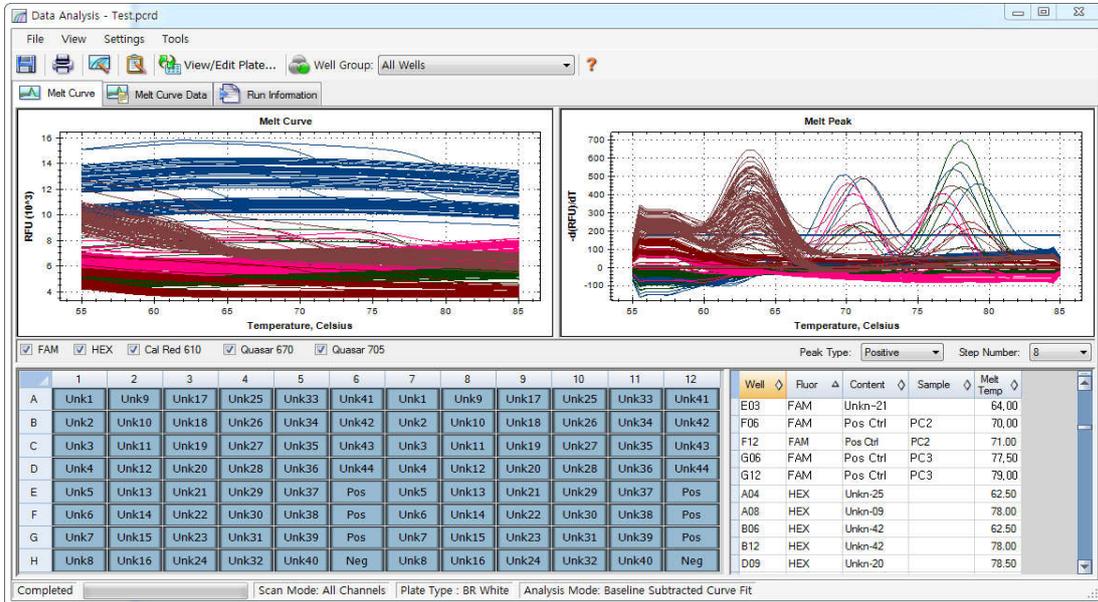
Pastaba. Funkcija „**Export All Data Sheets to Excel**“ (visų duomenų eksportavimas į excel programą) yra tiesiogiai pasirenkama tik galutinio taško CMTA atveju.



12 iliustracija. Visų duomenų eksportavimas į excel programą.

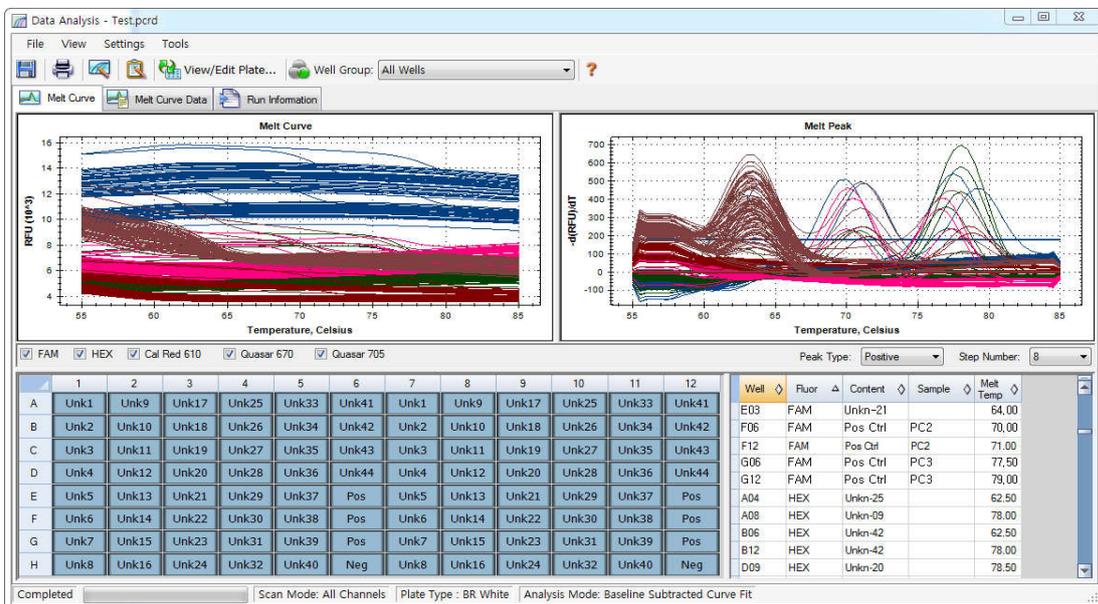
3) Rezultatą išsaugokite aplanke „1“.

Pastaba. Galutinio taško CMTA atveju, rezultatai gali būti išsaugomi bet kuriame aplanke.



3 iliustracija. Visų duomenų eksportavimas iš duomenų analizės skaičiuoklių į priskirtąjį aplanką.

4) Įsitinkinkite, kad rezultatas buvo išsaugotas aplanke „1“.



14 iliustracija. Eksportuotų rezultatų failai.

Pastaba. Galutinio taško CMTA atveju praleiskite 5)~7) etapus.

- 5) Grįžkite į 2) etapą ir pasirinkite „**Step number “14”** (etapas nr. 14). Pakartokite 3) ir 4) etapus ir duomenis išsaugokite „**2**“ aplanke.
- 6) Grįžkite į 2) etapą ir pasirinkite „**Step number “20”** (etapas nr. 20).
- 7) Pakartokite 3) ir 4) etapus ir duomenis išsaugokite „**3**“ aplanke. Kiekvieno etapo numerio duomenys yra išsaugomi taip, kaip pateikiama žemiau.

Etapo numeris	Paskirties aplankas
8	1
14	2
20	3

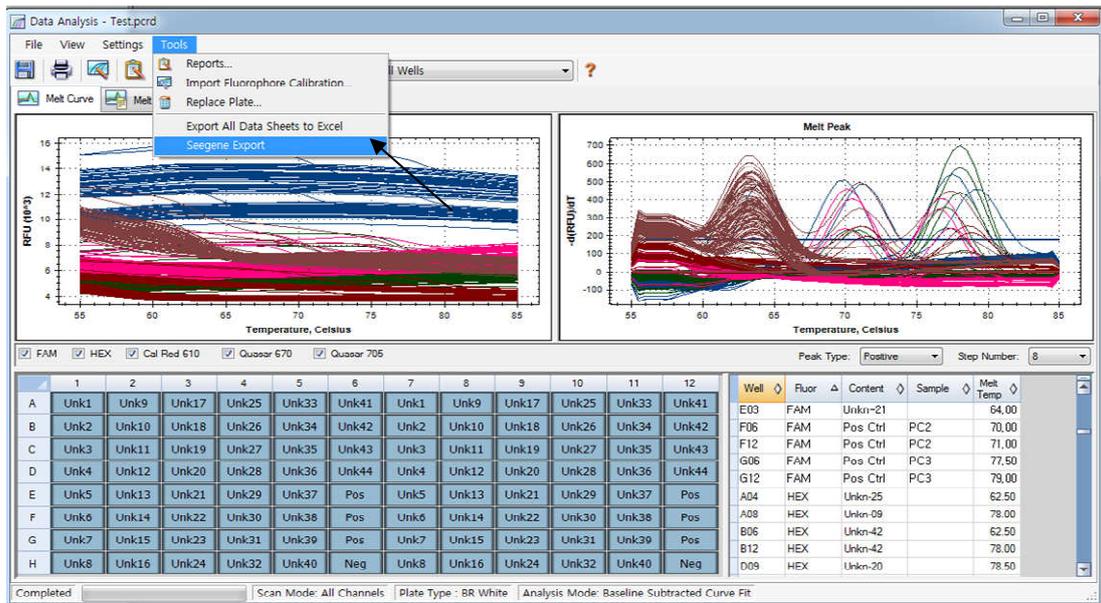
B-2. Naudojant funkciją „Seegene Export“ (Seegene eksportavimas)

- Po tyrimo, paspauskite „Melt curve“ (lydymosi kreivės) ašelę, kad patvirtintumėte „Melt Peaks“ (lydymosi piko) rezultatus.



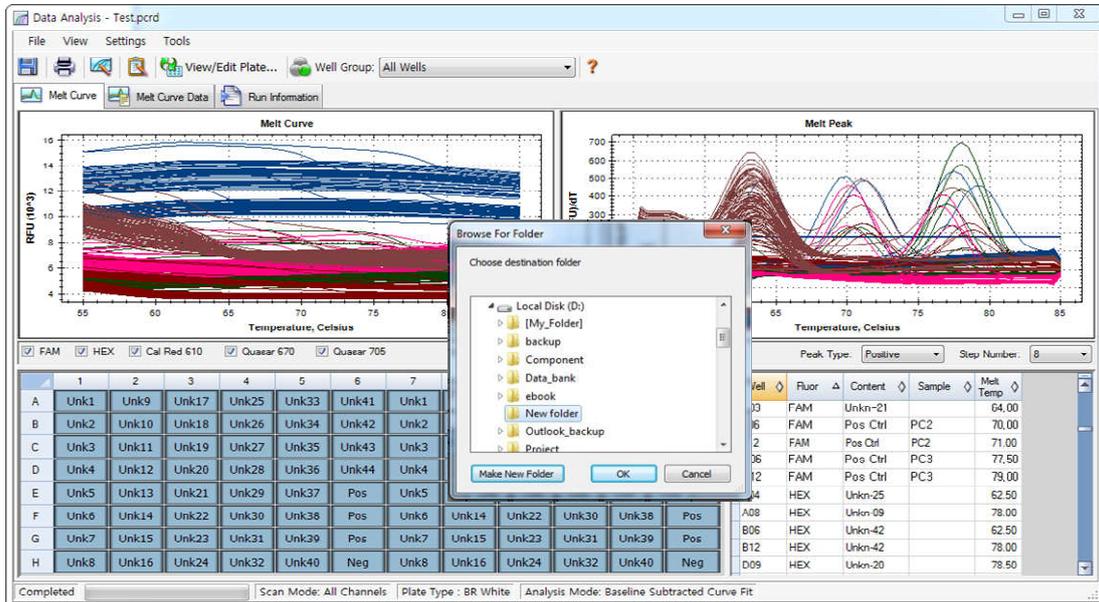
15 iliustracija. Lydymosi piku rezultatai.

- „Tools“ (įrankių) meniu pasirinkite „Seegene Export“ (Seegene eksportavimas).



16 iliustracija. „Seegene Export“ parinktis.

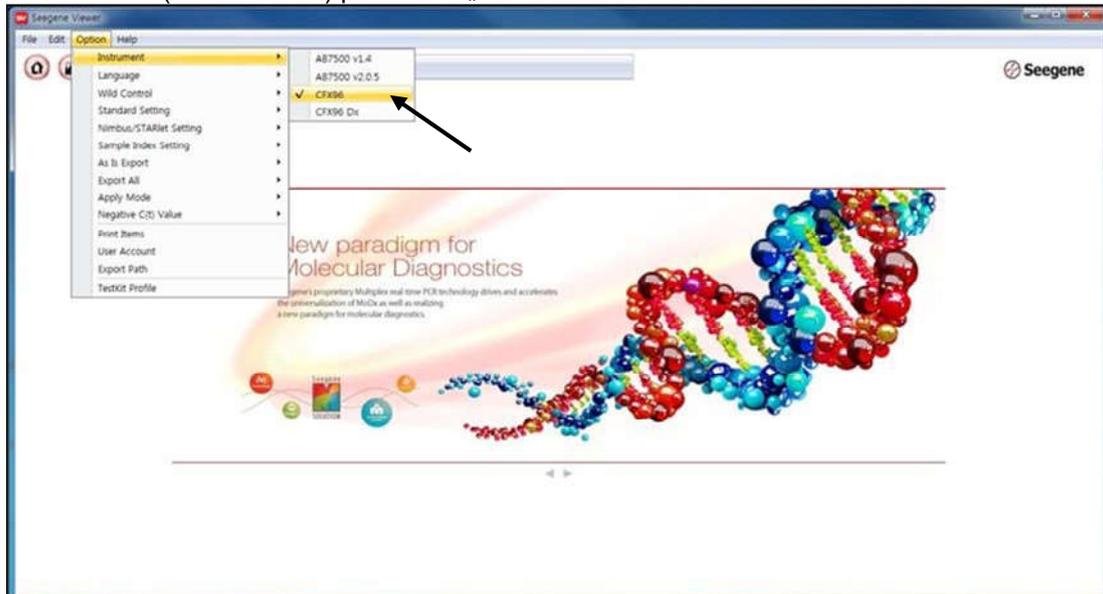
3) Pasirinkite duomenų išsaugojimo paskirties vietą ir paspauskite „OK“.



17 iliustracija. Duomenų eksportavimas į pasirinktą aplanką.

C. Seegene Viewer duomenų analizės nustatymai

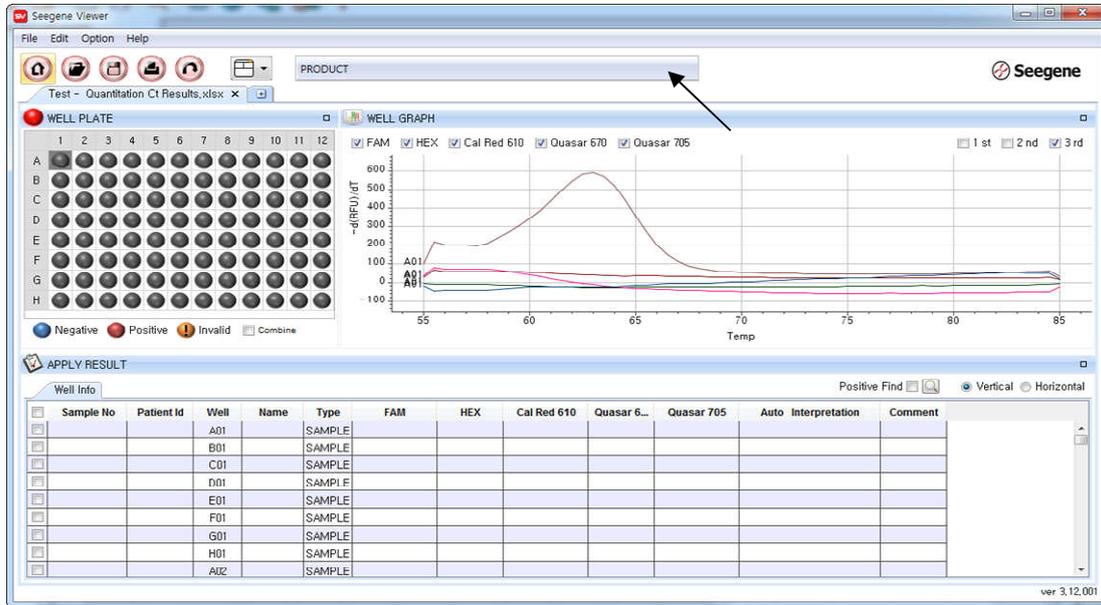
1) Atidarykite Seegene Viewer programą, paspauskite „Option“ (parinktis) ir parinktyje „Instrument“ (instrumentas) pasirinkite „CFX96 Dx“.



18 iliustracija. Seegene Viewer.

2) Paspauskite **“Open”** (atverti), aplanke „1“ ar „MeltStep8“ raskite išsaugotą failą, atidarykite rezultatų failą ir **“PRODUCT”** (produktas) meniu pasirinkite tyrimo rinkinį.

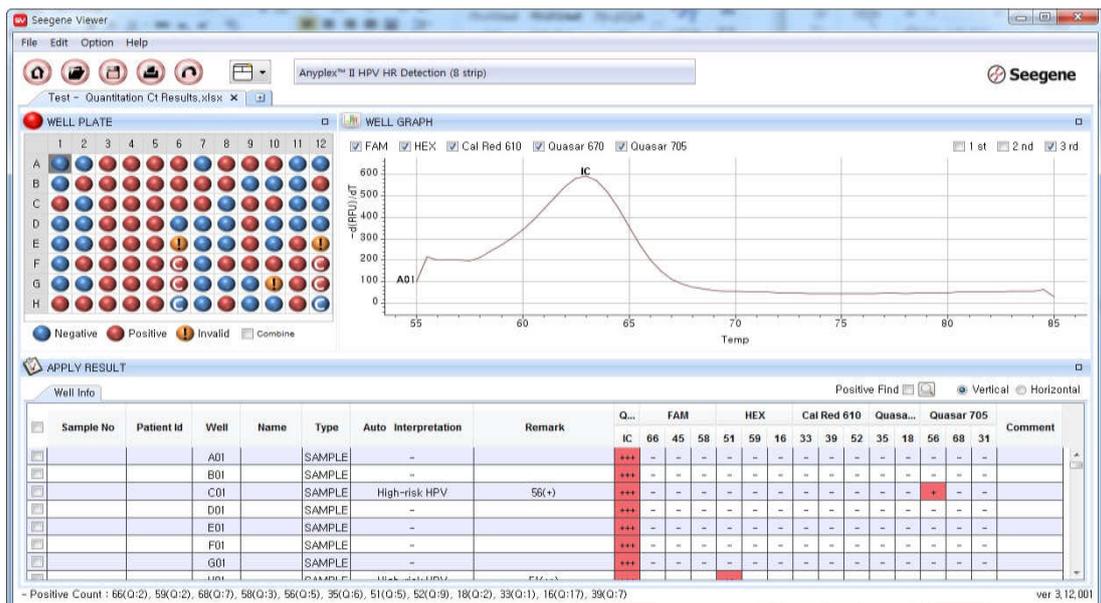
Pastaba. Galutinio taško CMTA atveju išsaugotų duomenų ieškokite sutartinai sukurtame aplankale.



19 iliustracija. Seegene Viewer duomenų analizės nustatymai

Pastaba. Rinkdamiesi tyrimų rinkinį, patvirtinkite mėgintuvėlio tipą (8 strip / 96 plate / 96 film).

3) Patikrinkite kiekvieno šulinėlio rezultatą.



20 iliustracija. Tyrimo rezultatai Seegene Viewer programoje.

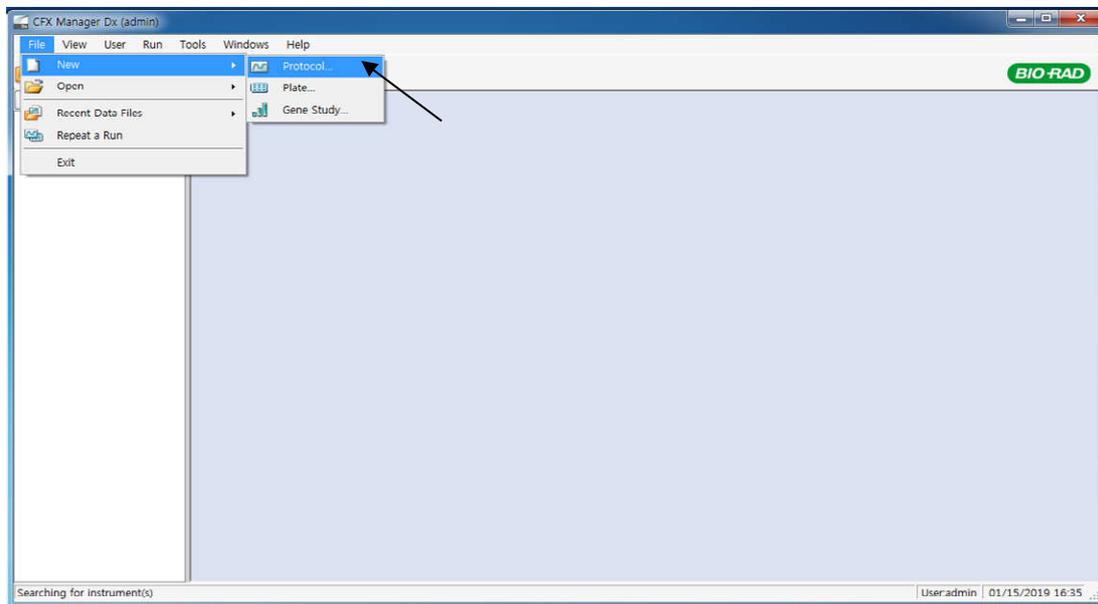
2. CFX96™ Dx sistema (CFX Manager™ Dx, programinė įranga - v3.1)

2.1. Tikro laiko PGR instrumento sąranka

Pastaba. CFX96™ Dx System (Bio-Rad) tyrimo sąranka yra skirstoma į tris etapus: protokolo sąranką, plokštelės sąranką ir tyrimo vykdymą.

