****

**RevoDx Набір для скринінгу 26 генотипів ВПЛ**

**(RevoDx HPV 26 Screening Kit)**

**Інструкція з використання**

**Якісне виявлення ДНК 24 генотипів вірусу папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику та 2 низького ризику**

**Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:**

**IP202222-25 – 25 тестів**

**IP202222-100 – 100 тестів**

**Склад набору**

|  | **Назва компонента** | **25 тестів** | **100 тестів** |
| --- | --- | --- | --- |
| **1** | HPV SMM | 350 мкл | 1400 мкл |
| **2** | HPV Enzyme Mix | 25 мкл | 100 мкл |
| **3** | Позитивний контрольний зразок, ПКЗ (Positive Control) | 100 мкл | 100 мкл |
| **4** | Негативний контрольний зразок, НКЗ (Negative Control) | 100 мкл | 100 мкл |

**Транспортування, зберігання та стабільність**

Набори реагентів бажано транспортувати у замороженому вигляді, допускається транспортування при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx HPV 26 Screening Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Флакони HPV SMM не можна заморожувати та розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аліквот зручного об’єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

**Передбачене використання**

Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit — це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК 24 генотипів вірусу папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику та 2 низького ризику (в одній пробірці).

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент не може бути точною причиною захворювання. Негативні результати тесту ПЛР не виключають можливості, що пацієнт є інфікованим вірусом ВПЛ, а тому не повинні використовуватись як єдине підгрунтя для прийняття рішення про подальші діагностику та лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit виявляє такі генотипи ВПЛ:

| **ДНК 24 генотипів ВПЛ високого онкогенного ризику** |
| --- |
| * **ВПЛ 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82 і 97**
 |
| **ДНК 2 генотипів ВПЛ низького онкогенного ризику** |
| * **ВПЛ 6 і11**
 |

**Обмеження щодо використання набору**

* Використовувати лише за призначенням.
* Потенційні мутації в цільових областях геномів патогенів, покритих оліго в наборі, можуть призвести до хибно негативних результатів тесту.
* Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або невалідних результатів тесту.
* Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
* Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
* Дотримуйтеся інструкцій з використання до наборів для отримання оптимальних результатів ПЛР.
* Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

**Опис продукту**

Мультиплексна ПЛР у реальному часі технічно здатна виявляти багато типів мікроорганізмів одночасно в різних типах зразків. Чутливість та специфічність цього методу досить висока, а час виявлення короткий, що корисно для раннього виявлення інфекцій.

Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit — це ПЛР-аналіз на основі TagMan-технології, в якому між двома праймерами ПЛР знаходиться внутрішній олігонуклеотидний зонд з флуоресцентною міткою на 5'-кінці і молекулою гасника на 3'-кінці. Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридизується з ДНК-матрицею і руйнується 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при чому відбувається розділення молекули флуоресцентного барвника та молекули гасника. Утворені продукти ПЛР можна виявити протягом кількох хвилин завдяки підвищенню рівня флуоресценції, яке відбувається експоненціально з кожним наступним циклом ампліфікації у ході ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) – це номер циклу ампліфікації, при якому флуоресценція реакційної суміші перевищує фіксоване порогове значення.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділеній із зразків пацієнта. Виявлення ДНК 24 генотипів вірусу папіломи людини (ВПЛ) високого онкогенного ризику і 2 генотипів низького ризику проводиться в одній пробірці, в якій одночасно виявляється РНКаза Р людини. Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit використовує РНКазу P людини як внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

**Прилади**

Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit можна використовувати із ампліфікаторами для ПЛР у реальному часі BIO-RAD CFX96, Tianlong Gentier 96, Applied Biosystems QuantStudio5, а також приладами ДНК-технології серії ДТ (DT-prime, DT-lite). Але RevoDx HPV 26 Screening Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX та Cy 5.

