

RevoDx Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С

RevoDx HCV qPCR Kit

Інструкція з використання

Кількісне визначення РНК вірусу гепатиту С
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP201902-25 – 25 тестів
IP201902-50 – 50 тестів
IP201902-100 – 100 тестів
IP201902-250 – 250 тестів

Склад набору

	Колір кришки	Компонент	25 тесів	50 тесів	100 тесів	250 тесів
1	ЗЕЛЕНИЙ	HCV RM -1	350 мкл	700 мкл	1400 мкл	2 x 1750 мкл
2	СИНИЙ	HCV RM-2	25 мкл	50 мкл	100 мкл	250 мкл
3	ЧЕРВОНИЙ	Внутрішній контрольний зразок (Internal Control, IC)	75 мкл	150 мкл	300 мкл	750 мкл
4	ЖОВТИЙ	Стандартний зразок 1 (Quantification Standart 1) (10 ⁷ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
5	ЖОВТИЙ	Стандартний зразок 2 (Quantification Standart 2) (10 ⁶ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
6	ЖОВТИЙ	Стандартний зразок 3 (Quantification Standart 3) (10 ⁵ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
7	ЖОВТИЙ	Стандартний зразок 4 (Quantification Standart 4) (10 ⁴ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
8	БІЛИЙ	Негативний контрольний зразок (Negative Control)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати за температури від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx HCV qPCR 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, який вказаний на етикетці продукту. Реагенти HCV RM-1 та RM-2 не можна заморозувати-розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx HCV qPCR Kit — це набір реагентів для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С людини у сироватці або плазмі крові людини (EDTA) методом ПЛР у реальному часі.

RevoDx HCV qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією HCV та для формування стратегії протівірусної терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами. RevoDx HCV qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК ВГС або для підтвердження діагнозу інфекції ВГС.

Негативні результати не виключають інфікування і не повинні використовуватись як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати слід комбінувати з клінічною картиною, анамнезом хвороби та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx HCV qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методом ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання набору

- Використовувати лише за призначенням
- RevoDx HCV qPCR Kit призначений лише для дослідницького використання
- RevoDx HCV qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК HCV або для підтвердження діагнозу інфекції HCV
- Потенційні мутації в цільових ділянках генів HCV, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тестування.
- Набір валідований для використання з сироваткою або плазмою крові людини, зібраною в антикоагулянті EDTA. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання з набором.
- Набір валідований для використання з набором для виділення RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших наборів для екстракції може негативно вплинути на робочі характеристики набору.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або

невалідних результатів тесту.

- Набір валідовано з використанням приладів для ампліфікації BIO-RAD CFX96 та Tianlong Gentier 96. При використанні з іншими приладами характеристики набору можуть відрізнятися.
- 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.
- RevoDx HCV qPCR Kit Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією HCV та для формування стратегії протівірусної терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами.
- 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

RevoDx HCV qPCR Kit — це набір для аналізу методом одностадійної РЧ-ПЛР (або ПЛР у реальному часі) зі зворотною транскрипцією. При цьому спочатку на матриці РНК здійснюється зворотна транскрипція з утворенням комплементарних ланцюгів ДНК (кДНК), а потім відбувається ампліфікація кДНК за допомогою фермента ДНК-полімерази. Під час реплікації кДНК 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 кДНК, 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.

Графік (стандартна крива), що відображає залежність порогового циклу Ct (по осі Y) від логарифму кількості копій Стандартних зразків 1-4 (по осі X), є прямою лінією. Кількісне визначення мішені в досліджуваних зразках здійснюється шляхом вимірювання Ct і використання стандартної кривої для визначення вихідної кількості копій. RevoDx HCV qPCR Kit передбачає використання стандартних зразків для розрахунку кількісних результатів. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок. Цільова область розташована в 5'-нетрансльованій області (UTR) геному ВГС. Концентрація РНК HCV визначається в міжнародних одиницях/мл (МО/мл).

Прилади

Набір RevoDx HCV qPCR 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). Ane RevoDx HCV qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM і HEX

Загальний опис

Майже 170 мільйонів людей у всьому світі інфіковані вірусом гепатиту С (ВГС, HCV). Приблизно 85% цих людей мають персистентну форму інфекції, що може мати такі ускладнення як цироз печінки та гепатоцелюлярна карцинома (1). ВГС класифікують на генотипи 1-6 в залежності від генетичних особливостей (2). Головна мета генотипування ВГС полягає у можливості підібрати правильну схему і тривалість терапії, оскільки генотипи відрізняються за сприйнятливостю до протівірусної терапії (3).