A. Protokolo sąranka

- 1) Pagrindiniame meniu pasirinkite „**File**“ (failas)→ „**New**“ (naujas)→ „**Protocol**“ (protokolas), kad atidarytumėte „**Protocol Editor**“ (protokolo redagavimas).



1 iliustracija. **Protokolo sąranka**

2) „Protocol Editor” (protokolo redagavimo) lange nustatykite terminį profilį:

i) cyclic-CMTA (trijų pakartojimų lydymosi analizė)

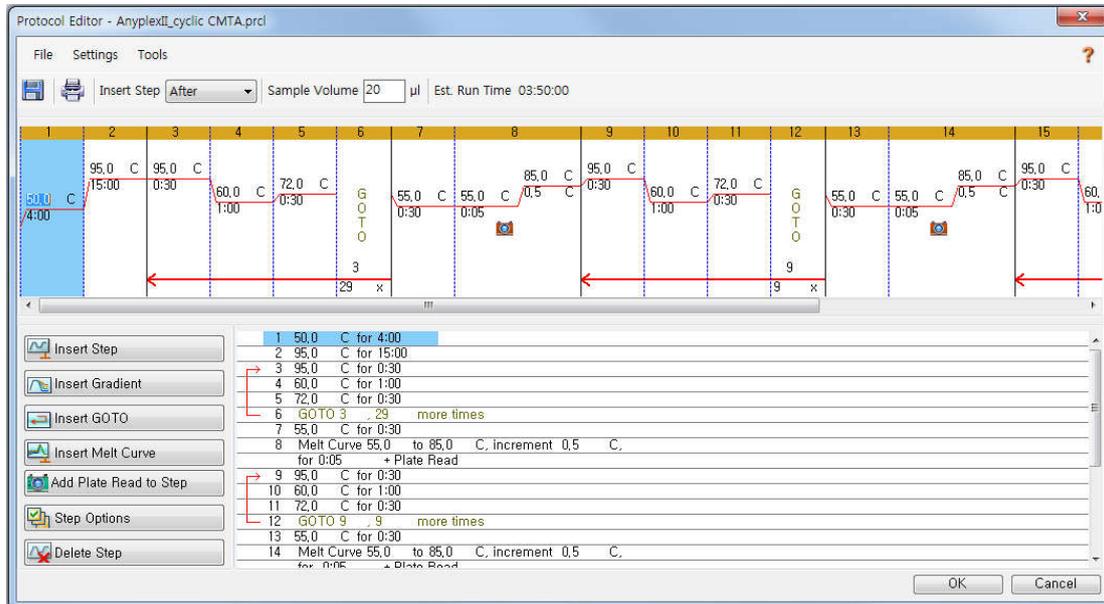
Step	Temperature	Duration	No. of cycles
1	50°C	4 min	
2	95°C	15 min	
3	95°C	30 sec	30
4	60°C	1 min	
5	72°C	30 sec	
6	GOTO 3, 29 more times		
7	55°C	30 sec	
8*	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)		
9	95°C	30 sec	10
10	60°C	1 min	
11	72°C	30 sec	
12	GOTO 9, 9 more times		
13	55°C	30 sec	
14*	Melting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

***Pastaba. Plokštelė nuskaityama 8, 14 ir 20 etape. Fluorescencija nuskaityama lydymosi etape.**

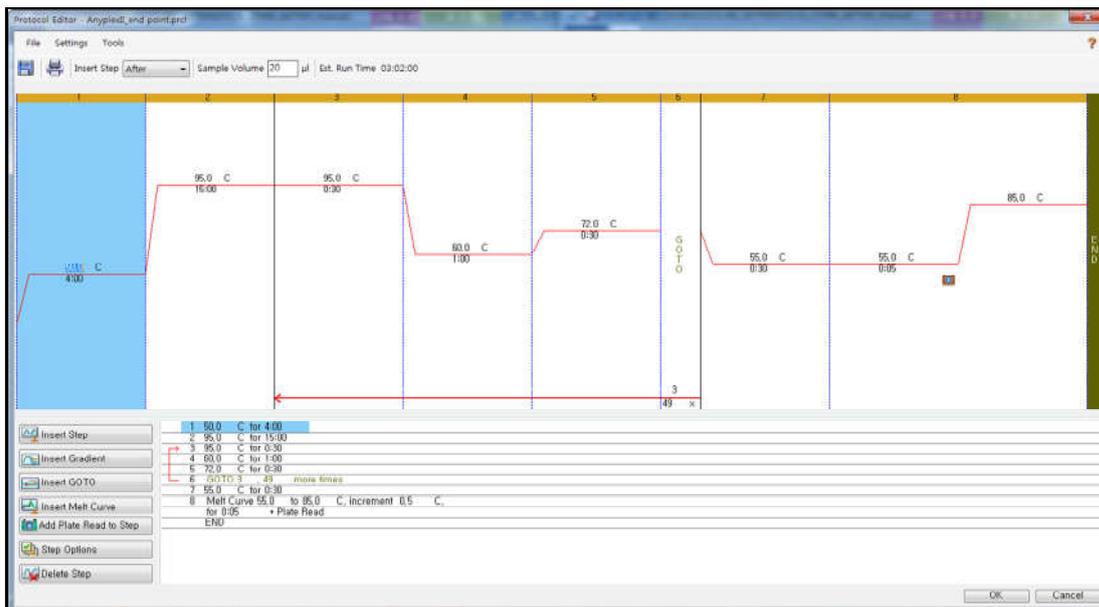
ii) End point-CMTA (vienkartinio lydymosi analizė)

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)		

***Pastaba. Plokštelė nuskaityama 8 etape.** Fluorescencija nuskaityama lydymosi etape.



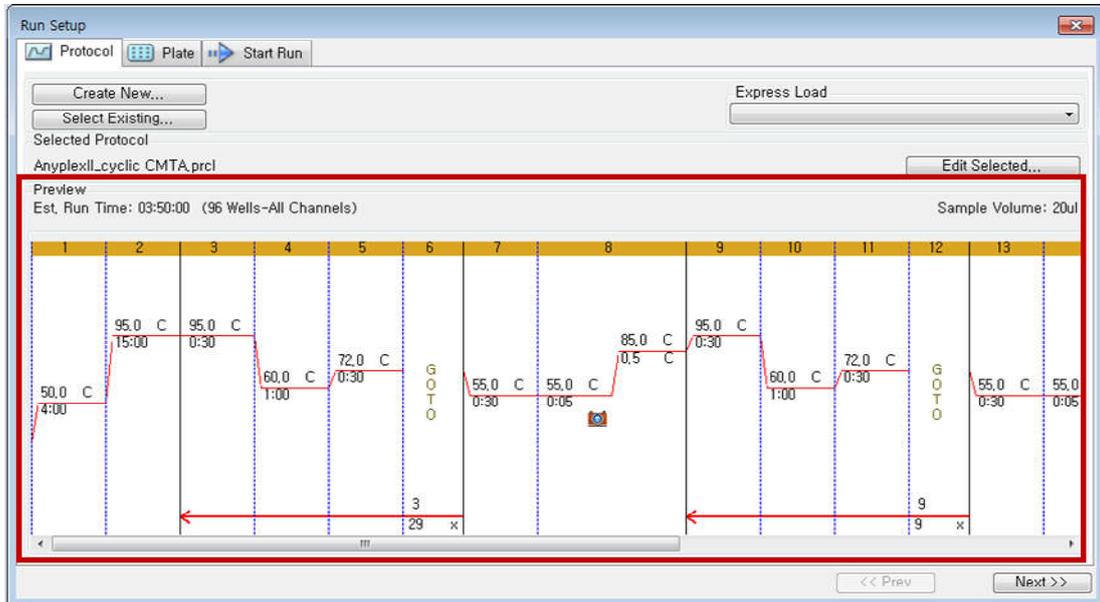
2 iliustracija. „Protocol Editor“ (protokolo redagavimo) langas (ciklinė CMTA).



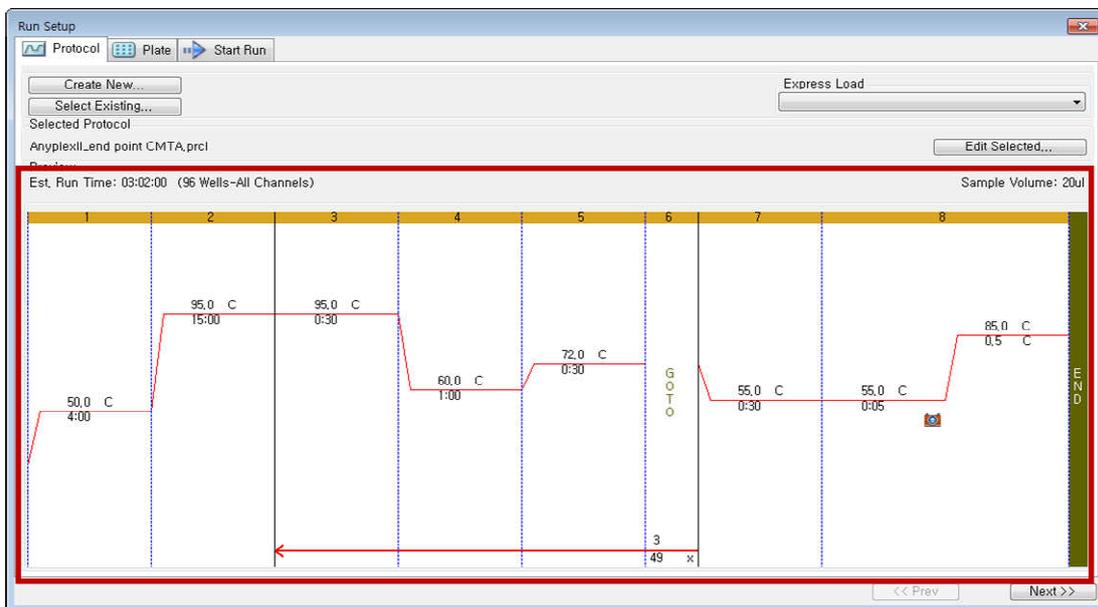
3 iliustracija. „Protocol Editor“ (protokolo redagavimo) langas (galutinio taško CMTA).

3) Pažymėkite langelį šalia „Sample Volume“ (mėginio tūris), kad galėtumėte tiesiogiai įrašyti 20 µl.

4) Paspauskite „OK” ir išsaugokite protokolą. Atsidarys „Run Setup” (tyrimo vykdymo sąrankos) langas.



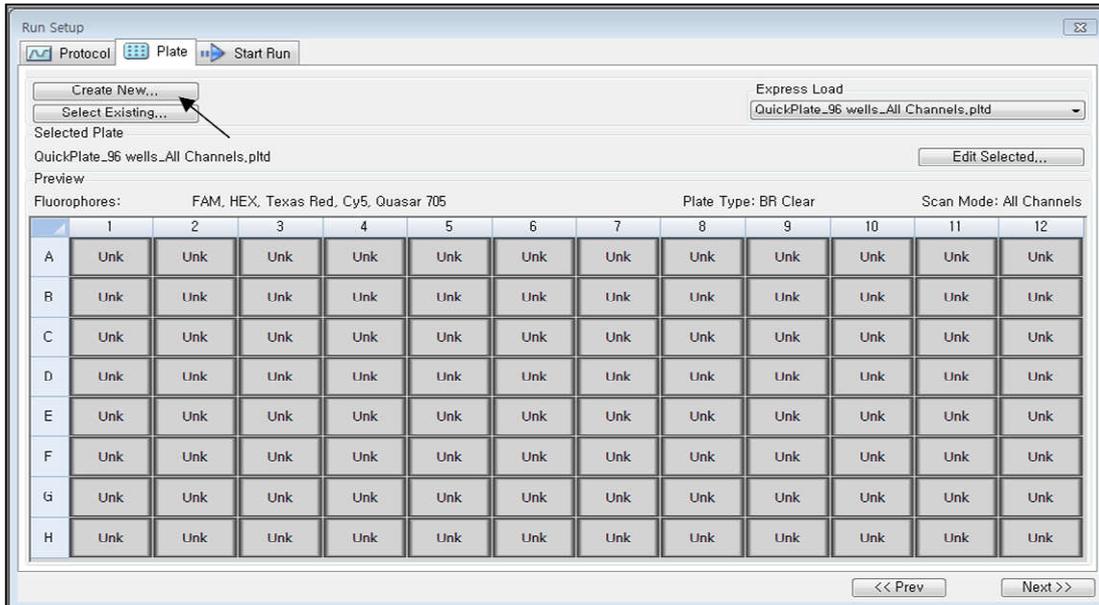
4 iliustracija. „Run Setup Protocol“ (tyrimo vykdymo sąrankos protokolas) (ciklinė CMTA).



5 iliustracija. „Run Setup Protocol“ (tyrimo vykdymo sąrankos protokolas) (galutinio taško CMTA).

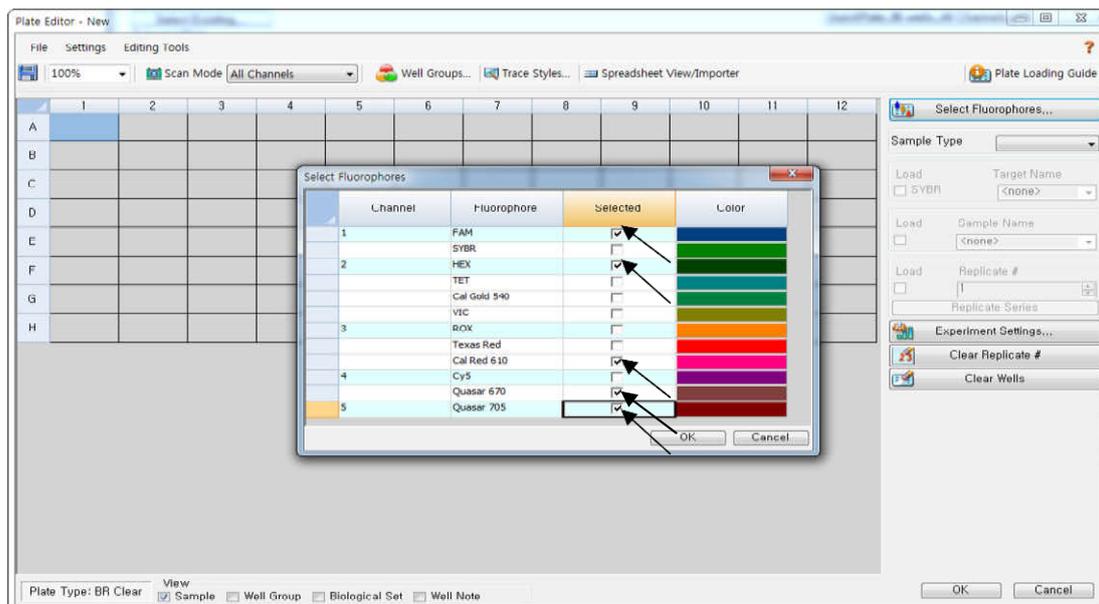
B. Plokštelės sąranka

- 1) „**Experiment Setup**” (tyrimo sąrankos) lango ašelėje „**Plate**” (plokštelė) paspauskite „**Create New**” (kurti naują). Atsidarys „**Plate Editor**” (plokštelės redagavimo) langas.



6 iliustracija. „**Plate Editor**“ langas.

- 2) Paspauskite „**Select Fluorophores**” (pasirinkti fluoroforus) ir nurodykite naudojamus fluoroforus (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670** ir **Quasar 705**), tuomet paspauskite „**OK**”.



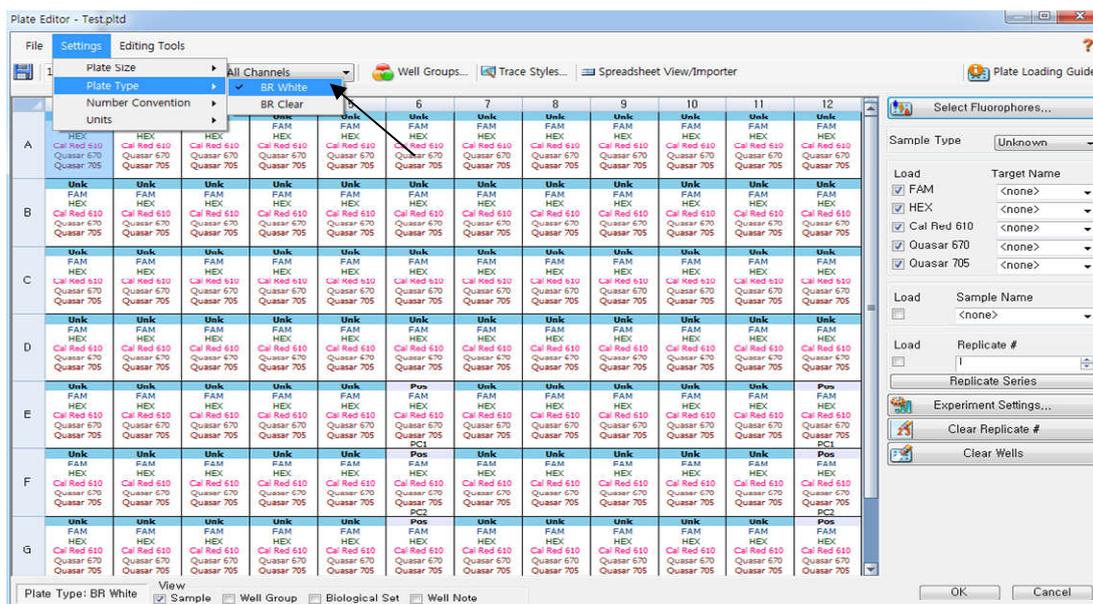
7 iliustracija. **Fluoroforų pasirinkimas (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 ir Quasar 705).**

- 3) Pasirinkite atitinkamus šulinėlius ir išsiskleidžiančiame meniu „**Sample Type**“ (mėginio tipas) pasirinkite mėginio tipą.
 - **Unknown** (nežinomas): klinikiniai mėginiai.
 - **Negative Control** (neigiama kontrolė)
 - **Positive Control** (teigiama kontrolė)

- 4) Pažymėkite atitinkamus laukelius (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 ir Quasar 705**), nurodant fluoroforus, kurie bus aptinkami pasirinktuose šulinėliuose.

- 5) Į laukelį „**Sample Name**“ (mėginio pavadinimas) įrašykite mėginio pavadinimą ir teigiamą kontrolę į laukelį „**PC**“ (**PC1, PC2 ir PC3**), tuomet paspauskite klavišą „Enter“.

