

Набір для генотипування

RevoDx HPV 6/11

RevoDx HPV 6/11 Genotyping Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення та ідентифікація ДНК вірусу папіломи людини
6/11 (HPV 6/11)**

Для діагностичного

використання in vitro

Тільки для професійного

використання

**Номери продукту:
IP202530-25 – 25 тестів
IP202530-100 – 100 тестів**

Компоненти продукту

	Назва компонента	25 тестів	100 тестів
1	HPV 6/11 RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	HPV 6/11 RM-2	25 мкл	100 мкл
3	HPV 6/11 Позитивний контроль	100 мкл	100 мкл
4	Негативний контроль HPV 6/11	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2 °C до +8 °C. Усі компоненти набору для генотипування RevoDx HPV 6/11 слід зберігати при температурі від -25 °C до -15 °C. Слід уникати зберігання при вищих температурах. За умови належного зберігання всі компоненти набору є стабільними до дати закінчення терміну придатності, зазначеної на етикетці продукту. 1 флакон HPV 6/11 RM не слід заморозувати та розморозувати більше 3 разів, оскільки це може знизити чутливість. В іншому випадку розділіть їх на аликвоти зручного розміру та зберігайте при температурі від -25 °C до -15 °C.

Призначення

Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11 — це тест ПЛР у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК вірусу папіломи людини типу 6 та типу 11 (HPV 6 та HPV 11). Негативні результати не виключають інфекції та не повинні використовуватися як єдина основа для прийняття рішення щодо лікування пацієнта. Негативні результати необхідно поєднувати з клінічними спостереженнями, анамнезом пацієнта та епідеміологічною інформацією. Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11 призначений для використання кваліфікованим та навченим персоналом клінічної лабораторії, який пройшов спеціальне навчання та підготовку з технік ПЛР у реальному часі та процедур *in vitro* діагностики.

Обмеження щодо використання продукту

- Тільки за рецептом
- Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11 призначений виключно для діагностики *in vitro*
- Потенційні мутації в цільових ділянках геному ВПЛ 6/11, що охоплюються олігонуклеотидами в наборі, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або недійсних результатів тесту.
- Надійність результатів залежить від правильних методів забору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений для професійного використання належним чином навченим персоналом.
- Для отримання оптимальних результатів ПЛР дотримуйтесь інструкцій у посібнику до продукту.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних партій не слід змішувати.

Опис продукту

Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11 — це флуорогенний ПЛР-аналіз на основі зонда, в якому між двома ПЛР-праймерами розташований внутрішній олігонуклеотидний зонд із флуоресцентною міткою, приєднаною до 5'-кінця, та молекулою гасіння, що пригнічує флуоресцентний репортер на 3'-кінці. Під час реплікації ДНК у процесі ПЛР внутрішній олігонуклеотид гібридується з матрицею та розщеплюється під дією 5'-3'-ендонуклеазної активності ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) у міру подовження ПЛР-праймера. Внутрішній олігонуклеотид розщеплюється лише у разі реплікації ДНК, розділяючи молекули флуоресцентного репортера та гасителя. Продукти ПЛР виявляються протягом декількох хвилин шляхом моніторингу зростання флуоресценції, яке відбувається експоненціально з послідовними циклами ампліфікації ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) визначається як частка числа циклів, при якій флуоресценція перевищує встановлений поріг. Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11 використовує внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

Загальний опис

Інфікування певними типами вірусу папіломи людини (HPV) спричиняє плоскоклітинні внутрішньоепітеліальні ураження та інвазивний рак шийки матки та ануса (1). Генотипування HPV є важливим для більшості основних медичних показань тестування на HPV. Наприклад, було показано, що генотипування HPV є точним показником неефективності лікування під час спостереження після лікування дисплазії шийки матки (2). При скринінгу шийки матки генотипування ВПЛ дозволяє краще ідентифікувати жінок з високим ризиком дисплазії, ніж тест на ВПЛ без генотипування (3), і особливо важливим є моніторинг типів, пов'язаних з найвищим ризиком раку (4). Моніторинг ефекту вакцинації проти ВПЛ вимагає адекватного генотипування ВПЛ для оцінки того, чи зникають типи ВПЛ, проти яких спрямована вакцина, з популяції та як це впливає на поширеність типів, не охоплених вакциною (5).