Геноми вірусу гепатиту С (HCV) розрізняють за допомогою рекомбінантних комплементарних РНК. Вірус гепатиту С (HCV) належить до родини Flaviviridae. Це сферичний оболонковий вірус діаметром 30-60 нм з геномом, що представлений одноланцюговою РНК. З усуненням використання HBsAg позитивної крові, ВГС став найпоширенішою причиною посттрансфузійного гепатиту (4).

Список літератури

- Banker PD. Viral hepatitis. *Ind J Med Sci* 2003; 57: 461-68.
- Conte D, Fraquelli M, Prati D et al. Prevalence and clinical worse of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission on a cohort of 15, 250 pregnant women. *Hepatology* 2000; 31: 751-55.
- BankerDD, DesaiP, BrawnerT Aetal. Hepatitisdelta virusinfection in Bombay. *Trans Roy Soc TropMed Hyg* 1992; 86: 424-25.

4. Kuo G, Choo QL, Aher HJ. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of non-A non-B viral hepatitis. Science 1989; 244: 362-647. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2015; 61(1):77-87. doi: 10.1002/hep.27259 PMID: 25069599

Інформація щодо безпеки

- 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 засоби індивідуального захисту
- На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні незаражуваними розчинами.
- Переконайтесь що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитись в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатись 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.

Характеристики набору

Ліміт детекції - Аналітична чутливість

Для визначення меж чутливості набору (limit of detections, LoD) була підготовлена серія розведень міжнародного стандарту HCV від BOO3 для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірене в 24 повторях. Значення меж виявлення (LoD) становило 14 МО/мл.

Лінійний діапазон

Серію розведень зразків HCV приготували за допомогою стандарту -- відкаліброваної транскрибованої in vitro РНК, що містить фрагмент геному HCV. Ця стандартка РНК була відкалібрована за стандартами ВОЗ. У клінічні зразки, негативні щодо наявності РНК HCV, додавали цей стандарт, щоб отримати кінцеві концентрації в діапазоні від 1 x 10³ МО/мл до 1 x 10⁹ МО/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. У цьому діапазоні залежність між логарифмом цільової РНК і значеннями Ct є лінійною. Аналіз лінійної регресії, що описує значення Ct залежно від логарифму концентрації цільової ДНК, наведено нижче:
Значення Ct = -3,254 (логарифм цільової РНК) + 42,44; з коефіцієнтом кореляції (R2) 0,99.
Верхня межа становить принаймні 1 x 10⁹ МО/мл.
Нижня межа була розрахована за допомогою пробіт-аналізу, виконаного програмою PASW Statistics 18 відповідно до результатів дослідження аналітичної чутливості набору. 95 % нижня довірча межа становить 35 МО/мл. Відповідно до результатів RevoDx HCV qPCR Kit має лінійний діапазон від 35 МО/мл до 1 x 10⁹ МО/мл.

Прецизійність

Була оцінена точність (прецизійність) результатів набору щодо внутрішньоаналітичної варіації або повторюваності (intra-assay), міжаналітичної варіації (inter-assay) та міжпартійної варіації (inter-batch). Для кожного аналізу було використано 24 повтори з використанням зразків концентрації 5x10² та 5x10⁵ МО/мл. Загальна точність, що

пов'язана зі значеннями Ct (відтворюваність), була підсумована в наступних таблицях.

Таблиця 1: Загальний статистичний опис щодо прецизійності даних для зразка 5x10⁵ МО/мл.

Статистичний опис							
	N	Мінімум	Максимум	Середнє значення	Стандартне відхилення	Дисперсія	Коефіцієнт варіації (%)
Intra-assay	24	5,64	5,74	5,6642	,02283	,001	0,40
Inter-assay	24	5,64	5,77	5,7292	,03092	,001	0,54
Inter-batch	24	5,62	5,71	5,6796	,02116	,000	0,37
Сироватка	24	5,66	5,76	5,6954	,02686	,001	0,47
PA30M	96	5,62	5,77	5,6921	,03503	,001	0,62

Таблиця 2: Загальний статистичний опис щодо прецизійності даних для зразка. 5x10² МО/мл.