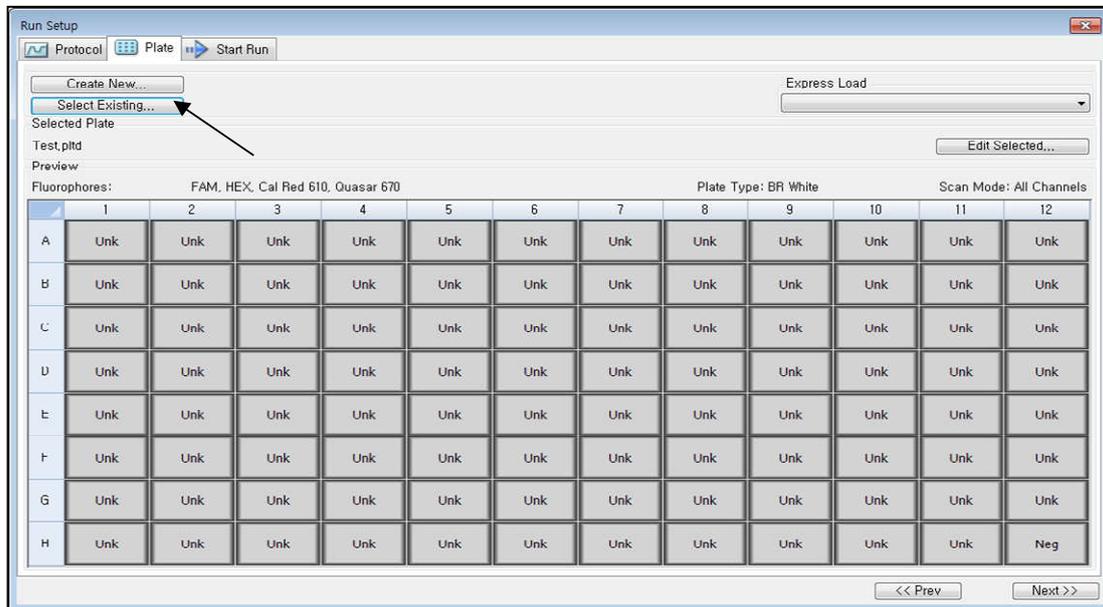
- 6) „**Plate Editor**“ (plokštelės redagavimo) lango pagrindinio meniu parinktyje „**Settings**“ (nustatymai) pasirinkite „**Plate Size**“ (plokštelės dydį) (**96 wells**) ir „**Plate Type**“ (plokštelės tipą) (**BR White**).



8 iliustracija. Plokštelės sąranka.

- 7) Paspaudę „**OK**“, išsaugosite naujos plokštelės sąranką.

8) Atsidarys „Run Setup” (tyrimo vykdymo sąrankos) langas.

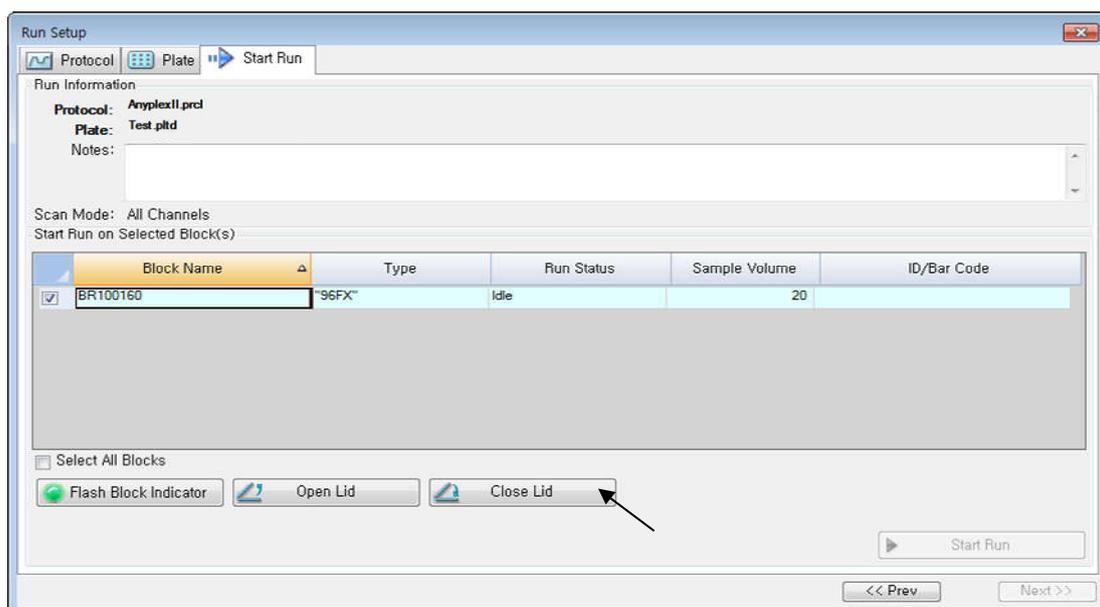


9 iliustracija. Tyrimo vykdymo sąranka: plokštelė.

9) Paspaudę „Next” (toliau), pradėsite tyrimo vykdymą.

C. Tyrimo vykdymas

1) „Run Setup” (tyrimo vykdymo sąrankos) lango ašselėje „Start Run” (vykdyti tyrimą) pasirinkite parinktį „Close Lid” (uždaryti dangtį). Instrumento dangtis užsidarys.



10 iliustracija. „Close Lid” parinktis.

- 2) Paspauskite **“Start Run”** (vykdyti tyrimą).
- 3) Vykdymo failą išsaugokite aplanke „My Documents“ ar kitame paskirties aplanke. Įrašykite failo pavadinimą ir paspauskite **„SAVE“** (išsaugoti). Prasidės tyrimo vykdymas.

1.3. Duomenų analizė

A. Aplanų kūrimas duomenų eksportavimui

A-1. Ciklinė CMTA

- **Naudojant funkciją „Export All Data Sheet to excel“ (visų duomenų eksportavimas į excel programą) (žr. 45 psl.)**

- 1) Norėdami išsaugoti kiekvieno lydimosi taško duomenis iš rezultatų failo, sukurkite tris aplankus: 8 etapo lydimosi taško duomenų saugojimo aplanko pavadinimas yra „1“, 14 etapo duomenų aplanko pavadinimas yra „2“ ir 20 etapo duomenų aplanko pavadinimas yra „3“.

- **Naudojant funkciją „Seegene Export“ (Seegene eksportavimas) (žr. 49 psl.)**

- 1) Norėdami išsaugoti visų lydimosi kreivės aptikimo etapų duomenis iš rezultatų failo, sukurkite vieną aplanką.
- 2) Naudotojas gali sukurti aplanko pavadinimą (naudojant „Seegene Export“ funkciją, aplankai „MeltStep8“, „MeltStep14“ ir „MeltStep20“ yra sukuriami automatiškai kiekvieno lydimosi taško duomenų išsaugojimui naudotojo sukurtame aplanke).

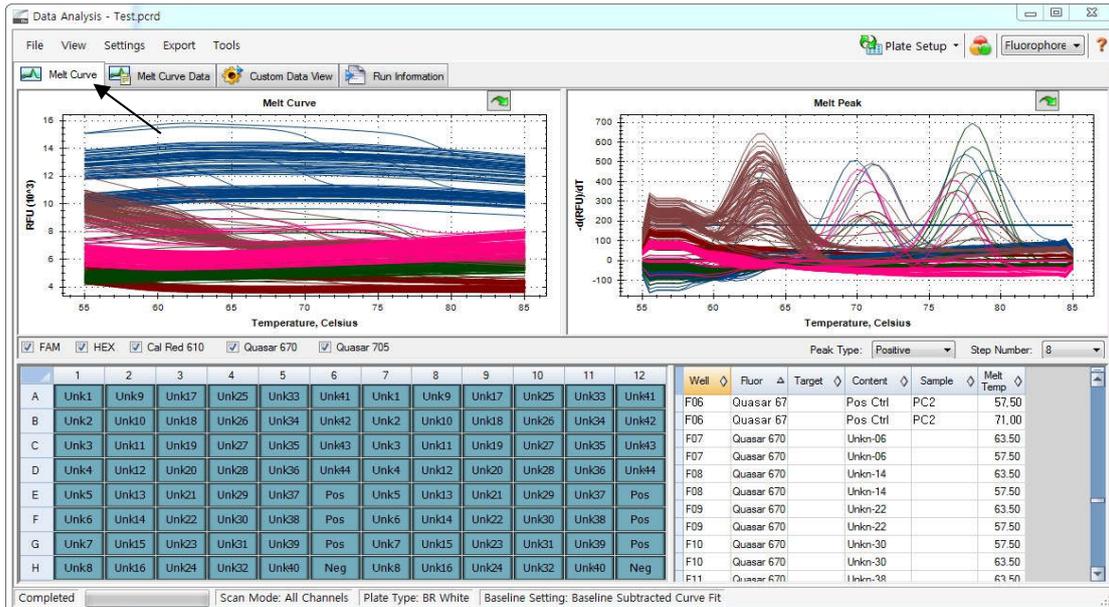
A-2. Galutinio taško CMTA

- 1) Norėdami išsaugoti lydimosi taško duomenis iš rezultatų failo, sukurkite vieną aplanką.
- 2) Aplanko pavadinimą sukuria naudotojas.

B. Išankstiniai duomenų analizės nustatymai CFX Manager™

B-1. Naudojant funkciją „Export All Data Sheet to excel“ (visų duomenų eksportavimas į excel programą)

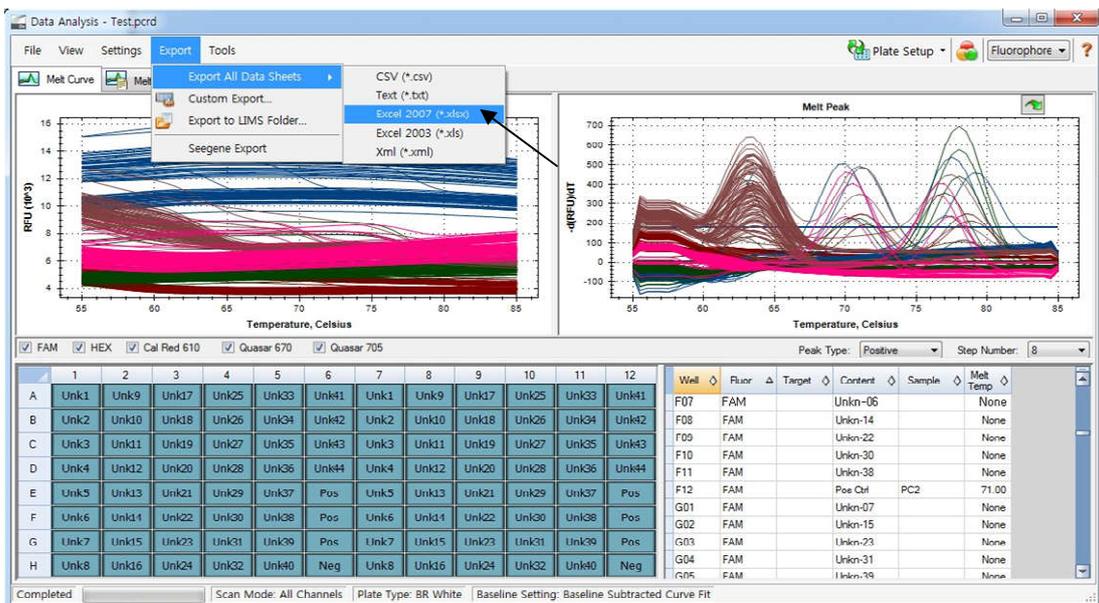
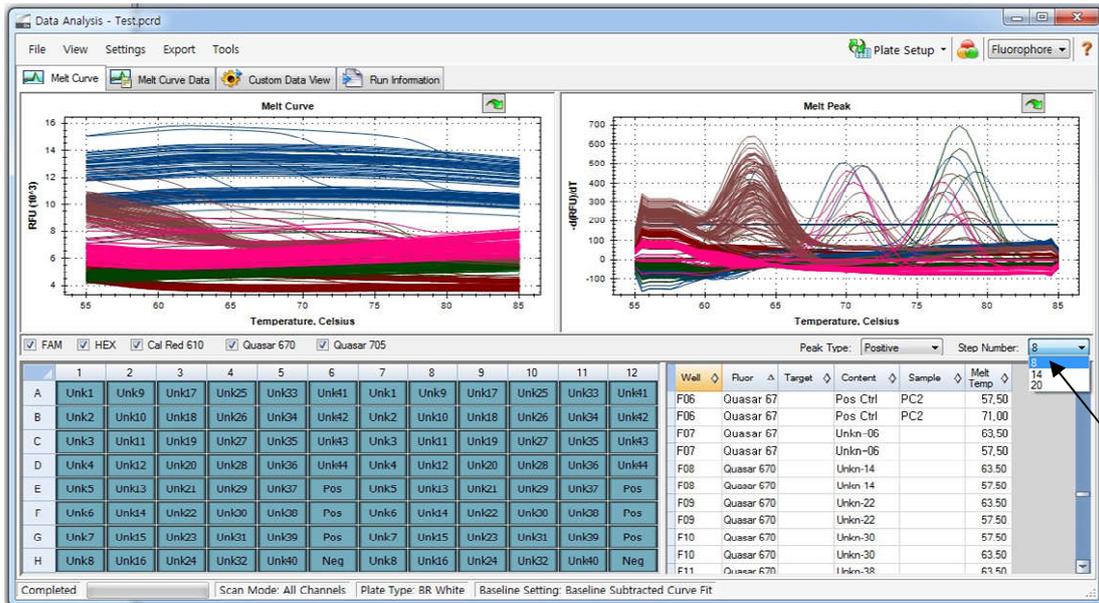
- Po tyrimo, paspauskite „Melt curve“ (lydymosi kreivės) sąselę, kad patvirtintumėte „Melt Peaks“ (lydymosi pikų) rezultatus.



11 iliustracija. Lydymosi pikų rezultatai.

2) Pasirinkite „Step number “8” (etapą nr. 8) ir „Export” (eksportavimo) meniu pasirinkite „Export All Data Sheets (Excel 2007 or Excel 2003)” (visų duomenų eksportavimas (Excel 2007 ar Excel 2003)).

Pastaba. Funkcija „Export All Data Sheets (Excel 2007 or Excel 2003)” (visų duomenų eksportavimas (Excel 2007 ar Excel 2003)) yra tiesiogiai pasirenkama tik galutinio taško CMTA atveju.



12 iliustracija. Visų duomenų eksportavimas į excel programą.

3) Rezultatą išsaugokite aplanke „1“.

Pastaba. Galutinio taško CMTA atveju, rezultatai gali būti išsaugomi bet kuriame aplanke.



13 iliustracija. Visų duomenų eksportavimas iš duomenų analizės skaičiuoklių į priskirtąjį aplanką.



14 iliustracija. Eksportuotų rezultatų failai.

Pastaba. Galutinio taško CMTA atveju praleiskite 5)~7) etapus.

- 5) Grįžkite į 2) etapą ir pasirinkite „**Step number “14”** (etapas nr. 14). Pakartokite 3) ir 4) etapus ir duomenis išsaugokite „**2**“ aplanke.
- 6) Grįžkite į 2) etapą ir pasirinkite „**Step number “20”** (etapas nr. 20).
- 7) Pakartokite 3) ir 4) etapus ir duomenis išsaugokite „**3**“ aplanke. Kiekvieno etapo numerio duomenys yra išsaugomi taip, kaip pateikiama žemiau.

Etapo numeris	Paskirties aplankas
8	1
14	2
20	3

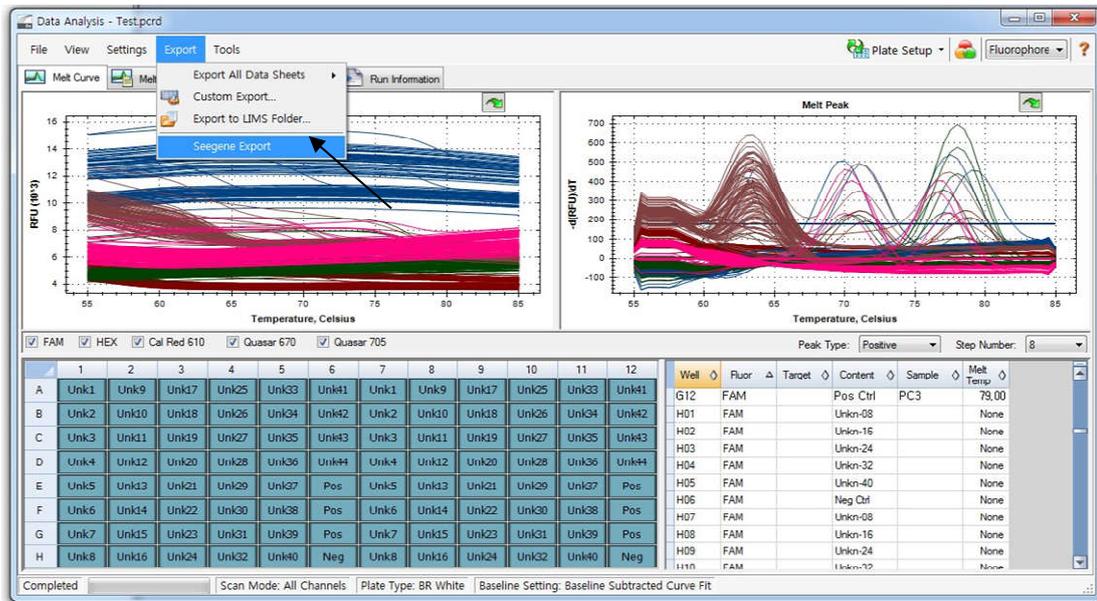
B-2. Naudojant funkciją „Seegene Export“ (Seegene eksportavimas)

- Po tyrimo, paspauskite „Melt curve“ (lydymosi kreivės) ašelę, kad patvirtintumėte „Melt Peaks“ (lydymosi pikų) rezultatus.



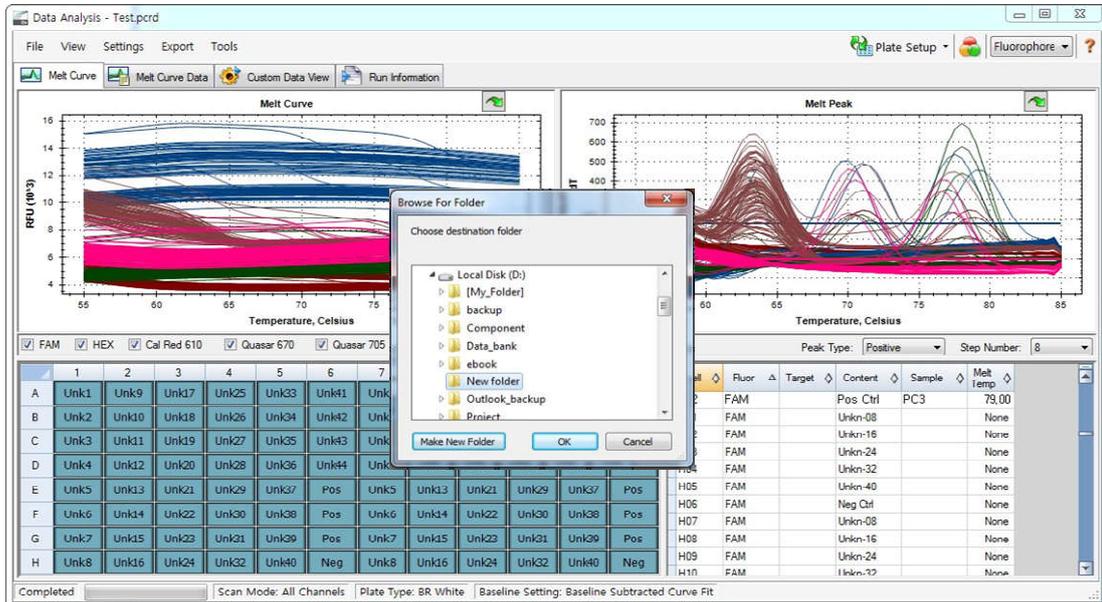
15 iliustracija. Lydymosi pikų rezultatai.

- „Export“ (eksportavimo) meniu pasirinkite „Seegene Export“ (Seegene eksportavimas).



16 iliustracija. „Seegene Export“ parinktis.