Посилання

- Bosch, F. X., A. Lorincz, N. Munoz, C. J. L. M. Meijer та K. V. Shah. 2002. Причинно-наслідковий зв'язок між вірусом папіломи людини та раком шийки матки. *J. Clin. Pathol.* 55:244-265.
- Venturoli, S., S. Ambretti, M. Cricca, E. Leo, S. Costa, M. Musiani та M. Zerbini. 2008. Кореляція між персистенцією генотипів вірусу папіломи людини високого ризику та ризиком залишкових або рецидивуючих захворювань шийки матки після хірургічного лікування. *J. Med. Virol.* 80:1434-1440.
- Куй'єри, К. С. та Г. А. Куйбі. 2005. Роль тестування на вірус папіломи людини у скринінгу шийки матки. *J. Clin. Virol.* 32(Suppl. 1):S34-S42.
- Брінк, А. А., П. Д. Свайдерс, К. Дж. Мейер, Дж. Беркхоф та Р. Х. Верхейсен. 2006. Тестування на ВПЛ у скринінгу шийки матки. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 20:253-266.
- Діллен, Дж., М. Арбі та Л. Діллен. 2007. Серія трансляційних міні-оглядів щодо вакцин: моніторинг вакцинації проти вірусу папіломи людини. *Clin. Exp. Immunol.* 148:199-207.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід поводитися в зоні біобезпеки рівня 1 або рівня 2, залежно від інфекційних агентів.
- Усі відходи, що утворюються, слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитися та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У разі контакту ретельно промийте водою.
- Уникайте розливу або утворення аерозолів.
- Ніколи не набирайте розчини в піпетку ротом
- Не їжте, не пийте та не куріть у робочих приміщеннях лабораторії.
- Мийте руки після роботи зі зразками та реагентами для тестування.
- Вся інформація з паспортів безпеки (MSDS) надається за запитом
- Під час роботи завжди носіть захисний лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри.
- Перед та після процедури ретельно дезінфікуйте всі робочі поверхні свіжоприготованим розчином 10% хлорного відбілювача або антивірусних засобів.
- Переконайтеся, що під час роботи з цією системою все є вільним від ДНКаз/РНКаз.
- Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до Належних лабораторних практик, щоб запобігти перехресному забрудненню.
- Використовуйте лише відкалібровані піпетки, завжди змінюйте наконечники піпеток між перенесеннями рідин (рекомендуються наконечники піпеток з аерозольним бар'єром).
- Зберігайте набір подалі від будь-яких джерел забруднюючих нуклеїнових кислот, особливо ампліфікованих нуклеїнових кислот.
- Для запобігання забрудненню операції бажано виконувати у трьох окремих зонах (наприклад, для очищення ДНК/РНК, підготовки до ПЛР, ампліфікації).
- Усе обладнання та витратні матеріали для певної операції слід зберігати в зоні, де ця операція виконується, і не переносити між окремими зонами. Перед тим, як залишити одну зону та перейти до наступної, слід зняти та утилізувати рукавички. Лабораторні халати повинні бути призначені для кожної зони окремо і ніколи не носитися поза межами цієї зони.
- Робота повинна відбуватися в одному напрямку, починаючи з зони екстракції, а потім у вибраних зонах подальшого застосування.

Дані щодо ефективності

Аналітична чутливість Для визначення межі виявлення (LoD) було підготовлено серію розведень вторинного стандарту HPV 6/11, щоб отримати кінцеві концентрації 1000, 200, 40, 8 та 1,6 МО/мл. Вірусу ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення тестували у 24 повтореннях. Значення межі виявлення (LoD) становило 64 МО/мл

Діагностична специфічність 117 клінічних зразків, негативних щодо ДНК ВПЛ 6/11, від окремих донорів було протестовано для визначення діагностичної специфічності набору для генотипування RevoDx HPV 6/11. Жоден із протестованих зразків не дав позитивного результату тесту на цільовий маркер. Діагностична специфічність набору для генотипування RevoDx HPV 6/11 становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність. Аналіз *in silico* праймерів та зондів набору для генотипування RevoDx HPV 6/11 щодо послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів HPV 6/11 і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 15 патогенів, перелічених нижче, були протестовані в лабораторних умовах за допомогою набору для генотипування RevoDx HPV 6/11 на перехресну реактивність. Не було виявлено жодних хибнопозитивних результатів.