**Загальний опис**

Інфекціювання вірусом папіломи людини (ВПЛ) дуже поширене, і ДНК вірусу можна виявити у зразках шкіри, ротової порожнини та аногенітальних органів у майже всіх людей. На даний момент повністю охарактеризовано понад 200 типів ВПЛ, які переважно розділені на три роди: альфа-папіломавірус, бета-папіломавірус і гамапапіломавірус (1). Серед 65 типів ВПЛ, що належать до альфа-папіломавірусу (типи альфа-ВПЛ), певна група вірусів вважаються онкогенними і пов’язаними із розвитком раку шийки матки та його попередників (2). Онкогенні ВПЛ, що спричиняють практично всі види раку шийки матки, філогенетично згруповані в одну групу, що складається з видів Альфа-5, Альфа-6, Альфа-7, Альфа-9 та Альфа-11 (3).

Віруси папіломи людини (ВПЛ) — це ікосаедричні вірусні частинки без оболонки розміром 50–60 нм у діаметрі (4). Ці віруси з дволанцюговою кільцевою ДНК мають розмір генома, близький до 8 кілобаз, який включає відкриті рамки зчитування (ORF), що кодують білки E1–E7, що беруть участь у трансактивації транскрипції, трансформації, реплікації та адаптації вірусу в клітинах-господарях (5).

**Список джерел**

1. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM, 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology 401, 70–79.

2. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 100, 1–441.

3. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, 2009. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. Public Health Genomics 12, 281–290.

4. Doorbar, J., Egawa, N., Grifn, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association.

5. de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U. & zur Hausen, H. Classifcation of papillomaviruses. Virology 324, 17–27 (2004).

**Інформація про безпеку**

* Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
* Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
* Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
* Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
* Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
* Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
* При роботі в лабораторії використовувати ЗІЗ.
* На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючиими розчинами.
* Переконайтесь, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
* Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лаборіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
* Використовуйте тільки повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
* Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
* Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція НК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
* Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожну зону. Лабораторні халати повинні бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.
* Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції НК і закінчуючи відповідними зонами використання.

**Характеристики набору**

**Аналітична чутливість:**

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень кожного генотипу, щоб отримати кінцеві концентрації 1620, 540, 180, 60 і 20 МО/мл шляхом розведення зразків – цервікальних мазків, зібраних у негативних осіб, щоб імітувати клінічні зразки. Вірусну ДНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторах. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано шляхом пробіт-аналізу. Значення межі виявлення (LoD) становило 48 МО/мл. Це значення LoD було підтверджено тестуванням додаткових 20 повторів із концентрацією 48 МО/мл. Усі 20 повторів дали позитивні результати для кожної мішені, тому було підтверджено, що LoD становить 48 МО/мл.

**Інклюзивність:**

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx HPV 26 Screening Kit був проведений для послідовностей кожного генотипу ВПЛ, доступних у базах даних NCBI. Вирівнювання показало, що ділянки, розпізнані розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями патогенів з баз/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

**Перехресна реактивність:**

Перехресна реактивність набору RevoDx HPV 26 Screening Kit була оцінена як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HPV 26 Screening Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір є специфічним до конкретних мішеней і не дає перехресної реакції з цими патогенами. Перераховані нижче 13 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx HPV 26 Screening Kit. Хибнопозитивних результатів не виявлено.

Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як in silico, так і методом ПЛР