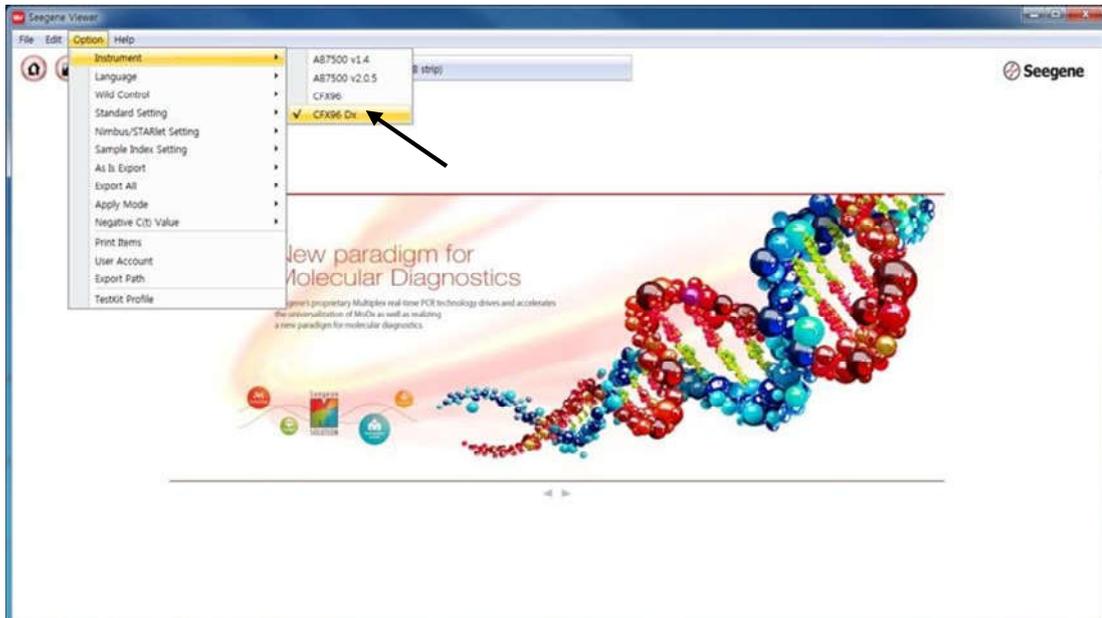
- 4) Pasirinkite duomenų išsaugojimo paskirties vietą ir paspauskite „OK”.



17 iliustracija. Duomenų eksportavimas į pasirinktą aplanką.

C. Seegene Viewer duomenų analizės nustatymai

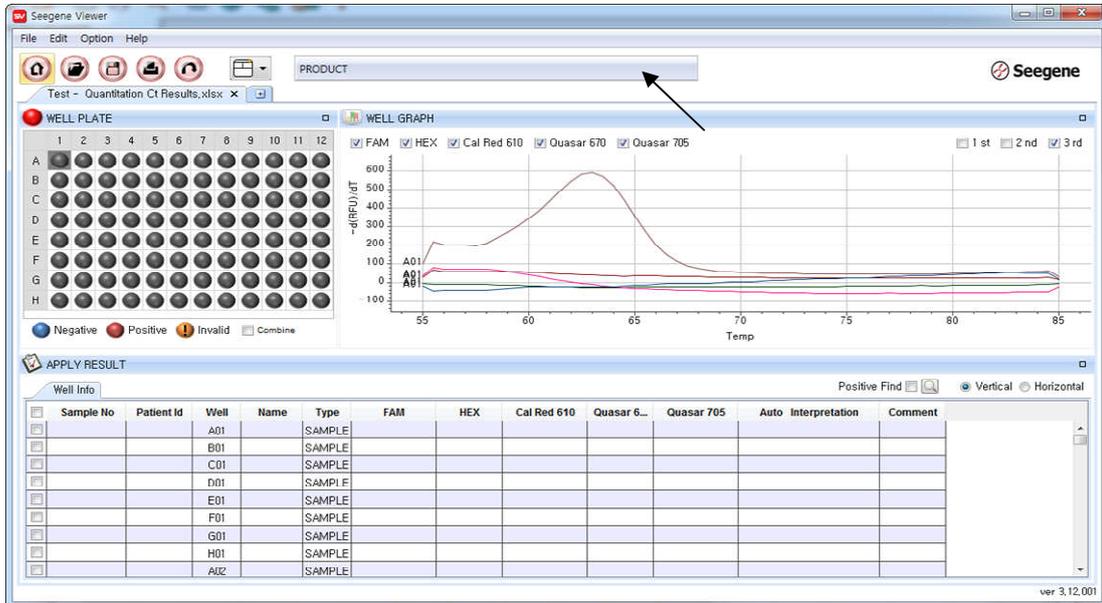
- 1) Atidarykite Seegene Viewer programą, paspauskite „Option” (parinktis) ir parinktyje „Instrument” (instrumentas) pasirinkite „CFX96 Dx”.



18 iliustracija. Seegene Viewer.

2) Paspauskite **“Open”** (atverti), aplanke „1“ ar „MeltStep8“ raskite išsaugotą failą, atidarykite rezultatų failą ir **“PRODUCT”** (produktas) meniu pasirinkite tyrimo rinkinį.

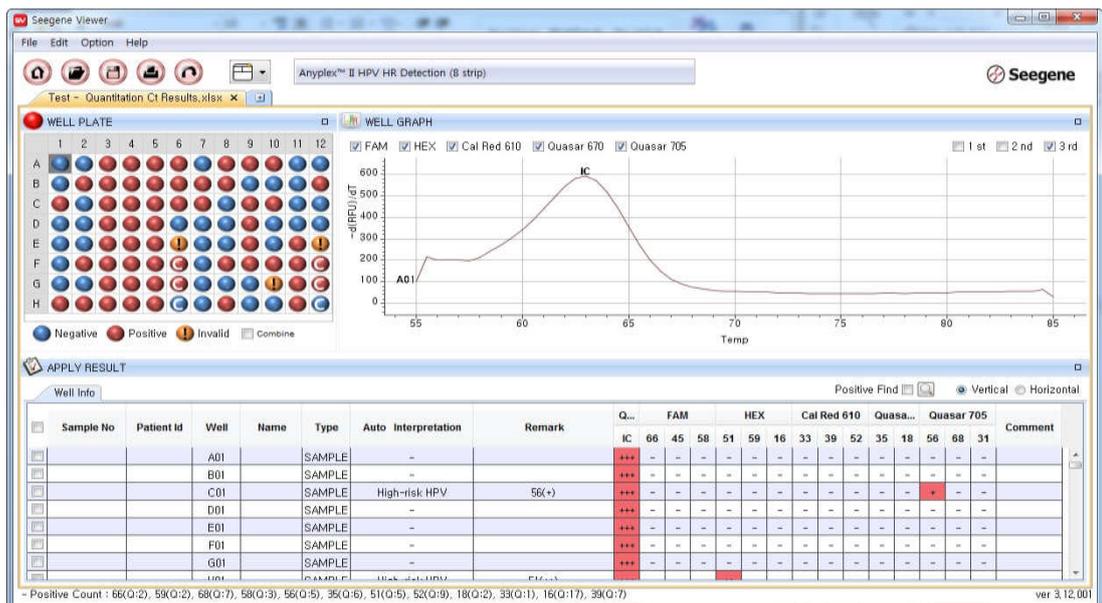
Pastaba. Galutinio taško CMTA atveju išsaugotų duomenų ieškokite sutartinai sukurtame aplanke.



19 iliustracija. Seegene Viewer duomenų analizės nustatymai

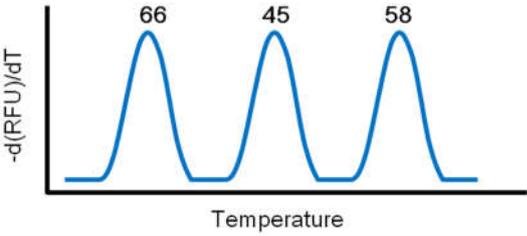
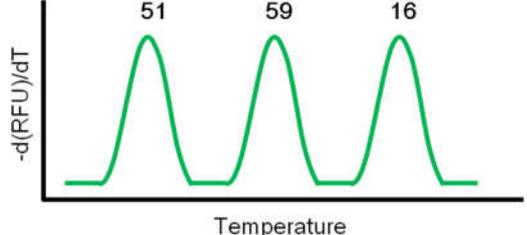
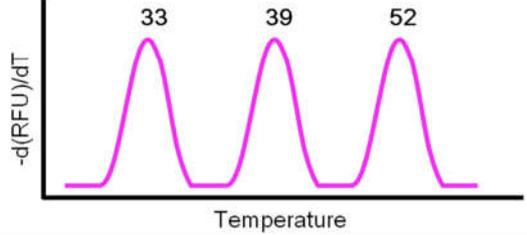
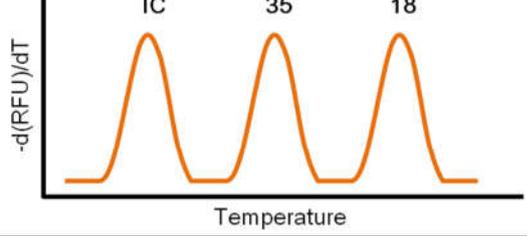
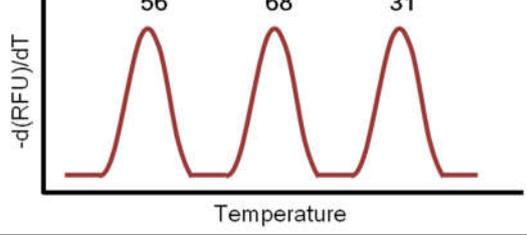
Pastaba. Rinkdamiesi tyrimų rinkinį, patvirtinkite mėgintuvėlio tipą (8 strip / 96 plate / 96 film).

3) Patikrinkite kiekvieno šulinėlio rezultatą.



20 iliustracija. Tyrimo rezultatai Seegene Viewer programoje.

REZULTATAI
1. Analitės informacija

Fluorophore	Anyplex™ II HPV HR Detection
FAM	 <p>The graph shows three distinct peaks in blue. The x-axis is labeled 'Temperature' and the y-axis is labeled '-d(RFU)/dT'. The peaks are labeled with their respective melting temperatures: 66, 45, and 58.</p>
HEX	 <p>The graph shows three distinct peaks in green. The x-axis is labeled 'Temperature' and the y-axis is labeled '-d(RFU)/dT'. The peaks are labeled with their respective melting temperatures: 51, 59, and 16.</p>
Cal Red610	 <p>The graph shows three distinct peaks in magenta. The x-axis is labeled 'Temperature' and the y-axis is labeled '-d(RFU)/dT'. The peaks are labeled with their respective melting temperatures: 33, 39, and 52.</p>
Quasar670	 <p>The graph shows three distinct peaks in orange. The x-axis is labeled 'Temperature' and the y-axis is labeled '-d(RFU)/dT'. The peaks are labeled with their respective melting temperatures: IC, 35, and 18.</p>
Quasar705	 <p>The graph shows three distinct peaks in dark red. The x-axis is labeled 'Temperature' and the y-axis is labeled '-d(RFU)/dT'. The peaks are labeled with their respective melting temperatures: 56, 68, and 31.</p>

2. Rezultatų interpretavimas

A. Ciklinė CMTA

ŽPV rezultatas*	VK rezultatas*	Interpretacija
+++ ar ++ ar +	+++ ar ++	Taikinio nukleino rūgštis aptikta. - Taikinio ŽVP tipo identifikacija.
+++ ar ++ ar +	+ ar -	Taikinio nukleino rūgštis aptikta.** - Taikinio ŽVP tipo identifikacija. - Gali būti papildomų ŽPV genotipų, kurie nebuvo aptikti.
-	+++ ar ++	Taikinio nukleino rūgštis neaptikta.
-	+ ar -	Negaliojantis - Silpnas ar neigiamas VK signalas indikuoja apie netinkamą mėginių paėmimo ar apdorojimo procedūrą arba inhibitorių buvimą. - Tyrimą kartokite nuo nukleino rūgščių ekstrakcijos etapo, naudodami kitą originalaus mėginio alikvotą.

Rezultatas	Ciklinė CMTA (ciklinės lydymosi temperatūros analizė)		
	Pirmas CMTA taškas	Antras CMTA taškas	Trečias CMTA taškas
+++	+	+	+
++	-	+	+
+	-	-	+
-	-	-	-

* Nėra vidinės kontrolės ar kitų signalų: skaitykite skyrių TRIKČIŲ APTIKIMAS IR ŠALINIMAS.

**Vidinės kokybės signalas buvo susilpnintas arba panaikintas dėl aukšto patogenų titro.

B. Galutinio taško CMTA

ŽPV rezultatas*	VK rezultatas*	Interpretacija
+	+	Taikinio nukleino rūgštis aptikta. - Taikinio ŽVP tipo identifikacija.
+	-	Taikinio nukleino rūgštis aptikta.** - Taikinio ŽVP tipo identifikacija. - Gali būti papildomų ŽPV genotipų, kurie nebuvo aptikti.
-	+	Taikinio nukleino rūgštis neaptikta.
-	-	Negaliojantis - Neigiamas VK signalas indikuoja apie netinkamą mėginių paėmimo ar apdorojimo procedūrą arba inhibitorių buvimą. - Tyrimą kartokite nuo nukleino rūgščių ekstrakcijos etapo, naudodami kitą originalaus mėginio alikvotą.

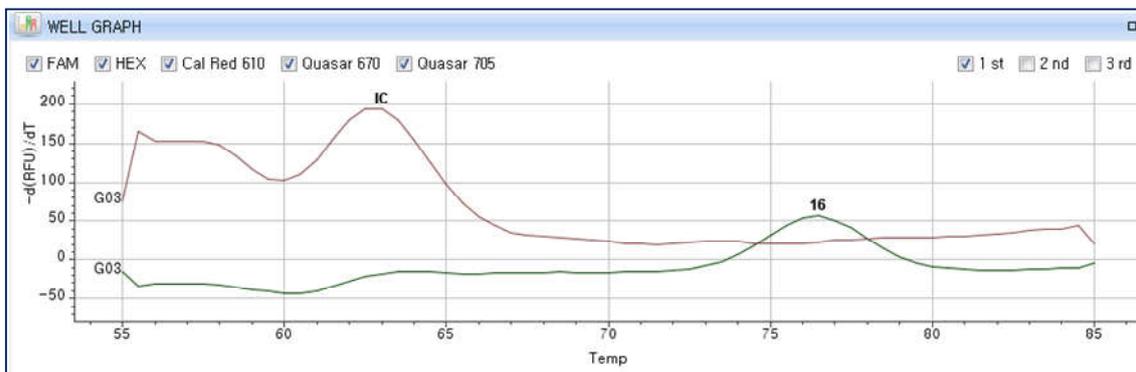
* Nėra vidinės kontrolės ar kitų signalų: skaitykite skyrių TRIKČIŲ APTIKIMAS IR ŠALINIMAS.

**Vidinės kokybės signalas buvo susilpnintas arba panaikintas dėl aukšto patogenų titro.

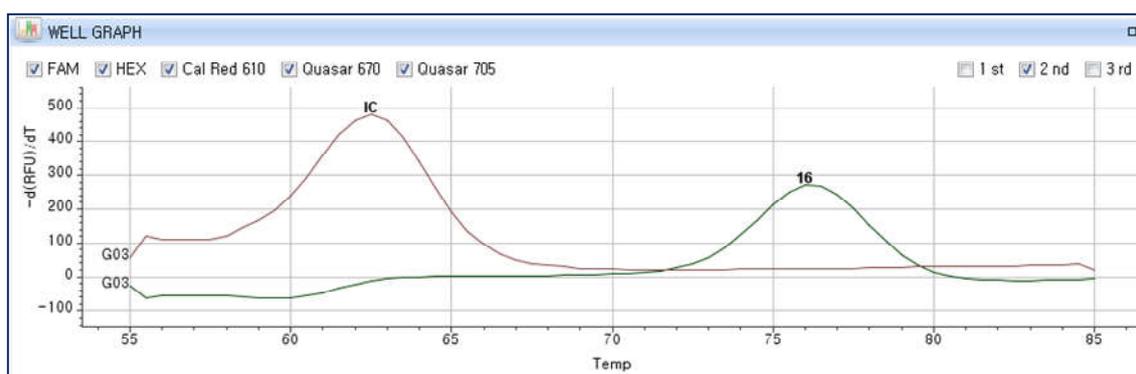
3. Klinikinių mėginių analizė

A. Ciklinė CMTA

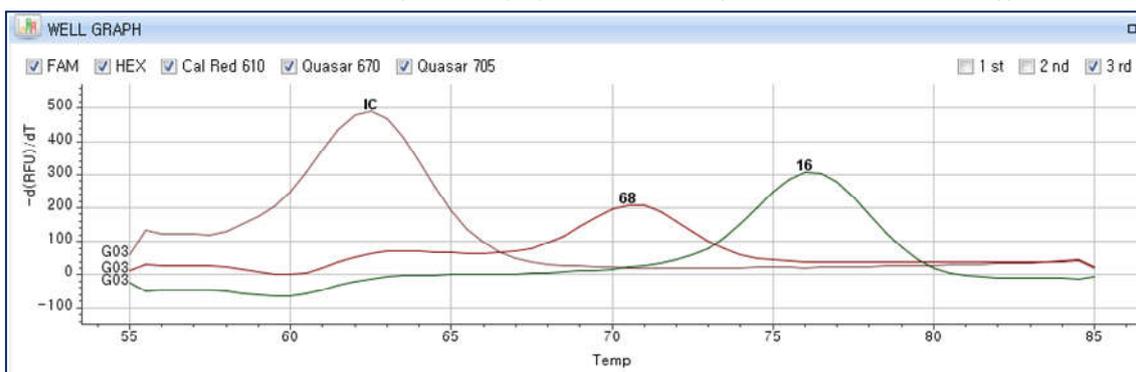
Melt Peak-1st (First CMTA point) (1-asis lydimosi taškas (pirmas CMTA taškas))



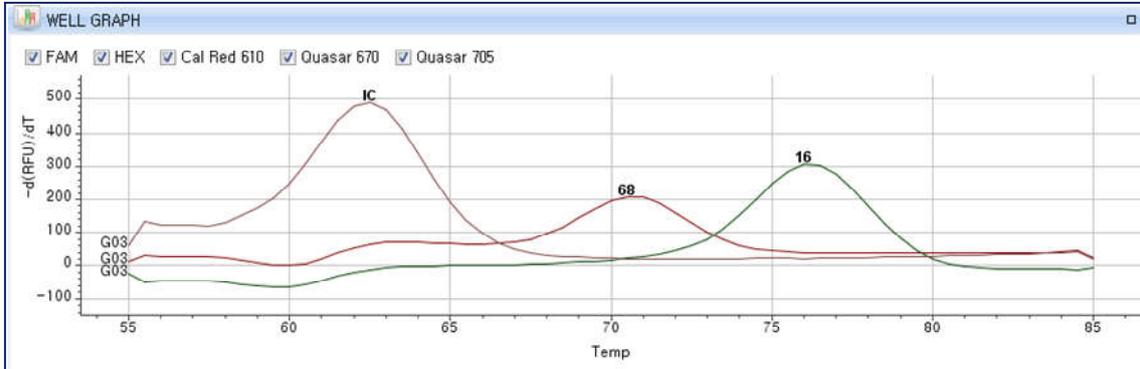
Melt Peak-2nd (Second CMTA point)(2-asis lydimosi taškas (antras CMTA taškas))



Melt Peak-3rd (Third CMTA point)(3-iasis lydimosi taškas (trečias CMTA taškas))



Automatinė interpretacija	Žyma	Quasar 670	FAM			HEX		Cal Red 610			Quasar 670		Quasar 705			
			IC (VK)	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68
Aukštos rizikos ŽPV	16(+++), 68(+)	IC (VK)	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31
		+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	-

B. Galutinio taško CMTA


Automatinė interpretacija	Žyma	Quasar 670	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670		Quasar 705		
		IC (VK)	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31
Aukštos rizikos ŽPV	16, 68	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

TRIKČIŲ APTIKIMAS IR ŠALINIMAS

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas		
TRIKTIS	GALIMA PRIEŽASTIS	SPRENDIMAS
Nėra signalo	Fluoroforai duomenų analizei neatitinka protokolo	Pasirinkite duomenų analizei tinkamus fluoroforus.
	Netinkamas PGR mišinys ar instrumento temperatūra.	Patikrinkite PGR sąlygas ir kartokite tyrimą esant tinkamiems nustatymams.
	Reagentai ilgą laiką buvo palikti kambario temperatūroje arba buvo laikomi netinkamomis sąlygomis.	Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas (žr. 10 psl.) ir jų galiojimo datą (rinkinio etiketėje). Jei reikia, naudokite naują rinkinį.
	Netinkamas programavimas.	Pasirinkite tinkamus nustatymus ir pakartokite aptikimo procedūrą.
	Nesėkminga nukleino rūgščių ekstrakcija.	Patikrinkite, ar naudojate rekomenduojamą ekstrakcijos metodą.
	Netinkamai paimtas mėginys.	Jei nebuvo aptikti ir taikinio, ir VK signalai, tai reiškia, jog mėginys buvo netinkamai paimtas. Iš naujo paimkite mėginį.
Nėra vidinės kontrolės signalo	Didelis patogeno nukleino rūgščių kiekis.	Jei yra pastebimas taikinio signalas, gali būti, jog mėginyje buvo aptikti taikinio patogenai, nors VK signalo ir nėra. Jei norite patikrinti VK, mėginį praskieskite. ① Skieskite vandeniu be RN-azių santykiu 10X-100X ir kartokite PGR.
	PGR inhibicija.	② Mėginį skieskite PBS santykiu 10X-100X ir procedūrą kartokite nuo ekstrakcijos etapo.
Spėjamai klaidingai teigiamas rezultatas arba taikinio signalas stebimas neigiamoje kontrolėje.	Kryžminis užterštumas.	Visus paviršius ir instrumentus nukenksminkite natrio hipochloritu ir etanoliumi. Ekstrakcijos metu naudokite tik filtrinius antgalius. Kiekvienam mėgintuvėliui naudokite naują antgalį. Visą procedūrą kartokite nuo nukleino rūgščių ekstrakcijos etapo, naudodami naujus reagentus.
	Kryžminis užterštumas tarp PC1, 2 ir 3.	Tyrimą kartokite nuo ekstrakcijos etapo arba nuo tikro laiko PGR etapo.

Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas		
TRIKTIS	GALIMA PRIEŽASTIS	SPRENDIMAS
Spėjimai klaidingai neigiamas rezultatas arba nėra signalo teigiamoje kontrolėje	Netinkamai paimtas mėginys.	Iš naujo paimkite mėginį.
	Netinkamai sandėliuotas mėginys.	Mėginį paimkite iš naujo ir kartokite visą procedūrą. Užtikrinkite, kad produktas būtų laikomas rekomenduojamomis sąlygomis.
	Nesėkminga nukleino rūgščių ekstrakcija.	Pakartotinai atlikite nukleino rūgščių ekstrakciją.
	Klaida išpilstant nukleino rūgštis į atitinkamus PGR mėgintuvėlius.	Patikrinkite mėgintuvėlių su nukleino rūgštimis numerius ir užtikrinkite, kad aptikimo proceso metu nukleino rūgštys būtų dozuojamos į tinkamus PGR mėgintuvėlius.
	Yra inhibitorių.	Mėginį skieskite PBS (10~100x) ir procedūrą kartokite nuo ekstrakcijos etapo.
	Duomenų analizei skirti fluoroforai neatitinka protokolo.	Pasirinkite duomenų analizei tinkamus fluoroforus.
	Netinkamas programavimas.	Pakartokite PGR esant tinkamiems nustatymams.
	Netinkamas PGR mišinys.	Patikrinkite, ar buvo sudėti visi komponentai (jei naudojate iš anksto paruoštą mišinį, sumažinkite jautrumą). Po homogenizavimo, prieš pradėdami tikro laiko PGR, reagentų mėgintuvėlius trumpai centrifuguokite.
Reagentai ilgą laiką buvo palikti kambario temperatūroje arba buvo laikomi netinkamomis sąlygomis.	Patikrinkite reagentų laikymo sąlygas ir jų galiojimo datą (rinkinio etiketėje). Jei reikia, naudokite naują rinkinį.	

VEIKSMINGUMAS
1. Specifiškumas

Aukštą Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo specifiškumą užtikrina pradmenys, sukurti specialiai specifiniams taikiniams ir reakcijos sąlygoms. Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimas buvo tirtas dėl kryžminio reaktyvumo su 80 skirtingų patogenų: rezultatai iliustruoja PGR amplifikacijas taikiniuose.

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

Organizmas	Padermės nr.	Tyrimo rezultatas [†]
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6059	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15522	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KCTC 49642	-
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 27137D-5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 29213	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC BAA-611D	-
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456D-5	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 700294D-5	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC 30001D	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC 33695	-
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053	-
<i>Cytomegalovirus</i>	ATCC VR-807	-
Epstein-Barr virus	ATCC VR-602	-
Herpes simplex virus 1	ATCC VR-260	-
Herpes simplex virus 2	ATCC VR-734	-
Human Adenovirus 40	ATCC VR-931	-
HPV1	ATCC 45021	-
HPV2	ATCC 45022	-
HPV6	ATCC 45150D	-
HPV11	ATCC 45151D	-
HPV26	Korėjos izoliatas	-
HPV34	Korėjos izoliatas	-
HPV40	Korėjos izoliatas	-
HPV42	Korėjos izoliatas	-
HPV43	ATCC 40339	-
HPV44	Korėjos izoliatas	-
HPV53	Korėjos izoliatas	-
HPV54	Korėjos izoliatas	-
HPV61	Korėjos izoliatas	-
HPV62	Korėjos izoliatas	-
HPV69	Korėjos izoliatas	-

Organizmas	Padermės nr.	Tyrimo rezultatas [†]
HPV70	Korėjos izoliatas	-
HPV71	Korėjos izoliatas	-
HPV72	Korėjos izoliatas	-
HPV73	Korėjos izoliatas	-
HPV81	Korėjos izoliatas	-
HPV82	Korėjos izoliatas	-
HPV83	Korėjos izoliatas	-
HPV84	Korėjos izoliatas	-
HPV102	Korėjos izoliatas	-
HPV16	ATCC 45113D	+ (HPV16)
HPV18	ATCC 45152D	+ (HPV18)
HPV31	ATCC 65446	+ (HPV31)
HPV33	Korėjos izoliatas	+ (HPV33)
HPV35	ATCC 40330	+ (HPV35)
HPV39	Korėjos izoliatas	+ (HPV39)
HPV45	Korėjos izoliatas	+ (HPV45)
HPV51	Korėjos izoliatas	+ (HPV51)
HPV52	Korėjos izoliatas	+ (HPV52)
HPV56	ATCC 40549	+ (HPV56)
HPV58	Korėjos izoliatas	+ (HPV58)
HPV59	Korėjos izoliatas	+ (HPV59)
HPV66	Korėjos izoliatas	+ (HPV66)
HPV68	Korėjos izoliatas	+ (HPV68)
SiHa Cell	KCLB 30035	+ (HPV16)
HeLa Cell	KCLB 10002	+ (HPV18)

[†]Siekiant užtikrinti rezultatų patikimumą, tyrimas buvo kartojamas tris kartus.

2. Jautrumas

Siekiant nustatyti Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo jautrumą, buvo atliekamas standartinis serijinis skiedimas nuo 10^5 iki 10^0 kopijų/reakcijoje su DNR plazmidėmis bei nuo 5×10^3 iki 10^1 ląstelių/ml su SiHa ląstelėmis (HPV16) ir HeLa ląstelėmis (HPV18) ir vėliau analizuotas su Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimu. Nustatyta, jog Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo aptikimo riba yra 50 kopijų/reakcijoje su DNR plazmidėmis ir 500 ląstelių/ml su SiHa ląstelėmis (HPV16) ir HeLa ląstelėmis (HPV18).

3. Atkuriamumas

Atkuriamumo testo kriterijus yra tęstinai (laiko atžvilgiu) gauti tuos pačius rezultatus. Atitikimo su tikėtiniu rezultatu procentinė išraiška (%) turi būti didesnė nei 95%. Atkuriamumo studija buvo atliekama naudojant 3 skirtingas produkto partijas 3 skirtingose laboratorijose 7 skirtingais laikotarpiais. Tyrimus atliko 3 skirtingi operatoriai. Nustatytas Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo bendras atitikimas yra 99,4%.

4. Interferuojančios substancijos

Interferencijos testas buvo atliekamas naudojant bendrą žmogaus kraują ir gimdos kaklelio gleives, kaip su taikiniu nesusijusias išorines medžiagas. Anyplex™ II aukštos rizikos ŽPV aptikimo tyrimo rezultatų aukščiau minimos substancijos neįtakoja.

LITERATŪROS NUORODOS

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
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, Bisanzzi 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.] *Virology.* (2011) 22(8): 558

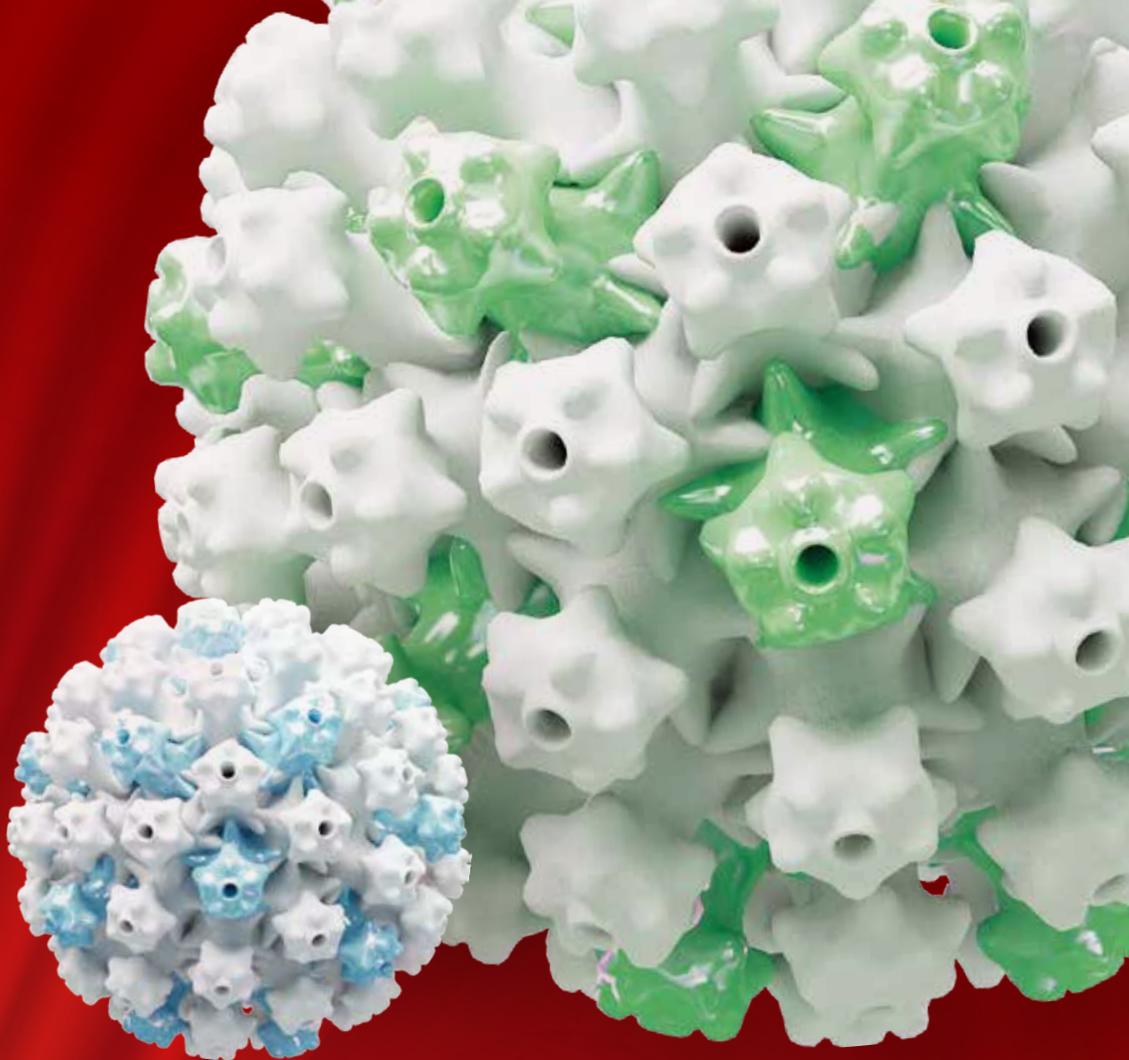
SIMBOLIAI

Simbolis	Paaiškinimas
	In vitro diagnostinė medicinos priemonė
	Partijos kodas
	Katalogo numeris
	Naudokite iki nurodytos datos
	Viršutinė temperatūros riba
	Dėmesio
	Oligonukleotidų mišinys amplifikacijai ir aptikimui
	Vanduo be RN-azių
	Teigiama kontrolė (angl. k. PC (positive control))
	Pagrindinis PGR mišinys (Master Mix) arba aptikimo mišinys
	Gamintojas
	Pagaminimo data
	Skaitykite naudojimo instrukcijas
	Įgaliotas atstovas Europos bendrijoje
	Turinio pakanka <n> tyrimų

UŽSAKYMO INFORMACIJA

Kat. nr.	Produktas	Dydis
Anyplex™ II HPV Series		
HP7E00X	Anyplex™ II HPV HR Detection	100 reakcijų*
HP7S00X	Anyplex™ II HPV28 Detection	100 reakcijų*
*Skirta naudoti tik su Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS ir Seegene STARlet.		
Seeplex® HPV Series		
HP6401Y	Seeplex® HPV4A ACE Screening	50 reakcijų
Priedai		
SG1701	Ribo_spin vRD(Viral RNA/DNA Extraction Kit)	50 ruošinių
Automatinė ekstrakcijos sistema		
65415-02	Microlab NIMBUS IVD	1 vnt.
173000-075	Microlab STARlet IVD	1 vnt.
65415-03	Seegene NIMBUS	1 vnt.
67930-03	Seegene STARlet	1 vnt.
744300.4.UC384	STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit	384 testai dėžutėje
EX00013C	STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit	384 testai dėžutėje
SGprep32-180701	SGprep32	1 vnt.
EX00003P	STARMag 96 UniPlate	96 testai dėžutėje
EX00004T	STARMag 96 UniTube	96 testai dėžutėje
SG71100	SEEPREP32	1 vnt.
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96 testai dėžutėje
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96 testai dėžutėje
EX00017P	STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	96 testai dėžutėje
EX00017T	STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	96 testai dėžutėje

Tikslus dokumento vertimas į lietuvių kalbą
 Vertėja Akvilė Gegelevičienė
 Data 2021-03-25
 UAB Diamedica
 Gėlių g. 2, Avižieniai, Lietuva



 Anyplex™ II

HPV HR Detection

Screening of 14 high-risk HPVs with genotypes
by real-time PCR

- 14 High-risk HPV genotypes : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

CE-IVD Marked



HIGH SENSITIVITY & SPECIFICITY

Multiplex real-time PCR with high sensitivity and specificity by utilization of DPO™ and TOCE™ technologies



HPV HR Detection

Human papillomavirus (HPV) has been identified as the leading cause of cervical cancer in women as well as a growing risk factor in oropharyngeal cancer. Although over 150 related HPV strains have been identified, only a subset of whole HPV was identified as major risk factors for cervical cancer. While HPV16 and HPV18 have clearly been implicated as causative agents, the influence of other high-risk HPV genotypes on the severity and progression of cervical cancer (e.g., viral load; persistence and clearance rates of virus over time) have been reported. In particular, the co-infection of high-risk HPV strains has now been identified as risk factors for increased co-morbidity and disease progression. Outcome-based clinical studies in regard to HPV vaccines have demonstrated the advantages of long-term monitoring of infected HPVs in association with persistent efficacy and cross-genotype protection. Unfortunately, current HPV diagnostic tools are restricted to use for the detection, identification and quantitation of multiple HPV genotypes.

Anyplex™ II HPV HR Detection is specifically designed for simultaneous detection of 14 high-risk HPV genotypes including HPV16 and HPV18 which contributes to cervical cancer. Anyplex™ II HPV HR Detection is a fast and reliable solution for the detection of HPV infection, providing a much-needed multiplex diagnostic solution to assist in prognosis and long-term patient outcome.

○ Analytes

- **14 High-risk HPV genotypes :**
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
- Internal Control

○ Specimens

- Cervical swab
- Liquid based cytology specimen (e.g., ThinPrep® and Surepath™)

○ Seegene's automated platform (CE-IVD Marked)

- **Automated Extraction & PCR setup**
Seegene NIMBUS / Seegene STARlet
- **Automated Pre-analytic System**
VCMS (Vial Cap Management System)
- **Real-time PCR**
CFX96™ Dx



*STARlet IVD with VCMS (vial cap management system) automates pre-analytic steps for primary vial, ThinPrep® and Surepath™, such as de-capping, aliquot and re-capping.

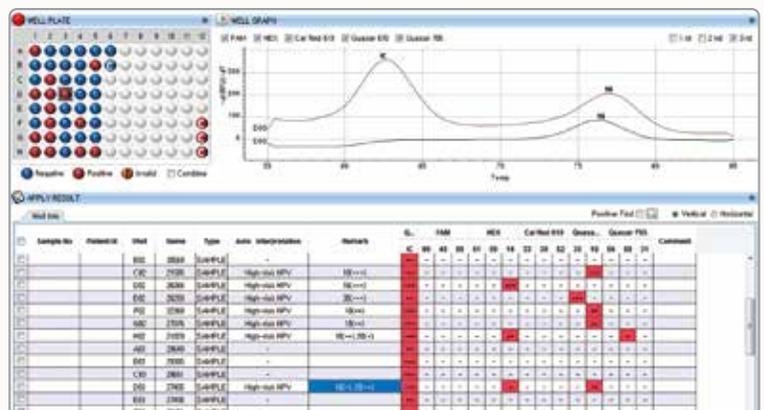
○ Features

- Screening of 14 high-risk HPV genotypes in a single reaction
- Multiplex real-time PCR for reliable results by utilization of DPO™ and TOCE™ technologies
- Amenable to automated sample handling and assay systems
- Utilization of the UDG system to prevent carry-over contamination
- Endogenous Internal Control for assay validity
- Convenient data interpretation by the Seegene Viewer

○ Seegene Viewer

Quick and easy data analysis & interpretation

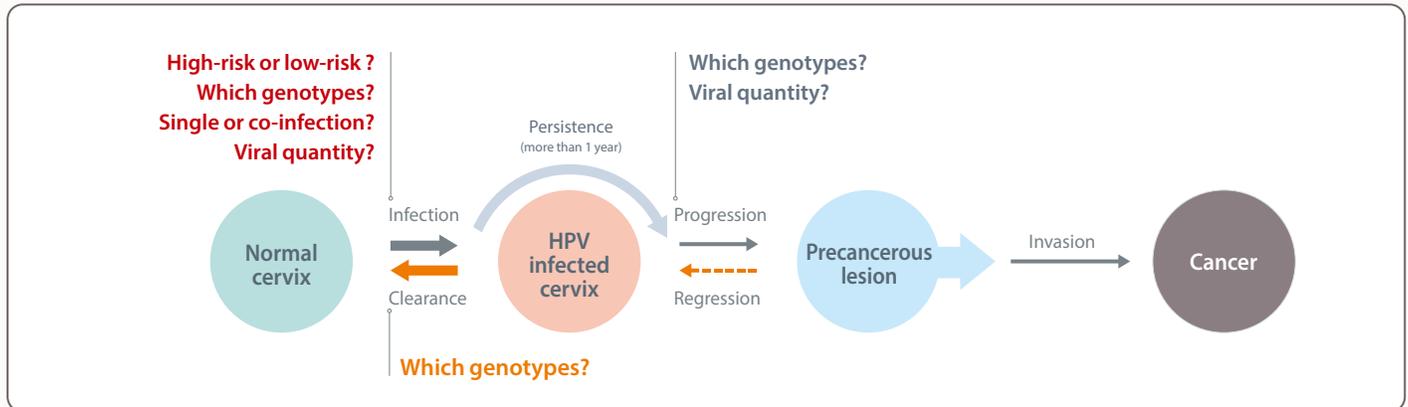
- Interface specialized for multiplex testing
- Interlocked with LIS
- Patient information input via barcode scanning system or LIS system
- Printable in various formats
- Downloadable results in a CSV file
- Convenient read out for quantitative analysis result



◦ Purpose of HPV DNA Test

HPV DNA tests should provide maximum information (genotype, co-infection, quantitative result) about the infection to facilitate the clinical follow up of the patient.