Статистичний опис							
	N	Мінімум	Максимум	Середнє значення	Стандартне відхилення	Дисперсія	Коефіцієнт варіації (%)
Intra-assay	24	1,50	2,91	2,3425	,35114	,123	14,99
Inter-assay	24	2,01	3,01	2,7138	,21978	,048	8,10
Inter-batch	24	1,77	2,96	2,5488	,29583	,088	11,61
Сироватка	24	1,76	2,88	2,4104	,26083	,068	10,82
PA30M	96	1,50	3,01	2,5039	,31564	,100	12,61

Виявлення генотипів

Ефективність набору RevoDx HCV qPCR Kit було оцінено за допомогою стандартної панелі зразків SeraCare Life Sciences HCV RNA Genotype Performance Panel. Згідно з результатами, дані, отримані RevoDx HCV qPCR Kit, сумісні з результатами інших наборів. RevoDx HCV qPCR Kit може виявити та кількісно визначити всі генотипи HCV.

Діагностична специфічність

Для визначення діагностичної специфічності RevoDx HCV qPCR Kit було протестовано 121 клінічний зразок, негативний на РНК HCV від окремих донорів. Було використано 60 клінічних зразків сироватки крові і 61 клінічний зразок плазми ЕДТА, негативних на РНК вірусу гепатиту С. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx HCV qPCR Kit становить ≥ 99 %.

Перехресна реактивність

Аналіз in silico праймерів і зондів RevoDx HCV qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів HCV і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 16 збудників були протестовані методом ПЛР за допомогою набору RevoDx HCV qPCR Kit на перехресну реактивність. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як in silico, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності in silico

Організм	Результат
Цитомегаловірус людини (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (HBV)	Немає гомології
SARS-CoV-2	Немає гомології
Коронавірус людини 229E	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології
Коронавірус людини NL63	Немає гомології
SARS-коронавірус	Немає гомології

MERS-коронавірус	Немає гомології
Аденовірус (напр., C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метатпневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Парагрип вірус 1-4	Немає гомології
Грип А і В	Немає гомології
Ентеровірус (напр., EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Перевірка перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Кат . №: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Кат . №: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Кат . №: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Кат . №: 09/132)	Не виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Кат . №: 08/324)	Не виявлено
Human Adenovirus	NIBSC (Кат . №: 16/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Кат . №: 07/296)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Кат . №: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Кат . №: 07/300)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)	NIBSC (Кат . №: 16/194)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)	NIBSC (Кат . №: 16/296)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Кат . №: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Кат . №: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Кат . №: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Кат . №: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Кат . №: 08/180)	Не виявлено

*використані комерційні стандартні зразки, назви наведено згідно каталогу виробника

Перехресна контамінація

Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних постановок ПЛР із одночасним тестуванням високопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 високопозитивні зразки і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Збій тест-системи (Whole System Failure) Можливість збою роботи тест-системи аналізували за допомогою стандарту ВООЗ у концентрації, що втричі перевищує 95% позитивне порогове значення, яке було визначено при дослідженні аналітичної чутливості**. До негативних зразків плазми (ЕДТА) та сироватки крові додали комерційний стандартний зразок HCV від ВООЗ у кількості необхідній для отримання фінальної концентрації 42 МО/мл. Усі 120 зразків із додаванням HCV дали позитивний результат тесту на РНК HCV. Загальна частота збоїв RevoDx HCV qPCR Kit становить $\leq 1\%$

****Це концентрація аналіту, при якій 95 % тестів дають позитивні результати після серійних розведень міжнародного еталонного матеріалу, наприклад, стандарту ВООЗ або каліброваних еталонних матеріалів.**

Порівняльні клінічні випробування

Всього було протестовано 109 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на RevoDx HCV qPCR Kit, співпадають з результатами інших наборів із маркуванням CE. Логарифмічні концентрації всіх 109 клінічних зразків знаходяться в межах ± 1 логарифмічних концентрацій результату порівняльного набору.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Cat. No: IP201906; IdilBiotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (халат, рукавички, окуляри)
- 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
- Бокс біологічного захисту

Підготовка зразків

Цей набір валідовано для використання зі свіжою або замороженою сироваткою чи плазмою людини, зібраною в антикоагулянті EDTA. Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через кров. Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані з 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 преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування. Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Центрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в кріопробірку з гвинтовою кришкою. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми має відповідати державним або місцевим нормам. Зразки сироватки або плазми можна зберігати при 2-8°C протягом 24 годин або заморозити при -70°C або нижче для тривалого зберігання. Необхідно уникати повторних циклів заморожування/розморожування, оскільки це призведе до зниження титру вірусу. Зразки необхідно перемішати, перевертаючи пробірки або піпетуючи кілька разів, перед перенесенням у пробірку для зразків. При використанні заморожених зразків, потрібно довести їх до кімнатної температури перед початком процедури. При наявності осаду, видалити його центрифугуванням протягом 3 хв при 5000 x g.