Результати тестування на перехресну реактивність, як *in silico*, так і в лабораторних умовах, наведені нижче.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Цільові олігонуклеотиди
Вірус гепатиту С	Відсутність гомології
Цитомегаловірус людини (HCMV)	Відсутність гомології
Вірус гепатиту В	Відсутність гомології
SARS-CoV-2	Відсутність гомології
Людський коронавірус 229E	Відсутність гомології
Людський коронавірус OC43	Відсутність гомології
Людський коронавірус HKU1	Відсутність гомології
Людський коронавірус NL63	Відсутність гомології
Коронавірус SARS	Відсутність гомології
MERS-коронавірус	Відсутність гомології
Аденовірус (наприклад, C1 Ad. 71)	Відсутність гомології
Людський метанемовірус (hMPV)	Відсутність гомології
Вірус паргрипу 1-4	Відсутність гомології
Грип А та В	Відсутність гомології
Ентеровірус (наприклад, EV68)	Відсутність гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Відсутність гомології
Ріновірус	Відсутність гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Відсутність гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Відсутність гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Відсутність гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Відсутність гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Відсутність гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Відсутність гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Відсутність гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Відсутність гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Відсутність гомології
<i>Candida albicans</i>	Відсутність гомології
<i>Staphylococcus epidemidis</i>	Відсутність гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Відсутність гомології

Аналіз перехресної реактивності з використанням вологого тесту

Мікроорганізм	Джерело	Результат
РНК вірусу гепатиту С для методів ампліфікації нуклеїнових кислот (6-й Міжнародний стандарт ВООЗ)	NIBSC (кат. №: 18/184)	Не виявлено
Цитомегаловірус людини (HCMV) для методів ампліфікації нуклеїнових кислот (1-й міжнародний стандарт)	NIBSC (кат. №: 09/162)	Не виявлено
4-й міжнародний стандарт ВООЗ для ДНК вірусу гепатиту В для методів NAT	NIBSC (кат. №: 10/266)	Не виявлено
Перший міжнародний стандарт ВООЗ для РНК SARS-CoV-2	NIBSC (кат. №: 20/146)	Не виявлено
Людський коронавірус (229E)	NIBSC (кат. №: 09/132)	Не виявлено
Ріновірус	NIBSC (кат. №: 08/324)	Не виявлено
Аденовірус людини	NIBSC (кат. №: 16/324)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (кат. №: 07/296)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (кат. №: 07/298)	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (кат. №: 07/300)	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини A2	NIBSC (кат. №: 08/120)	Не виявлено
Вірус паратрипу типу 1	NIBSC (кат. №: 08/176)	Не виявлено
Вірус паратрипу типу 2	NIBSC (кат. №: 08/178)	Не виявлено
Вірус паратрипу типу 3	NIBSC (кат. №: 08/118)	Не виявлено
Вірус паратрипу типу 4	NIBSC (кат. №: 08/180)	Не виявлено

Перехресне забруднення Було оцінено потенційне перехресне забруднення між зразками. Було проведено п'ять різних серій тестування, під час яких по черзі тестували зразки з високим рівнем позитивності та негативні зразки. У кожній серії використовували 4 зразки з високим рівнем позитивності на ВПЛ 6/11 та 4 зразки, негативні на ВПЛ 6/11. Перехресного забруднення не спостерігалось, і жоден із зразків не містив інгібіторів ПЛР, про що свідчить ампліфікація внутрішнього контролю.

Клінічна оцінка:

Ефективність набору для генотипування RevoDx HPV 6/11 оцінювали з використанням архівних зразків мазків із шийки матки. Для кожного генотипу було протестовано загалом 20 позитивних і 20 негативних зразків у режимі рандомізації та сліпого тестування. Усі 20 позитивних і 20 негативних зразків було отримано з лабораторії державної лікарні, і вони раніше були протестовані за допомогою валідованого порівняльного тесту. Зразки були вилучені за допомогою набору RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit відповідно до інструкції до продукту. Потім були підготовлені ПЛР-реакції за допомогою набору RevoDx HPV 6/11 Genotyping Kit відповідно до інструкції до продукту. Для ампліфікації, виявлення та аналізу використовувалася система детекції ПЛР у реальному часі BIO-RAD CFX96.

Згідно з результатами тестування, було зафіксовано 100% збіг з очікуваними результатами.