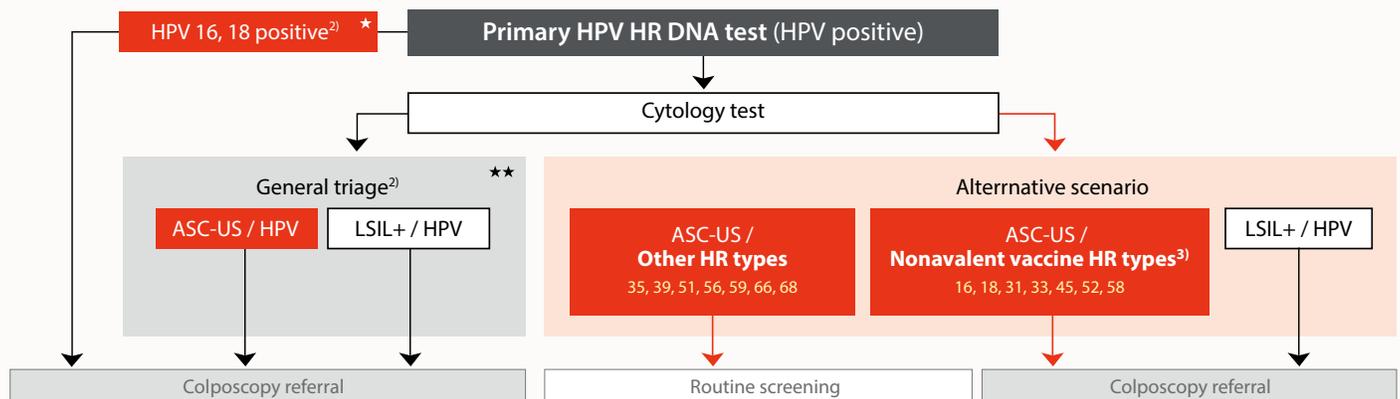
Natural history of cervical cancer¹⁾



1) Shiffman M et al. The promise of global cervical cancer prevention. *N Engl J Med* (2005) 353(20) : 2101-4

◦ Optimizing HPV-based primary screening program

General primary HPV screening with cytology triage vs. Alternative triage based on the HPV genotype



General example of triage algorithm for primary HPV screening²⁾

1. HPV genotyping for HPV16, HPV18 and cytology in US
 2. HPV positive and cytology in Europe
- : Women with ASC-US or higher are referred to colposcopy

A new screening approach is required²⁾

1. **Vaccination effect** : An increase of HPV vaccination coverage is likely to leading lower prevalence
2. **Low specificity** : Referring HPV+ women with ASC-US to colposcopy is not efficient, because the large number of women do not have precancer or anything related to cervical cancer
3. **Management trend** : Risk thresholds* rather than individual results

**For primary HPV screening,
Anyplex™ II HPV HR detection can help**

1. Setting risk threshold
2. Considering new alternative scenario
3. Proposing better algorithm

through identifying major high-risk HPV including vaccine-covered type

★ The primary HPV screening program in USA.

★★ The primary HPV screening program in the Netherlands.

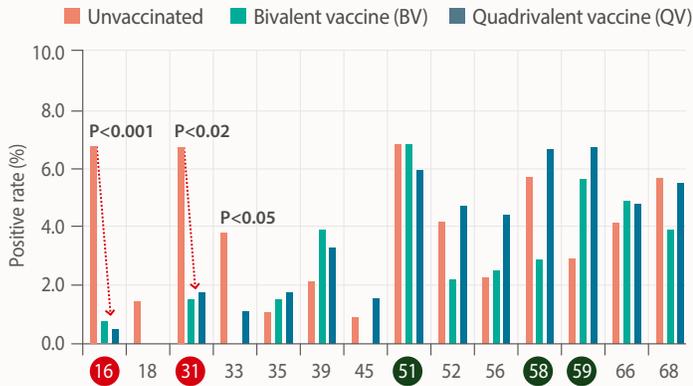
2) Wentzensen N. et al. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening (2016)

3) A nonavalent vaccine targets seven carcinogenic types (HPV16/18/31/33/45/52/58) that contribute to 90% of cervical cancer cases

◦ Effective tool for national cervical cancer screening in post-vaccination era

The HPV vaccination had a substantial impact on genotype distribution.

1. Monitoring infection dynamics such as type replacement or unmasking in a vaccinated population⁵⁾



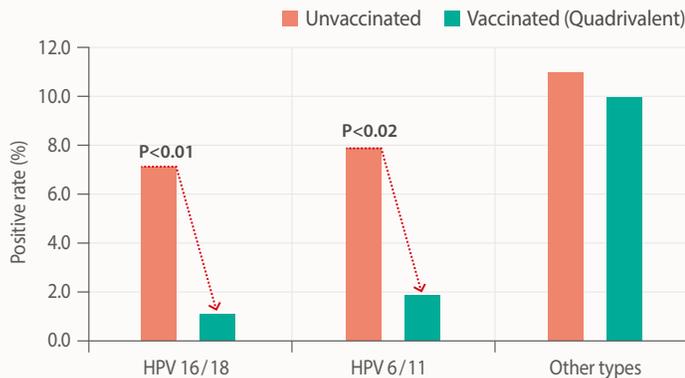
18~29 Yrs women (participant no.: 401)	Unvaccinated	Vaccinated
HPV positive rate	53.5%	46.4%
Most prevalent type	16, 31, 51	51, 58, 59

5) Latsuzbaia et al. *Cancer Epider.* (2019) 63:101593

Study 1. HPV prevalence and vaccine efficacy 8 years following the implementation of the vaccination program in Luxembourg

The overall prevalence of HPV showed a very similar rate between the two groups, however, the type distribution was dramatically changed in certain types covered by HPV vaccine and other types assuming cross-protection. For instance, HPV 16, 31, and 33 were significantly decreased in vaccinated women, but not in the unvaccinated group. Instead, other types such as HPV 51, 58, and 59 were found as the most frequent types in vaccinated women.

2. Measuring the efficacy affecting the vaccine policies and strategies⁶⁾



18~31 Yrs women (participant no.: 409)	Unvaccinated	Vaccinated
HPV 16/18 positive rate	7.2%	1.1%
HPV 6/11 positive rate	8.3%	2.1%
Other HR-HPV prevalent type	11.2%	10.3%

6) Jeannot et al. *Int. J. Environ. Res. Public Health* (2018) 15:1447

Study 2. Prevalence of vaccine type HPV in vaccinated and non-vaccinated women in Switzerland

The prevalence of four types, HPV6/11 and HPV 16/18, covered by the quadrivalent vaccine was significantly lower in vaccinated women, whereas cross-protection was not observed in this study.

The impact of Seegene's HPV assay in the post-vaccination era:

- Monitoring changes of HPV types in a vaccinated population
- Evaluating the prevalence of HPV vaccine types
- Measuring the efficacy and cross-protection of vaccine

Anyplex™ II HPV HR Detection is

clinically validated assay for primary cervical cancer screening

Anyplex™ II HPV HR Detection meets the international consensus validation metrics for HPV DNA tests for cervical cancer screening¹⁾²⁾

Clinical sensitivity & specificity of Anyplex™ II HPV HR Detection

Category		Clinical sensitivity	Clinical specificity
Test population & number		60 samples with ≥ CIN2	816 samples with < CIN2
Result	Reference Test (GP5+/6+-PCR)	98.3% (59/60)	94.1% (768/816)
	Anyplex™ II HPV HR	98.3% (59/60)	93.6% (764/816)
Relative analysis to reference test		100%	99.5%
Requirements		≥ 90%	≥ 98%

► The clinical sensitivity and specificity for CIN2+ of Anyplex™ II HPV HR Detection were non-inferior to those of GP5+/6+-PCR.

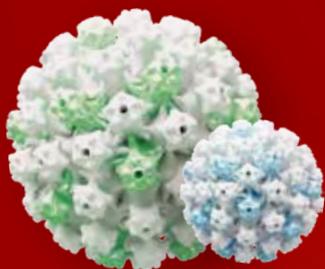
Inter-lab agreement & intra-lab reproducibility of Anyplex™ II HPV HR Detection

Category		Intra-laboratory reproducibility	Inter-laboratory agreement
Test population & number		505 samples	505 samples
Result	Agreement (95% CI)	96.0% (94.3~97.4)	96.8% (95.3~98.1)
	kappa value	0.91	0.93
Requirements	Lower 95% CI	≥ 87%	≥ 87%
	kappa value	≥ 0.5	≥ 0.5

► Anyplex™ II HPV HR Detection displayed sufficient intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement.

1) Hesselink AT et al. (2016) *Journal of Clinical Virology* 76:36-39

2) Meijer CJLM et al. (2009) *Int J Cancer* 124(3):516~20



Anyplex™ II

HPV HR Detection

- Screening of 14 high-risk HPV genotypes in a single reaction
- Multiplex real-time PCR for reliable results by utilization of DPO™ and TOCE™ technologies
- Amenable to automated sample handling and assay systems
- Utilization of the UDG system to prevent carry-over contamination
- Endogenous Internal Control for assay validity
- Convenient data interpretation by the Seegene Viewer

Ordering Information

Not Available for Sale in the United States

Product	Package Volume	Cat. No.
Anyplex™ II HPV HR Detection	100 rxns	HP7E00X
Anyplex™ II HPV28 Detection	100 rxns	HP7S00X
Instrument	Type	Cat. No.
CFX96™ Dx	Real-time PCR _ Optical Reaction Module	1845097-IVD
	Real-time PCR _ Thermal Cyclers	1841000-IVD
Seegene NIMBUS	Automated extraction & PCR Setup	65415-03
Seegene STARlet	Automated extraction & PCR Setup	67930-03
VCMS (Vial Cap Management System)	Automated Pre-analytic System	6600532-01
STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit	Nucleic acids extraction reagent	744800.4.UC384



Taewon Bldg. 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul 05548, Republic of Korea / Tel : +82-2-2240-4000 / Fax : +82-2-2240-4040 / E-mail : info@seegene.com

www.seegene.com

BRAZIL

Belo Horizonte, Brazil
Tel : +55-31-25153003
E-mail : contato@seegenebrazil.com.br

CANADA

Toronto, Canada
Tel : +1-800-964-5680
E-mail : canada@seegene.com

GERMANY

Düsseldorf, Germany
Tel : +49-211-9943-4260
E-mail : sgg@seegene.com

MEXICO

México city, México
Tel : + 52 (55)-8848-9646
E-mail : mexico@seegene.com

MIDDLE EAST

Dubai, UAE
Tel : +971-4-558-7110
E-mail : sgme@seegene.com

USA

California, USA
Tel : +1-925-448-8172
E-mail : usa@seegene.com



Bulletin 7053

Bio-Rad's CFX96 Dx System for in vitro diagnostic use is designed with reliability and performance in mind. With five-target detection, unsurpassed thermal cycler performance, and easy-to-use software, the CFX96 Dx is an open system offering the ultimate flexibility in commercial assay selection or rapid assay development.

The CFX96 Dx System makes it easy for you to:

- Generate robust results right away with factory-calibrated optics and fast system setup
- Conserve samples and reduce reagent cost using up to 5-target multiplexing with reaction volumes as low as 10 μ l
- Streamline data analysis with built-in analysis modules and sophisticated quality control (QC) tools
- Create a personalized system setup with user-specific system access settings and flexible instrument configurations



Specifications

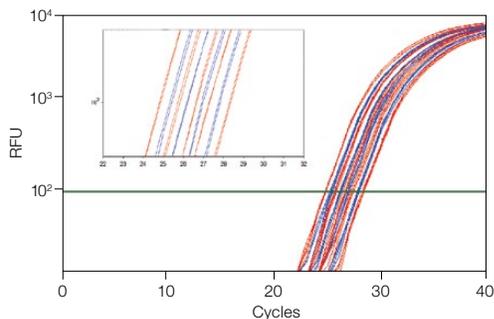
C1000 Dx Thermal Cycler with CFX96 Dx ORM*			
Maximum ramp rate	5°C/sec	Gradient	
Average ramp rate	3.3°C/sec	Operational range	30–100°C
Heating and cooling method	Peltier	Programmable span	1–24°C
Lid	Heats up to 105°C	Temperature range	0–100°C
		Temperature accuracy	±0.2°C of programmed target at 90°C
		Temperature uniformity	±0.4°C well-to-well within 10 sec of arrival at 90°C
Optical Detection			
Excitation	6 filtered LEDs	Dynamic range	10 orders of magnitude
Detection	6 filtered photodiodes	Scan time	
Range of excitation/ emission wavelengths	450–730 nm	All channels	12 sec
Sensitivity	Detects 1 copy of target sequence in human genomic DNA	Single-channel fast scan	3 sec
Software			
Operating systems	Windows 7 (32-bit, 64-bit), Windows 10 (64-bit)		Allelic discrimination
Memory	Minimum of 1 GB		End-point analysis
Multiplex analysis	Up to 5 targets per well	Data export	Save, copy, and print all graphs and spreadsheets from right-click menu
Data analysis modes	PCR quantification with standard curve		Export specified data in multiple formats
	Melt curve analysis		Copy and paste into Microsoft Excel, Word, or PowerPoint file
	Gene expression analysis by relative quantity (Δ Cq) or normalized expression ($\Delta\Delta$ Cq) with multiple reference genes and individual reaction efficiencies		Customizable reports containing run settings, data graphs, and spreadsheets can be directly printed or saved as PDFs
	Data analysis options include bar chart, clustergram, scatter plot, volcano plot, and heat map		
	Multiple file gene expression analysis for comparison of an unlimited number of quantification cycle (Cq) values		
System			
Sample capacity	96 wells	Dimensions (W x D x H)	33 x 46 x 36 cm (13 x 18 x 14 in.)
Sample size	1–50 μ l (10–25 μ l recommended)	Weight	21 kg (47 lb)
Communication	USB 2.0	Real-time PCR license	Yes
Electrical approvals	IEC, CE	In vitro diagnostic license	Yes
		CE-IVD mark	Yes

* Optical Reaction Module.

Simplicity Through Innovation

The CFX96 Dx System is built on Bio-Rad's proven 1000-series thermal cycling platform. The system incorporates innovative optical technologies with long-lasting LEDs and solid-state components to provide maximum reliability and flexibility.

- Scanning optics read each well individually with high sensitivity and no cross talk to deliver optimal quantitative results
- Multiple data acquisition modes, including a fast scan option for EvaGreen® or SYBR® Green I users and an all channels mode to detect up to 5 targets in a single well, let a run be tailored to suit the application
- Several control configurations are available — run a stand-alone system or independently run up to 4 instruments from 1 computer
- A startup wizard, intuitive experiment setup, and streamlined data analysis enable fast result turnaround



Exceptional reproducibility can be achieved with SsoFast EvaGreen® Supermix. Efficient discrimination and reliable quantification can be obtained from 1.33-fold serial dilutions of input template. The *CBP* gene was amplified from varying amounts of human genomic DNA. From left to right: (■) 5 ng, 2.83 ng, 1.60 ng, 903 pg, and 511 pg; (■) 3.76 ng, 2.13 ng, 1.20 ng, and 679 pg. *CBP* efficiency = 96.5%, $R^2 = 0.996$. Inset is a magnified view showing robust discrimination and reproducible amplification. RFU, relative fluorescence units.

Software Solutions for Accurate Results

CFX Manager Dx Software offers tools to simplify real-time PCR for every laboratory. Immediately generate results using the Startup Wizard and intuitive experiment setup. Enter or edit well information before, during, or after a run.

Analyze data when and where you want by receiving an email with an attached data file when a run is completed. When data are in hand, use the comprehensive data analysis, QC, and report tools to take the guesswork out of analyzing and reporting results for any real-time PCR application.

The CFX96 Dx System is licensed for human in vitro diagnostics and all other applied fields. The system is CE-IVD marked in compliance with the European Union diagnostic medical device manufacturing standards.

Ordering Information

To order the CFX96 Dx System, you must include both catalog numbers.

Catalog #	Description
1845097-IVD	CFX96 Dx ORM , includes CFX Manager Dx Software, version 3.1 (catalog number 12007917)
1841000-IVD	C1000 Dx Thermal Cycler

USA: For in vitro diagnostic (IVD) use. The CFX96 Dx System and CFX96 Deep Well Dx System are registered with the U.S. FDA as Class II 510(k) exempt devices.

Canada: The CFX96 Dx System and CFX96 Deep Well Dx System are registered as Class I devices.

China: The CFX96 Deep Well Dx System has been certified as a Class III medical device by China's National Medical Products Administration (NMPA).

EU: For in vitro diagnostic use. The CFX96 Dx and CFX96 Deep Well Dx Systems meet the requirements of the In Vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC). The CE IVD-registered CFX96 Dx and CFX96 Deep Well Dx Systems are for distribution and use in EU countries only (Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Ireland, Italy, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Portugal, Slovenia, Spain, and Sweden).

Worldwide: The CFX96 Dx and CFX96 Deep Well Dx Systems are for sale for in vitro diagnostic use in the following countries:

- Americas: Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, El Salvador, Guatemala, Paraguay, and Venezuela
- Asia-Pacific: Australia, Brunei, Hong Kong, India, Laos, Mongolia, New Zealand, Pakistan, Philippines, Singapore, South Korea, Taiwan, Thailand, and Vietnam
- Europe, Middle East, and Africa: Belarus, Egypt, Morocco, Netherlands, Norway, Qatar, Saudi Arabia, Switzerland, Turkey, Ukraine, United Kingdom, and Yemen

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc.

EvaGreen is a trademark of Biotium, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Biotium, Inc. to sell reagents containing EvaGreen Dye for use in real-time PCR, for research purposes only. SYBR is a trademark of Thermo Fisher Scientific Inc.

Notice regarding high resolution melt analysis:

No rights are granted by Bio-Rad for the use of high resolution melt analysis in the fields of human or veterinary in vitro diagnostics. In addition, it is the responsibility of the purchaser to obtain any intellectual property rights which may be required for its specific applications.

All trademarks used herein are the property of their respective owner.

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23 Brazil 4003 0399
Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23 Finland 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050
Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23 Sweden 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311 United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23





Short communication



Clinical validation of Anyplex™ II HPV HR Detection according to the guidelines for HPV test requirements for cervical cancer screening



A.T. Hesselink^a, R. Sahli^b, J. Berkhof^c, P.J.F. Snijders^d, M.L. van der Salm^a, D. Agard^d, M.C.G. Bleeker^d, D.A.M. Heideman^{d,*}

^a Self-screen B.V., Amsterdam, The Netherlands

^b Institute of Microbiology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

^c Department of Epidemiology and Biostatistics, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

^d Department of Pathology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2015

Received in revised form

12 December 2015

Accepted 12 January 2016

Keywords:

HPV

CIN2/3

Test requirements

Primary cervical cancer screening

ABSTRACT

Background: Anyplex™ II HPV HR Detection (Seegene, Seoul, Korea) is a multiplex real-time PCR using tagging oligonucleotide cleavage and extension (TOCE) technology for simultaneous detection and genotyping of 14 high-risk (HR) HPV types, including HPV16 and HPV18.