***Аналіз перехресної реакції in silico* (проведено 13 лютого 2022 року)**

| **Організм** | **Результат** |
| --- | --- |
| Коронавірус людини 229E | Немає гомології |
| Коронавірус людини OC43 | Немає гомології |
| Коронавірус людини HKU1 | Немає гомології |
| Коронавірус людини NL63 | Немає гомології |
| Коронавірус SARS  | Немає гомології |
| Коронавірус MERS | Немає гомології |
| Аденовірус (напр. C1 Ad. 71) | Немає гомології |
| Метапневмовірус людини (hMPV) | Немає гомології |
| Вірус паргрипу 1-4 типів | Немає гомології |
| Вірус грипу A та B | Немає гомології |
| Ентеровірус (напр. EV68) | Немає гомології |
| Респіраторно-синцитіальний вірус  | Немає гомології |
| Риновірус | Немає гомології |
| *Chlamydia pneumoniae* | Немає гомології |
| *Haemophilus influenzae* | Немає гомології |
| *Legionella pneumophila* | Немає гомології |
| *Mycobacterium tuberculosis* | Немає гомології |
| *Streptococcus pneumoniae* | Немає гомології |
| *Streptococcus pyogenes* | Немає гомології |
| *Bordetella pertussis* | Немає гомології |
| *Mycoplasma pneumoniae* | Немає гомології |
| *Pneumocystis jirovecii* (PJP) | Немає гомології |
| *Candida albicans* | Немає гомології |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Немає гомології |
| *Staphylococcus epidermis* | Немає гомології |
| *Streptococcus salivarius* | Немає гомології |

**Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР**

| **Організм** | **Джерело** | **Концентрація** | **Результат** |
| --- | --- | --- | --- |
| Коронавірус людини (229E) | NIBSC (Cat. No: 09/132) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Риновірус  | NIBSC (Cat. No: 08/324) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Аденовірус людини | NIBSC (Cat. No: 16/324) | 2.0×108 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1) | NIBSC (Cat. No: 07/296) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2) | NIBSC (Cat. No: 07/298) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003) | NIBSC (Cat. No: 07/300) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1) | NIBSC (Cat. No: 16/194) | 1.25×105 МО/мл | Не виявлено |
| Вірус імунодефіциту людини 2 типу (ВІЛ-2, HIV-2) | NIBSC (Cat. No: 16/296) | 2.8×105 МО/мл | Не виявлено |
| Респіраторно-синцитіальний вірус людини A2 | NIBSC (Cat. No: 08/120) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 1 типу | NIBSC (Cat. No: 08/176) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 2 типу | NIBSC (Cat. No: 08/178) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 3 типу | NIBSC (Cat. No: 08/118) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парагрипу 4 типу | NIBSC (Cat. No: 08/180) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |

**Порівняльні клінічні випробування:**

Ефективність роботи набору для скринінгу RevoDx HPV 26 Screening Kit оцінювали за допомогою архівних цервікальних мазків. Для кожного генотипу було протестовано загалом 20 позитивних і 20 негативних зразків у рандомізованому сліпому дослідженні. Усі 20 позитивних зразків і 20 негативних зразків були отримані з лабораторії державної лікарні і попередньо протестовані за допомогою валідованого порівняльного аналізу. Зразки були виділені за допомогою RevoDx Набору для очищення вірусної НК (RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit) відповідно до інструкції з використання до продукту. Потім проводили аналіз методом ПЛР за допомогою набору RevoDx HPV 26 Screening Kit відповідно до інструкції з експлуатації. Для ампліфікації, детектування та аналізу використовували ПЛР-ампліфікатор BIO-RAD CFX96.

За результатами тестування отримали 100% збіг з очікуваними результатами.

**Додаткові матеріали та обладнання**

* Набір для виділення вірусної НК RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Cat. No: IP201906; IdilBiotech, Туреччина)
* Набір для магнітного виділення вірусної НК RevoDx (RevoDx Magnetic Viral Nucleic Acid Purification Kit, Cat. No: IP201920; IdilBiotech,Туреччина)
* Реагент для виділення ДНК ВПЛ DirEXT OneStep (DirEXT OneStep HPV DNA Extraction Reagent, Cat. No: IP202304; IdilBiotech, Туреччина)
* Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
* Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри, тощо)
* Мікропіпетки (0.5 мкл – 1000 мкл)
* Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром та маркуванням DNase/RNase-free
* Мікропробірки 1,5 мл з маркуванням DNase/RNase-free
* Вихровий змішувач (вортекс)
* Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стрип-пробірок
* Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
* Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі.