Протокол

Виділення РНК вірусу Для екстракції РНК вірусу із сироватки або плазми людини, зібраної в антикоагулянті EDTA, бажано використовувати RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника обраного набору для виділення ДНК/РНК. В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (для виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації.

Внутрішній контроль Використання внутрішнього контролю (ВК) під час процедури виділення ДНК/РНК є обов'язковим. Внутрішній контроль включає транскрибовану in vitro РНК зі вставкою. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції РНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР. Для кожного зразка додайте 2,5 мкл ВК у лізуючий розчин RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. **Не додавайте ВК безпосередньо у зразок сироватки/плазми.** Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм ВК, який потрібно додати (0,05 мкл ВК/1 мкл буфера для елюції). Слабкий сигнал або його відсутність може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на ВГС, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та

молекулою РНК ВГС під час використання компонентів ПЛР. Значення Ст внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 30 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції НК. Внутрішній контроль ампліфікується в усіх 4 сумішах.

Стандартні зразки для кількісного визначення Для створення стандартної кривої для кількісного визначення ВГС слід використовувати чотири стандартні зразки. Для кожного стандартного зразка відповідну концентрацію слід правильно вказувати при програмуванні ампліфікатора перед кожною поставкою. В кінці реакції стандартна крива буде створена відповідно цих даних. Роботу з кількісними стандартними зразками HCV слід проводити після підготовки клінічних зразків і негативного контролю в окремій зоні. Кришки пробірок клінічних зразків **ПОВИННІ** бути закриті в цій зоні.

Протокол ПЛР

- 1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HCV RM
- 2. Компонент HCV RM 2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадите краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
- 2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів RM 1 та RM 2 на загальну кількість зразків. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки (стандарт та негативний контроль). Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
- 3. В окрему пробірку внести реагенти із розрахунку 14 мкл HCV RM 1 та 1 мкл HCV RM 2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки для ПЛР. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, стандартних зразків 1-4 та негативного контролю у відповідні пробірки. Осадити краплі центрифугуванням.
- 4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 4. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 4: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Температура	Час
Синтез кДНК	1	50°C	15 хв
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація	40	95°C	10 сек
		60°C***	20 сек

*** Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX

- 5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX.
- 6. Запустити програму.
- 7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Для отримання достовірних результатів, ефективність ПЛР стандартної кривої має бути 90%-110%, а значення R² має бути більше 0,98. В іншому випадку експеримент слід повторити. Концентрація кожного позитивного зразка буде розрахована програмним забезпеченням (ПЗ) відповідно до стандартної кривої в міжнародних одиницях на мілілітр (МО/мл) Через різні початковий об'єм зразка та об'єм елюції під час виділення вірусної РНК **ПОТРІБНО** використовувати наступну формулу для розрахунку концентрації вихідного клінічного зразка:

Концентрація вихідного зразка, МО/мл

=

Концентрація обчислена ПЗ (МО/мл) x Об'єм елюції (мкл) / Об'єм зразка, внесений для виділення (мкл)

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (РНК HCV)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Обчислен а концентра ція вихідного зразка	Висновок
+	+	<35 МО/мл	Результат валідний. РНК HCV виявлено. Кількісне визначення неможливе, оскільки кількісний результат нижче значення лінійного діапазону аналізу. Відтворюваність позитивного результату не гарантується.
+	+/-	≥35 МО/мл	Результат валідний. РНК HCV виявлено в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням, оскільки кількісний результат знаходиться в межах лінійного діапазону аналізу.
+	+/-	>1 x 10 ⁹ МО/мл	Результат дійсний. РНК HCV виявлено в концентрації >1 x 10 ⁹ МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує лінійний діапазон аналізу.
-	+	N/A	Результат валідний. РНК HCV не виявлена.
-	-	N/A	Результат невалідний. Діагностична інтерпретація неможлива.