Objectives: To evaluate whether the clinical performance and reproducibility of Anyplex™ II HPV HR Detection meet the international consensus guidelines for HPV test requirements for cervical cancer screening [1].

Study design: The clinical performance of Anyplex™ II HPV HR Detection for detecting cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse (CIN2+) was determined relative to that of the reference assay, i.e., HR HPV GP5+/6+-PCR-EIA, by analysis of a total of 879 cervical liquid based cytology (LBC) specimens from a screening population, of which 60 were from women with CIN2+. The intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement were determined on 509 LBC samples, of which 172 were positive by the reference assay.

Results: Anyplex™ II HPV HR Detection showed a clinical sensitivity for CIN2+ of 98.3% (59/60; 95% CI: 89.1–99.8) and a clinical specificity for CIN2+ of 93.6% (764/816; 95% CI: 89.8–96.1). The clinical sensitivity and specificity were non-inferior to those of HR HPV GP5+/6+-PCR-EIA (non-inferiority score test: $P=0.005$ and $P=0.023$, respectively). Both intra-laboratory reproducibility (96.8%; 95% CI: 95.3–98.1; kappa value of 0.93) and inter-laboratory agreement (96.0%; 95% CI: 94.3–97.4; kappa value of 0.91) were high.

Conclusions: Anyplex™ II HPV HR Detection performs clinically non-inferior to HR HPV GP5+/6+-PCR-EIA. Anyplex™ II HPV HR Detection complies with international consensus validation metrics for HPV DNA tests for cervical cancer screening [1].

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Background

HPV testing is increasingly considered for primary cervical cancer screening. To ensure high-quality screening, clinical utility of HPV assays has to be demonstrated. In 2009, an international consortium proposed criteria for assay validation in primary

screening context based on minimal relative clinical accuracy of a given HPV assay compared to a clinically validated reference (i.e., Hybrid Capture 2 or high-risk (HR) HPV GP5+/6+-PCR-EIA), and minimal intra- and inter-laboratory reproducibility [1,2]. Several HPV assays have partially or completely been clinically validated using these criteria [3]. An assay not yet evaluated according to these international consensus validation metrics is Anyplex™ II HPV HR Detection (Seegene, Seoul, Korea). Anyplex™ II HPV HR Detection comprises an automated system from specimen handling to HPV result, including an automated instrument Microlab Nimbus IVD or STARlet (Hamilton) for DNA isolation and real-time PCR setup, subsequent HPV testing with CFX96 PCR instrument (Bio-Rad), and data analysis with Seegene Viewer (Seegene).

Abbreviations: TOCE, tagging oligonucleotide cleavage and extension; HR, high-risk; HPV, human papillomavirus; CIN2+, cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse; LBC, liquid based cytology; BMD, borderline or mild dyskaryosis.

* Corresponding author at: Department of Pathology, VU University Medical Center, de Boelelaan 1117, 1081HV Amsterdam, The Netherlands. Fax: +31 20 4444586. E-mail address: dam.heideman@vumc.nl (D.A.M. Heideman).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.009>

1386-6532/© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

The multiplex real-time PCR design using tagging oligonucleotide cleavage and extension (TOCE) technology allows for simultaneous detection and genotyping of 14 high-risk (HR) HPV types, including HPV16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66, and -68 (L1 gene), and an internal control (human beta-globin) in a single reaction [4].

2. Objective

The current study was set out to determine whether Anyplex™ II HPV HR Detection meets the international guidelines for primary screening [1] by comparing its clinical sensitivity and specificity for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse (CIN2+) to that of the reference HR HPV GP5+/6+-PCR-EIA (further referred to as GP5+/6+-PCR), and assessing intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement.

3. Study design

3.1. Study population

For clinical sensitivity analysis, a representative set of 60 cervical liquid based cytology (LBC) samples (PreservCyt) from women participating in population-based screening in the Netherlands, who were diagnosed with histologically confirmed CIN2+, were used. These comprised 25 CIN2, 31 CIN3, and 4 squamous cell carcinomas. The median age of the women was 40 years (range 30–60 years). These clinical cases were detected on the basis of an abnormal cytology result and/or a positive result by GP5+/6+-PCR [5]. The samples of 43 (72%) of these women revealed abnormal cytology (5 borderline or mild dyskaryosis (BMD) and 38 >BMD), 17 (28%) had normal cytology, and all but one (98.3%) were positive by GP5+/6+-PCR.

For clinical specificity analysis, we used 819 consecutively collected LBC samples (PreservCyt) from the screening population of women (median age of 41 years, range 31–60 years) with normal cytology and without evidence of CIN2+ within 2 years of follow-up.

Intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement of Anyplex™ II HPV HR Detection were evaluated using three equal portions of in total 509 cervical PreservCyt samples, of which one-third was positive by GP5+/6+-PCR (172/509; 33.8%). Two portions were tested in a blinded manner within the same laboratory (Lab A; VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) by different technicians at different time points. The third set was analyzed blinded for the results of lab A, at another laboratory (Lab B; Institute of Microbiology, CHUV, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland).

All LBC samples were stored in aliquots at -80°C until further use.

3.2. Anyplex™ II HPV HR Detection

Anyplex™ II HPV HR Detection comprising DNA extraction, HPV testing and data analysis, was performed according to the manufacturer's instructions (Seegene, Seoul, Korea). In short, up to 40 clinical samples per run were processed by the automated system with a laboratory working time from specimen handling to HPV result of approximately 6 h (i.e., 2 h for DNA extraction, 3 h 40 min for PCR amplification with three melting analyses, and hands-on time of 15–20 min for specimen handling and 10 min for PCR machine handling).

3.3. Statistical analyses

Anyplex™ II HPV HR Detection was performed blinded for earlier obtained GP5+/6+-PCR-EIA results [5] and cyto-/histopathology outcomes, and data were correlated afterwards. Clinical sensitivity and specificity values for CIN2+ of Anyplex™ II HPV HR Detection were compared to those of GP5+/6+-PCR using a non-inferiority score test, as described by Tang et al. [6], with a relative sensitivity threshold for CIN2+ of 90% and a relative specificity threshold for CIN2+ of 98% as proposed in the consensus guidelines [1]. For intra-laboratory and inter-laboratory analyses, the agreement and kappa values were determined. The 95% lower confidence bounds of the intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement values should be $\geq 87\%$, with kappa values of ≥ 0.5 . Only samples with valid test results were included in the analyses. The level of genotype agreement was determined by using kappa statistic. Association between semi-quantitative viral load values (based on signal intensity scores +, ++, or +++), and discordance was evaluated with chi-square test for trend. The level of statistical significance was set at 0.05.

4. Results

4.1. Clinical sensitivity and clinical specificity

Of the 879 cervical LBC samples for clinical sensitivity and specificity analyses, 876 (99.7%) revealed valid results with Anyplex™ II HPV HR Detection. Agreement between Anyplex™ II HPV HR Detection and GP5+/6+-PCR was high. All 60 samples of women with CIN2+ (100%; 95% CI: 94.0–100; cases) and 788 of 816 samples of the specificity set (96.6%; 95% CI: 93.3–98.3; controls) showed an identical outcome with both tests (Table 1).

Table 1
Anyplex™ II HPV HR Detection on 876 cervical LBC samples from population-based screening stratified by case-control status.

Controls (<CIN2)		GP5+/6+-PCR ^b		Total
		HR HPV negative	HR HPV positive	
Anyplex™ II HPV HR Detection ^a	HR HPV negative	752	12	764
	HR HPV positive	16	36	52
	Total	768	48	816
Cases (CIN2+)				
Anyplex™ II HPV HR Detection ^a	HR HPV negative	1	0	1
	HR HPV positive	0	59	59
	Total	1	59	60

^a Input in PCR comprising 1/650 fraction of the cervical scrape.

^b DNA was extracted from cervical scrapes using the Nucleo-Mag 96 Tissue kit (Macherey–Nagel, Germany) and Microlab Star robotic system (Hamilton, Germany) according to manufacturers' instructions. Ultimately, input in PCR comprised 1/400 fraction of the cervical scrape.

Table 2A
Intra-laboratory reproducibility over time of Anyplex™ II HPV HR Detection.

Lab A, result run 1	Lab A, result run 2		Total
	HR HPV negative	HR HPV positive	
HR HPV negative	334	9	343
HR HPV positive	11	151	162
Total	345	160	505

Table 2B
Inter-laboratory agreement of Anyplex™ II HPV HR Detection.

Lab B	Lab A, result run 1 ^a		Total
	HR HPV negative	HR HPV positive	
HR HPV negative	336	8	344
HR HPV positive	8	153	161
Total	344	161	505

^a Similar results were obtained when using results of run 2 from Lab A: agreement of 96.2% (95% CI: 94.6–97.6) with a kappa value of 0.91.

Anyplex™ II HPV HR Detection was positive for 59 women with CIN2+, resulting in a clinical sensitivity for CIN2+ of 98.3% (59/60; 95% CI: 89.1–99.8) (Table 1, cases). The clinical specificity for CIN2+ was 93.6% (764/816; 95% CI: 89.8–96.1) (Table 1, controls). By comparison, these figures were 98.3% (59/60; 95% CI: 89.1–99.8) and 94.1% (768/816; 95% CI: 90.3–96.5), respectively, for GP5+/6+-PCR (Table 1). Both clinical sensitivity and specificity for CIN2+ of Anyplex™ II HPV HR Detection were non-inferior to that of GP5+/6+-PCR, i.e., relative clinical sensitivity for CIN2+ of 1.00 ($P=0.005$) and relative clinical specificity for CIN2+ of 0.99 ($P=0.023$).

4.2. Intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement

Of the 509 samples, 506 (99.4%) had a valid test result in run 1 at lab A, 507 (99.6%) in run 2 at lab A, and one sample had insufficient material left for testing at lab B, leaving 505 samples with valid data for both intra- and inter-laboratory analyses. The intra-laboratory reproducibility over time was 96.0% (485/505; 95% CI: 94.3–97.4), with a kappa value of 0.91 (Table 2A).

The inter-laboratory agreement was 96.8% (489/505; 95% CI: 95.3–98.1), with a kappa value of 0.93 (Table 2B).

Both the intra-laboratory reproducibility over time and the inter-laboratory agreement fulfilled the validation metrics given a lower confidence bound of percentage of agreement that was higher than 87%, and a corresponding kappa value that was higher than 0.5 [1]. Most samples with discrepant findings (18/20 in intra-lab and 13/16 in inter-lab analysis) had low signal intensity (score +), suggesting association of discrepant results with low viral loads ($P=0.0008$ and $P=0.007$, respectively).

At the genotype level, moderate to perfect agreement was observed, with overall kappa of 0.87 (range: 0.50–1.00) and 0.89 (range: 0.54–1.00) for intra- and inter-laboratory genotyping agreement, respectively (Tables 3A and 3B). Discrepant results at the type-specific level, that were most commonly found for HPV39 and HPV45, mostly concerned multiple infections and low signal intensities for respective types.

5. Conclusions

In this study, we compared the clinical performance of Anyplex™ II HPV HR Detection with that of GP5+/6+-PCR in a cohort of screening participants. The clinical sensitivity and specificity for CIN2+ of Anyplex™ II HPV HR Detection were non-inferior to those

Table 3A
Intra-laboratory reproducibility of genotype findings of Anyplex™ II HPV HR Detection.

HR HPV type	Number of samples found positive by ^a			Kappa	95%CI
	Both runs				
	Run 1 only	Run 2 only			
16	49	6	2	0.92	0.86–0.97
18	20	1	3	0.91	0.82–1.00
31	17	2	4	0.84	0.72–0.97
33	12	0	0	1.00	–
35	6	1	0	0.92	0.77–1.00
39	11	6	6	0.64	0.44–0.83
45	3	1	5	0.50	0.15–0.84
51	15	2	1	0.91	0.80–1.00
52	17	1	1	0.94	0.86–1.00
56	14	1	4	0.84	0.71–0.98
58	7	0	3	0.82	0.62–1.00
59	5	1	1	0.83	0.60–1.00
66	12	1	0	0.96	0.88–1.00
68	12	0	3	0.89	0.76–1.00

^a Data are presented as the number of each genotype detected in each run (i.e., run 1 and/or run 2), and numbers do not count up to the total number of HR HPV positive samples due to multiple infections.

Table 3B
Inter-laboratory agreement of genotype findings of Anyplex™ II HPV HR detection.

HR HPV type	Number of samples found positive by ^a			Kappa	95% CI
	Both labs				
	Lab 1 only	Lab 2 only			
16	51	3	3	0.94	0.89–0.99
18	21	0	2	0.95	0.89–1.00
31	19	0	3	0.92	0.84–1.00
33	11	1	0	0.96	0.87–1.00
35	7	0	0	1.00	–
39	11	5	5	0.68	0.49–0.87
45	3	1	4	0.54	0.18–0.90
51	16	1	1	0.94	0.85–1.00
52	16	2	0	0.94	0.85–1.00
56	14	1	8	0.75	0.59–0.91
58	7	0	2	0.87	0.70–1.00
59	6	0	1	0.92	0.77–1.00
66	12	1	2	0.89	0.76–1.00
68	11	1	2	0.88	0.74–1.00

^a Data are presented as the number of each genotype detected at each location (i.e., laboratory 1 and/or 2), and numbers do not count up to the total number of HR HPV positive samples due to multiple infections.

of GP5+/6+-PCR using the predetermined thresholds of 90% and 98%, respectively, as set out by the international consortium [1]. Furthermore, the assay displayed sufficient intra-laboratory reproducibility and inter-laboratory agreement, both complying with the international consensus validation metrics for HPV DNA tests for cervical cancer screening [1]. Based on our findings, Anyplex™ II HPV HR Detection can be added to the list of HPV assays that fulfill the 2009 guidelines [3].

Anyplex™ II HPV HR Detection adds to some other validated assays [3] that it directly provides genotyping data of 14 HR HPV types. Genotyping data turned out to be highly reproducible in this study as well, with moderate to perfect agreement. Although at present genotyping of non-HPV16/18 types is in the current guidelines not recommended for primary cervical screening, it may be useful in the future for measuring persistence of a specific HR HPV type in certain setting (e.g., post-treatment monitoring of women treated for high-grade CIN).

In conclusion, this study demonstrates that Anyplex™ II HPV HR Detection is clinically non-inferior to GP5+/6+-PCR. The clinical performance and reproducibility of the assay meet the international

criteria for validation of an HPV test for cervical cancer screening purposes [1].

Funding

This research was supported by a grant from Seegene. The source of funding did not have any influence on the design and the analysis of the results.

Ethical approval

This study followed the local ethical guidelines of VU University Medical Center.

Competing interests

ATH and MLS are employees of Self-screen B.V. DAMH and PJFS have minority stake in Self-screen BV, a spin-off company of VU University Medical Center. DAMH has been on the speaker's bureau of Hologic/Gen-Probe and serves occasionally on the scientific advisory boards of AMGEN and Pfizer. JB has received consultancy or speaker fees from Qiagen, Roche, DDL, Merck and GSK. PJFS has

been on the speaker's bureau of Roche, Abbott, Gen-Probe, Qiagen and Seegene. He is consultant for Crucell Holland B.V. All other authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] C.J. Meijer, J. Berkhof, P.E. Castle, A.T. Hesselink, E.L. Franco, G. Ronco, M. Arbyn, F.X. Bosch, J. Cuzick, J. Dillner, D.A. Heideman, P.J. Snijders, Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older, *Int. J. Cancer* 124 (2009) 516–520.
- [2] C.J. Meijer, H. Berkhof, D.A. Heideman, A.T. Hesselink, P.J. Snijders, Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening, *J. Clin. Virol.* 46 (Suppl. 3) (2009) S1–S4.
- [3] M. Arbyn, P.J. Snijders, C.J. Meijer, J. Berkhof, K. Cuschieri, B.J. Kocjan, M. Poljak, Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin. Microbiol. Infect.* 21 (2015) 817–826.
- [4] M.J. Kwon, K.H. Roh, H. Park, H.Y. Woo, Comparison of the anyplex II HPV28 assay with the hybrid capture 2 assay for the detection of HPV infection, *J. Clin. Virol.* 59 (2014) 246–249.
- [5] P.J.F. Snijders, A.J.C. Van den Brule, M.V. Jacobs, R.P. Pol, C.J.L.M. Meijer, HPV DNA detection and typing in cervical scrapes by general primer GP5+/6+PCR, in: C.E. Davy, J. Doorbar (Eds.), *Method in Molecular Medicine: Human Papillomaviruses-Methods and Protocols*, vol. 119, Humana Press, Totowa, USA, 2005, pp. 101–114.
- [6] N.S. Tang, M.L. Tang, I.S. Chan, On tests of equivalence via non-unity relative risk for matched-pair design, *Stat. Med.* 22 (2003) 1217–1233.

Powerful data analysis software for Seegene's multiplex MDx assays

Seegene Viewer

Automated data analysis for multiplex real-time PCR

Seegene Viewer is designed to enable users to simply access to automated data analysis for Seegene's high multiplex real-time PCR assays. The software allows identification and differentiation for both Ct value of multiple targets in a single channel as well as melting curve analysis.



Automated data interpretation

- Quick and precise interpretation results for Seegene's various multiplex assays
- Customizable reporting format to interlock with LIS
- Selective panel integration based on sample number/patient identification/well/name

- Seegene Viewer User Interface (Result of Allplex™ Respiratory Panel Assays)

Sample No	Patient Id	Well	Name	Type	FAM		HEX		Cal Red 616		Quasar 670		Auto Interpretation	Comment								
					RSV A Ct	Flu A Ct	RSV B Ct	Flu B Ct	gdm60 Ct	H1 Ct	H3 Ct	IC Ct			IC Ct							
0006	0006	F01	S	SAMPLE	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	26.55									
		F04	S		P1V4	Ct	MPV	Ct	P1V2	Ct	P1V1	Ct	Adv	Ct	HEV	Ct	P1V3	Ct	IC	Ct	25.57	
		F07	S		OC43	Ct	HRvV	Ct	229E	Ct	NL63	Ct	HRV	Ct		Ct	IC	Ct	26.56			
		F10	S		SP	Ct	LP	Ct	HI	Ct	SPP	Ct	MP	Ct	SP	Ct	CP	Ct	IC	Ct	26.24	
001					RSV A	Ct	Flu A	Ct	RSV B	Ct	Flu B	Ct	gdm60	Ct	H1	Ct	H3	Ct	IC	Ct	26.20	
					P1V4	Ct	MPV	Ct	P1V2	Ct	P1V1	Ct	Adv	Ct	HEV	Ct	P1V3	Ct	IC	Ct		

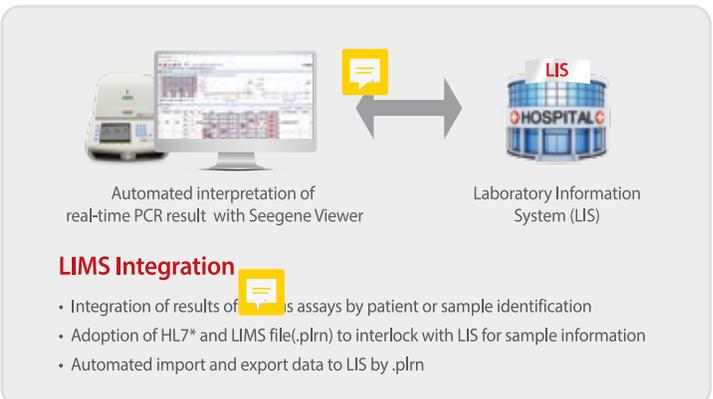


User friendly interface

- Provide 12 languages
- Customized assay selection
- Convenient readout of multiple sample results by color-coded interpretation

Optimized for Seegene technology

- Two individual Ct values in a single channel
- Semi-quantification analysis by cyclic-CMTA in melting curve analysis



Operation software for NIMBUS IVD and STARlet IVD

Seegene Launcher

Optimized operation software for Seegene's simultaneous multiple assays

Seegene Launcher is an operation program which includes protocol for Seegene's various molecular diagnostic (MDx) assays.