**Підготовка зразків**

Набір RevoDx HPV 26 Screening Kit валідований для використання зі зразками мазків з шийки матки, вагінальних мазків або рідинних цитологічних зразків. Крім того, всі зразки нуклеїнових кислот, які підходять для аналізів методом ПЛР, можна використовувати з набором для скринінгу RevoDx HPV 26. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов’язані із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на етапі «попереднього тестування», і дуже важливо, щоб відповідна документація була точною та повною.

Після збору не зберігайте зразки при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування зразків повинно відповідати національним або місцевим правилам.

**Протокол**

**Виділення ДНК:** Для виділення ДНК збудниказі зразків мазків з шийки матки, вагінальних мазків або рідинних цитологічних зразків слід використовувати набір RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit **(модифікований метод)\*** або RevoDx Magnetic Viral Nucleic Acid Purification Kit **(модифікований метод)\***, або реагент DirEXT OneStep HPV DNA Extraction Reagent. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника обраного набору для виділення НК. В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (для виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації.

***\*Модифікований метод:*** *перемішайте шляхом імпульсного вортексування та обережно ресуспендуйте епітеліальні клітини в зразках цервікального мазка, вагінальних мазків або рідинних цитологічних зразків. (Примітка: не обертайте та не центрифугуйте зразки). 1 мл зразка перенесіть у мікроцентрифужну пробірку 1,5/2 мл, вільну від ДНКаз/РНКаз, і центрифугуйте при 10 000 x g протягом 2 хвилин. Супернатант видалити і продовжити виконання протоколу.*

**Внутрішній контроль:** Внутрішній контроль (ВК) (Hs\_RPP30), мішенню якого є РНКаза Р людини, потрібен для підтвердження потраплення виділеної ДНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

**Позитивний контроль:** Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 28 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

**Протокол ПЛР**

**1.** Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HPV Enzyme Mix. Покладіть суміш ферментів HPV на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.

**2.** Кінцевий об’єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об’ємів HPV SMM та HPV Enzyme Mix на загальну кількість зразків (досліджувані клінічні зразки плюс ПКЗ та НКЗ). Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується додати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.

**3.** Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мл HPV SMM та 1 мл HPV Enzyme Mixдля кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Внести по 5 мкл ПКЗ та НКЗ у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

**4.** Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 1. Вказати об’єм зразка 20 мкл.

**Таблиця 1:** Програма ампліфікації

| **Назва етапу** | **Кількість циклів** | **Температура** | **Час** |
| --- | --- | --- | --- |
| Активація полімерази | 1 | 95ºC | 2 хв |
| Ампліфікація\* | 40 | 95ºC | 20 сек |
| 60ºC | 30 сек |

**\* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy 5**

**5.** Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy 5.

**6.** Запустити програму.

**7.** Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

**Аналіз даних**

Значення Ct для ПКЗ повинно дорівнювати 28±4, а НКЗ у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати інтерпретувати наступним чином:

| **Сигнал по каналу FAM (ДНК ВПЛ високого ризику)** | **Сигнал по каналу HEX (ДНК ВПЛ низького ризику)** | **Сигнал по каналу Cy 5 (ген РНКази P)** | **Інтерпретація** |
| --- | --- | --- | --- |
| **+** | **-** | **+/-** | Виявлено ДНК одного чи декількох генотипів ВПЛ високого онкогенного ризику: HPV 16, 18, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82 та 97 |
| **-** | **+** | **+/-** | Виявлено ДНК одного чи обох генотипів ВПЛ низького онкогенного ризику: HPV 6 та 11 |
| **-** | **-** | **+** | Збудник не виявлено |
| **-** | **-** | **-** | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати  |

**Інформація для замовлення**

| **Назва продукту** | **Фасування** | **Каталожний номер** | **Штрихкод №** |
| --- | --- | --- | --- |
| RevoDx HPV 26 Screening Kit | 25 тестів | IP202222-25 | 8683079717332 |
| RevoDx HPV 26 Screening Kit | 100 тестів | IP202222-100 | 8683079717349 |