Необхідні додаткові матеріали

- Набір для очищення вірусної нуклеїнової кислоти RevoDx (кат. №: IP201906; idil biotech, Туреччина)
- Система детекції ПЛР у реальному часі
- Відповідні засоби захисту (лабораторний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри тощо)
- Мікропіпетки (0,5 мкл - 1000 мкл),
- Наконечники для мікропіпеток без ДНКаз/РНКаз/фільтрами,
- Мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл, вільні від ДНКаз/РНКаз,
- Вортексний міксер,
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-пластинок/пробірок-стрічок,
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 2,0 мл,
- Робоча станція для ПЛР,

Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі:

Протокол

Очищення вірусної ДНК Для вилучення вірусної ДНК з клінічних зразків слід використовувати набір RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших наборів для очищення може негативно вплинути на робочі характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника, викладених у посібнику до набору. Для запобігання забрудненню операції бажано виконувати у трьох окремих зонах (тобто для очищення ДНК/РНК, підготовки ПЛР, ампліфікації).

Внутрішній контроль Внутрішній контроль (Hs_RPP30), спрямований на РНКазу Р, необхідний для перевірки наявності нуклеїнової кислоти в кожному зразку та використовується для кожного обробленого зразка. Він також слугує контролем вилучення, щоб гарантувати, що зразки, які дають негативний результат, містять нуклеїнову кислоту для тестування.

Позитивний контроль Позитивний контроль включає плазмиду, що містить вставку. Позитивний контроль ампліфікується в окремій пробірці для реакції. Щоб можна було оцінити експеримент, значення Ct позитивного контролю повинно дорівнювати 26 ± 4 , інакше це вказує на проблему під час ампліфікації.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HPV 6/11 RM 2. Помістіть HPV 6/11 RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, а потім перед використанням короткоцентрифугуйте. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок.

2. Кінцевий об'єм мастер-міксу отримують шляхом множення об'ємів однієї реакції RM 1 та RM 2 на загальний об'єм зразків. При розрахунку загального об'єму зразків слід враховувати кількість негативних/позитивних контролів та клінічних зразків. З огляду на можливі похибки піпетування рекомендується додати до загального об'єму зразків додатковий зразок.

3. Для приготування мастер-міксу додайте 14 мкл HPV 6/11 RM 1 та 1 мкл HPV 6/11 RM 2 для кожного зразка у пробірку з мастер-міксом. Змішайте вміст пробірки на вортексі та короткоцентрифугуйте у мікроцентрифугі. Додайте 15 мкл мастер-міксу у пробірки для реакції ПЛР у реальному часі або капіляри для кожного зразка. Додайте 5 мкл ДНК кожного зразка, негативного контролю та позитивного контролю в пробірки. Коротко відцентрифугуйте.

4. Введіть умови циклу для системи детекції Real-Time PCR: 95 °C протягом 2 хв, 1 цикл; 95 °C протягом 10 сек, 60 °C протягом 20 сек, 40 циклів (табл. 3). Введіть 20 мкл як об'єм зразка.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва програми	Цикли	Програма
Гарячий старт	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95 °C, 10 сек
		60 °C, 20 сек

* Флуорогенні дані слід збирати при 60 °C; слід вибрати канали FAM, ROX та HEX

7. Флуорогенні дані збираються при 60 °C. Слід вибрати канали FAM, HEX та CY5.

8. Почати аналіз.

9. Для програмування та аналізу результатів зверніться до посібника користувача відповідного приладу.

Аналіз даних

Для оцінки тесту значення Ct позитивного контролю в каналах FAM та HEX має дорівнювати 26 ± 4 , а негативного контролю у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати можна інтерпретувати так:

Сигнал у будь-якому каналі FAM (ДНК ВПЛ 6)	Сигнал у будь-якому каналі HEX (ДНК ВПЛ 11)	Сигнал у каналі CY5 (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	-	+/-	ДНК ВПЛ 6 позитивна
-	+	+/-	ДНК ВПЛ 11 позитивна
-	-	+	Цільова ДНК не виявлена
-	-	-	Результат недійсний. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація про замовлення

Назва продукту	Упаковка	Кат. №
Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11	25 тестів	IP202530-25
Набір для генотипування RevoDx HPV 6/11	100 тестів	IP202530-100