This software can perform the entire process from nucleic acid extraction to PCR setup or selectively perform extraction or PCR setup



Interlocking with laboratory information system (LIS)



*HL7, (Health Level Seven), is a standard for exchanging information between medical applications

• COMPONENT

Independent liquid channels	8 ea
CO-RE gripper arm for labware movements	1 set
Sample carrier :	
Sample carrier for 32 specimens	3 ea
Sample carrier for 24 specimens (optional)	4 ea
Sample carrier for 12 specimens (optional)	8 ea
Tip carrier	2 ea
Magnetic seperater	1 ea
Heater/Shaker (up to 100 °C)	2 ea
PCR plate carrier	2 ea
Extract cartridge rack	2 ea
PCR reagent rack	2 ea

• SPECIFICATION

Power Input	115-230V, 50-60 Hz
Power consumption	Maximum 600 W
Dimensions	1124 (W)x795 (D)x903 (H) mm
Weight	140 Kg
Sample capacity	1-94 samples
TAT (94 test)	155 min for whole process
Pipetting channel	8 channels
Dispensing precision (when using 300µl tip)	10µl: 2%, 50µl: 0.75%, 200µl: 0.75%
Dispensing precision (when using 1,000µl tip)	10µl: 3.5%, 100µl: 0.75%, 1000µl: 0.75%
Positional accuracy	0.1 mm on X-Y-Z

• ORDERING INFORMATION

Category	Products	Cat. No.	
Instrument	CFX96™	Optical Reaction Module	1845097-IVD
		Thermal Cycler	1841000-IVD
	Microlab STARlet IVD	173000-075	
	Microlab NIMBUS IVD	65415-02	
Extraction reagent	STARMag 96 x 4 Universal Cartridge Kit	744300.4.UC384	
Consumable	Microlab NIMBUS IVD	High Volume Tips(1000 µl)	235905
		Standard Volume Tips (300 µl)	235903
		NIMBUS-Waste Bag	65803-01
		NIMBUS-96 Deep Well Micro Plate	SDP0096

One-step process from nucleic acid extraction to PCR setup

STARlet IVD

(Microlab STARlet IVD)

CE-IVD
Marked



Seegene Inc.
 Taewon Bldg. 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul 05548, Republic of Korea
 Tel : +82-2-2240-4000 / Fax : +82-2-2240-4040
 E-mail : info@seegene.com

Seegene TECHNOLOGIES Inc.
 California, USA
 Tel : +1-925-332-5664
 E-mail : usa@seegene.com

Seegene MIDDLE EAST
 Dubai, UAE
 Tel : +971-4-558-7110
 E-mail : sgme@seegene.com

Seegene CANADA Inc.
 Toronto, Canada
 Tel : +1-800-964-5680
 E-mail : canada@seegene.com

Seegene GERMANY GmbH
 Düsseldorf, Germany
 Tel : +49-211-9943-4260
 E-mail : eu@seegene.com

www.seegene.com

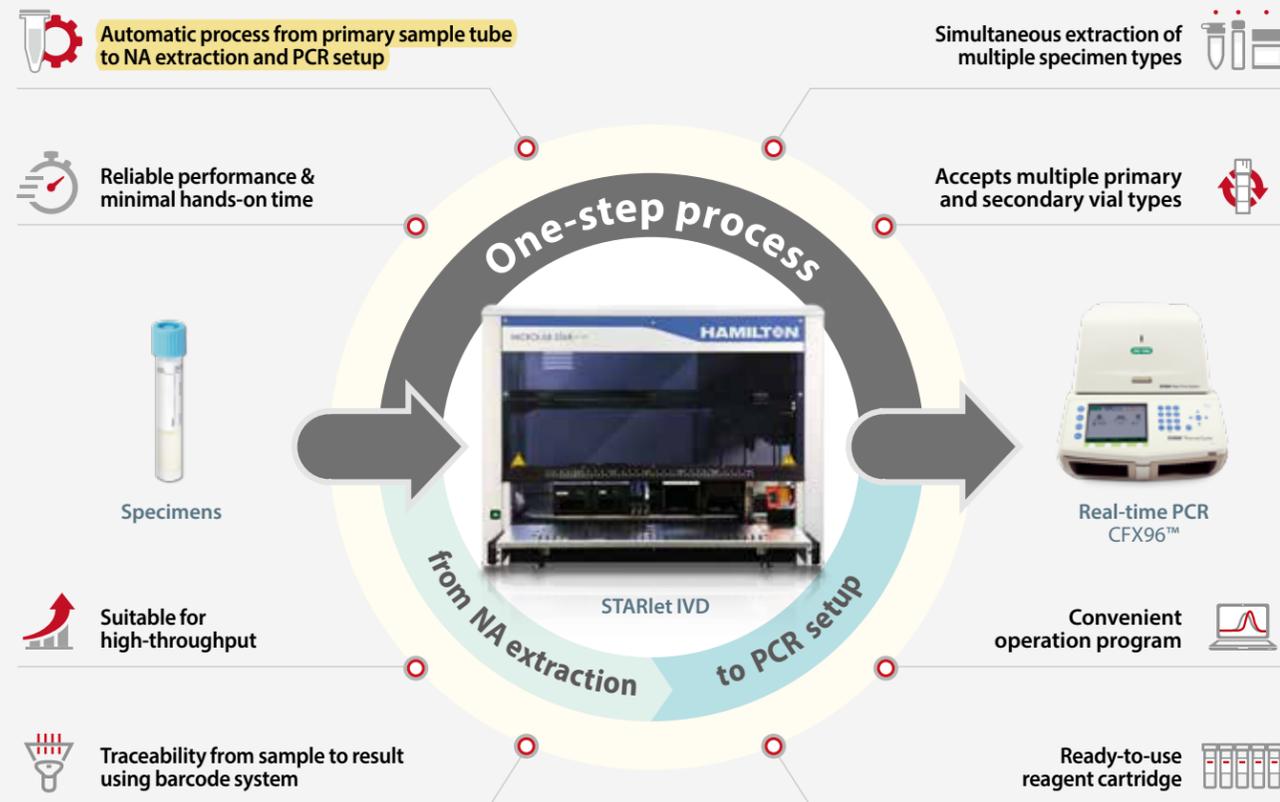


00ST-EN180212B-01

STARlet IVD (Hamilton)

STARlet IVD is an easy-to-use liquid handling workstation from primary sample tube to nucleic acid (NA) extraction and PCR setup. It provides convenient process of your lab works by minimizing hands-on time and maximizing assay reliability.

Effortless NA extraction and PCR setup for multiple specimens



Universal Cartridge Kit



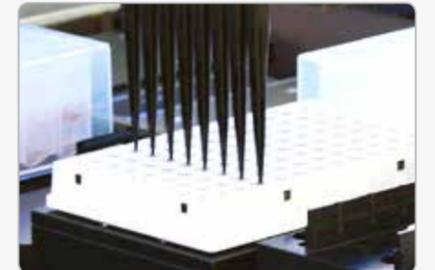
- Whole Blood
- Serum
- Plasma
- Cells
- Urine
- LBC (Liquid based cytology) specimen
- Swabs (Nasopharyngeal, Vaginal, Cervical, Urethral Rectal)
- Aspirate (Nasopharyngeal)
- BAL (Bronchoalveolar lavage)
- Sputum
- Stool
- Cary-Blair
- CSF

One-step process from NA extraction to PCR setup

- ▶ Maximized user convenience by minimizing hands-on time
- ▶ Selectable functions : entire process from NA extraction to PCR setup, extraction only, and PCR setup only
- ▶ Reduction of potential for contamination and human error



When separate extraction instruments are already set up, it can be exclusively used for PCR setup.



All-in-One platform for broad multiplex MDx assays

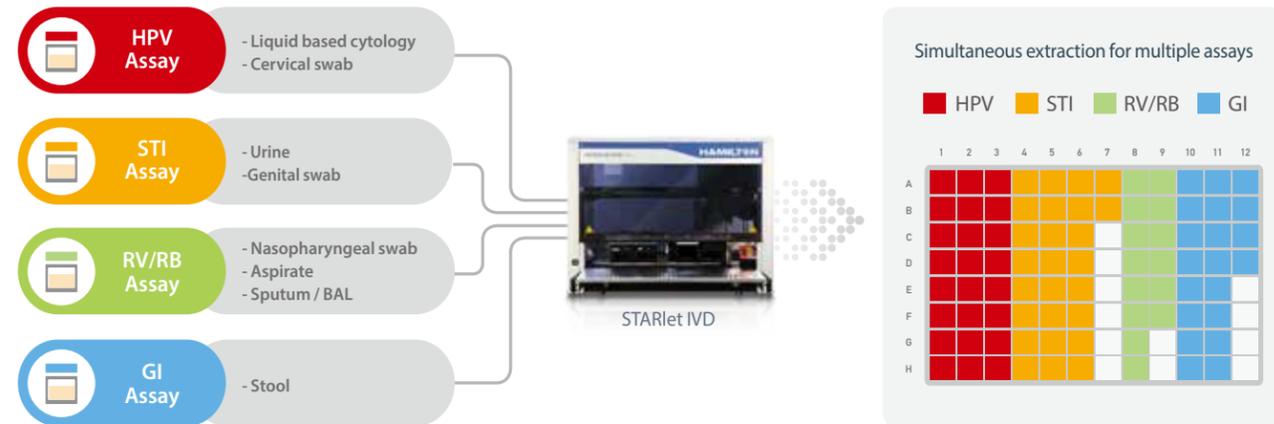
- ▶ One platform to cover various disease areas
- ▶ Cost-effective to utilize one provider for all solution

* In development



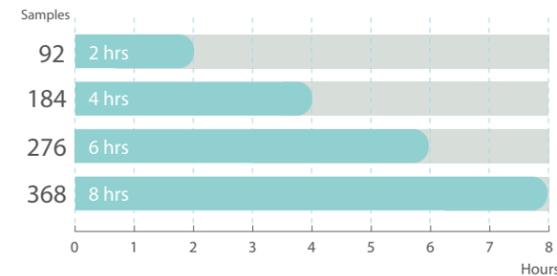
Simultaneous nucleic acid extraction of multiple sample types

- ▶ Single set of reagent for extraction of bacterial, viral, genomic, parasitic, fungal DNA and/or RNA from multiple specimen types
- ▶ Enhanced efficiency of working hours by reducing sample process time



Suitable for high-throughput

- ▶ Fast NA extraction from primary specimen (368 samples within 8 hours)
- ▶ Simplified workflow for medium to large clinical laboratory



Convenient operation using 'Seegene Launcher' program

- ▶ Intuitive tutorial session for each step of entire process
- ▶ Easy integration of sample information by barcode scanner or LIS
- ▶ Convenient to trace remaining reagent volume by barcode system
- ▶ One click away to run various assays



Direct loading of primary sample tubes



Component



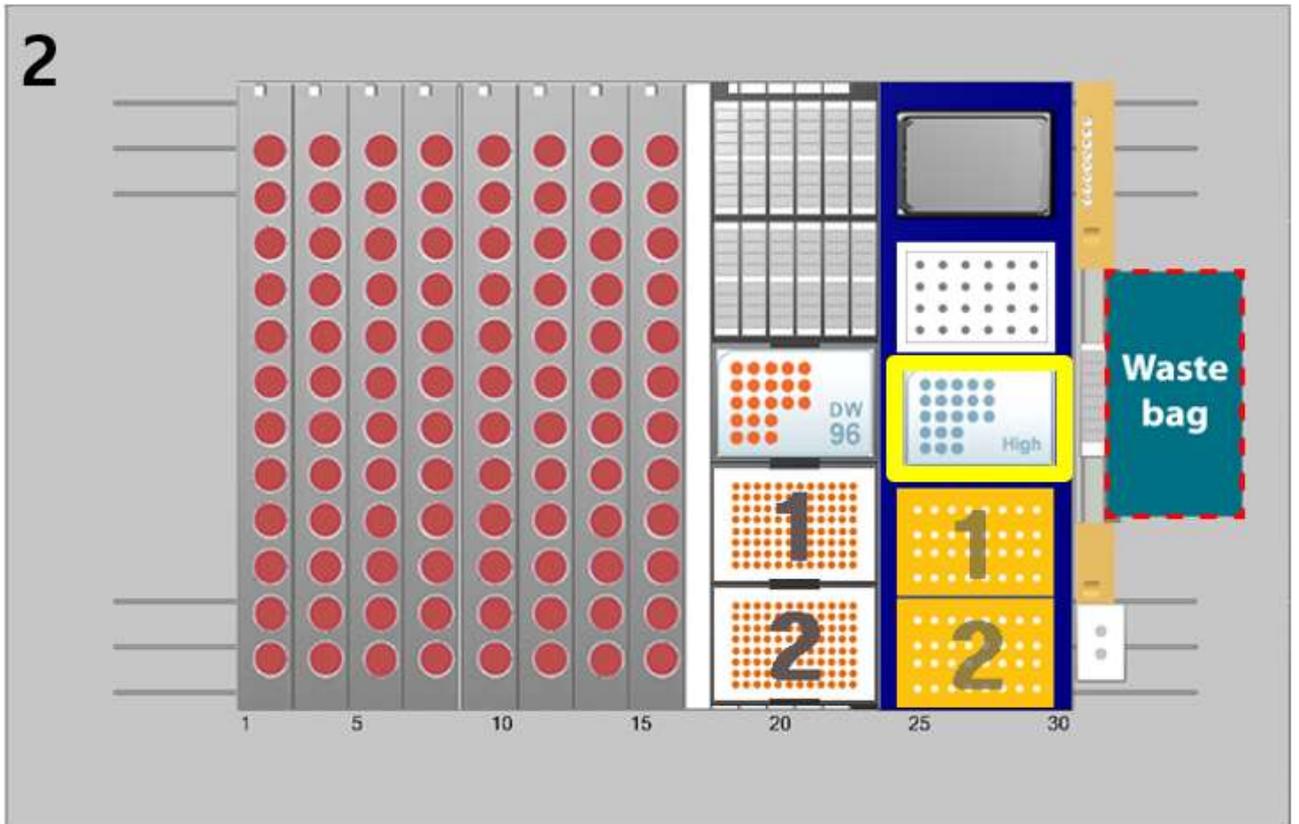
- 1 Disposable filter tip** (300µL, 1000µL)
- 2 Sample carrier** for 1.5mL tube or primary tube
- 3 Plate carrier**
 - Extraction reagent rack : 2ea
 - 96 DWP rack : 1ea
 - PCR plate rack : 2ea
- 4 Heater and shaker** for increasing extraction efficiency
- 5 Robotic arm** for accurate dispensing control of individual 8 channel
- 6 PCR reagent rack**
- 7 Built-in barcode scanner** for reading of sample and consumables

Ready-to-use reagent cartridge system

- ▶ Predisposed extraction reagents to run 96 tests in one cartridge
- ▶ Eliminate hands-on time for reagent preparation
- ▶ Verify reagent volume by barcode system



Starlet sistemos darbastalis. Į Starlet sistemą galima patalpinti 96 vnt. ThinPrep indelius (pirminius indelius).
Paveikslėlyje tau 8 stovai po 12 lizdų, pažymėtų raudonais apskritimais.



Pre-analytical system for better workflow

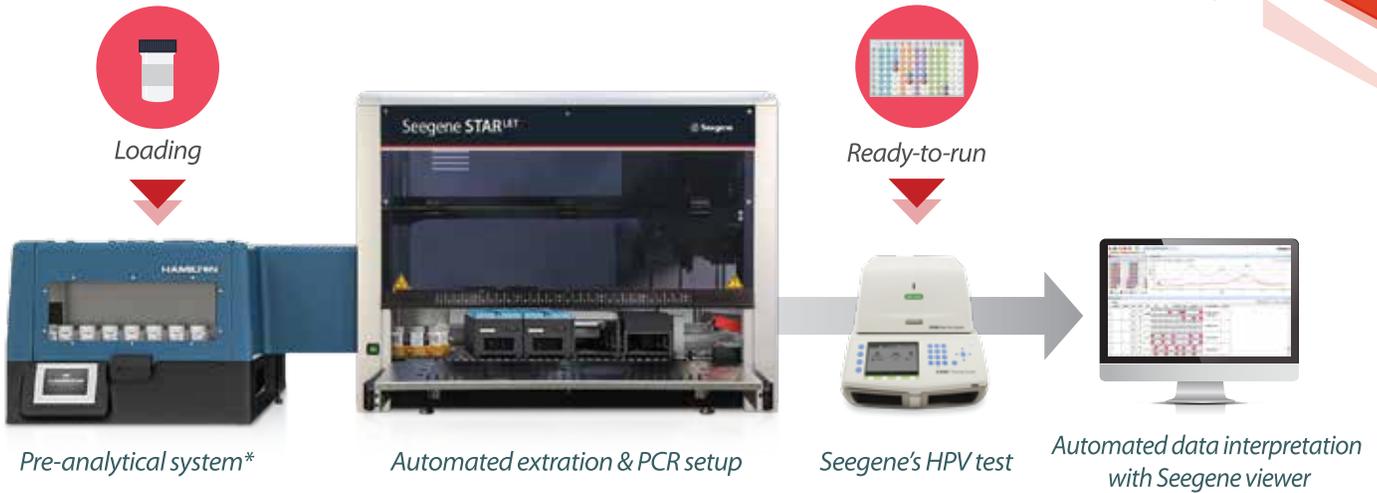
Vial Cap Management System

VCMS increases productivity by automating de-capping, aliquot, and re-capping.

- **Expand efficiency for Seegene HPV test**
 - Pre-analytic step of 92 primary sample tubes and ready-to-run Seegene HPV test
- **Expand convenience for Seegene HPV test**
 - Easy sample loading and increase your walk-away time
- **Expand IT potential for Seegene HPV test**
 - Full sample traceability to complete your IT workflow



Seegene's HPV testing concept



01 Effortless workflow
Load a sample and walk away

02 Efficient workflow
Increase productivity of Seegene's HPV test for high volume laboratories

03 IT integrated workflow
Integration into the laboratory IT system providing full sample traceability

Pre-analytical system makes better work flow

* Please refer to the technical specification below.

Technical specification

Functions	Scanning, de-capping and re-capping of tubes
-----------	--

Device specifications

Throughput	92 samples (Anyplex™ II HPV HR Detection)	Dimension (W x D x H)	1058.25 x 899.5 x 436 mm
Turnaround Time	About 40 minutes (aliquoting step included)	Weight	41.6 kg
Sample tube	Via barcode formats such as Codabar, Code 39, Code 128	Communication	USB, Ethernet, RS-232
Sample identification	ThinPrep™ (Hologic)	Operating temperature	15~33 °C (59~91 °F)
Hands-on time	Up to 10 minutes	Power input	100-240 VAC, 50/60 Hz, 13A-6A

Ordering information

Instrument	Cat. No.
Pre-analytical system VCMS	6600532-01
Automated extraction & PCR Setup Seegene STARlet *	67930-03



Taewon Bldg, 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul 05548, Republic of Korea / Tel : +82-2-2240-4000 / Fax : +82-2-2240-4040 / E-mail : info@seegene.com www.seegene.com

GERMANY

Düsseldorf, Germany
Tel : +49-211-9943-4260
E-mail : eu@seegene.com

USA

California, USA
Tel : +1-925-448-8172
E-mail : usa@seegene.com

CANADA

Toronto, Canada
Tel : +1-800-964-5680
E-mail : canada@seegene.com

BRAZIL

Belo Horizonte, Brazil
Tel : +55-31-25153003
E-mail : contato@seegenebrazil.com.br

MEXICO

México city, México
Tel : + 52-55-8848-9646
E-mail : mexico@asdx.mx

MIDDLE EAST

Dubai, UAE
Tel : +971-4-558-7110
E-mail : sgme@seegene.com