

# RevoDx Набір для генотипування вірусу гепатиту С

RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit

## Інструкція з використання

Виявлення та диференціація генотипів вірусу гепатиту С  
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:  
IP202325-25 – 25 тестів  
IP202325-50 – 50 тестів

Склад набору:

|   | Компонент                                        | 25 тестів | 50 тестів |
|---|--------------------------------------------------|-----------|-----------|
| 1 | HCV GMM - 1                                      | 350 мкл   | 700 мкл   |
| 2 | HCV GMM - 2                                      | 350 мкл   | 700 мкл   |
| 3 | HCV GMM - 3                                      | 350 мкл   | 700 мкл   |
| 4 | HCV GMM - 4                                      | 350 мкл   | 700 мкл   |
| 5 | HCV Gntyp Enzyme Mix                             | 100 мкл   | 200 мкл   |
| 6 | Внутрішній контроль (Internal control, IC)       | 125 мкл   | 250 мкл   |
| 7 | Позитивний контрольний зразок (Positive control) | 100 мкл   | 200 мкл   |
| 8 | Негативний контрольний зразок (Negative control) | 100 мкл   | 200 мкл   |

## Транспортування, зберігання та стабільність

Набори бажано транспортувати замороженими, однак допускається транспортування при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx HCV Genotyping 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, вказаного на етикетці продукту. Реагенти HCV GMM не можна заморожувати та розморожувати більше 3 разів, оскільки це може знизити чутливість набору. У разі необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розподіліть їх на аліквоти зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

## Передбачене використання

RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit — це набір реагентів для виявлення РНК та диференціації генотипів вірусу гепатиту С (HCV) у сироватці або плазмі людини (EDTA) методом ПЛР у реальному часі. Набір RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit дозволяє ідентифікувати генотипи HCV 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 і 6. RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією HCV та для формування стратегії противірусної терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами. RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК ВГС або для підтвердження діагнозу інфекції ВГС.

## Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Лише для досліджень
- Потенційні мутації в цільових областях геному ВГС, залучених у реакції, 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 дозволяє одночасно виявляти багато типів мікроорганізмів. При цьому чутливість та специфічність методу висока, а час детекції короткий. Таким чином цей тип аналізу є корисним для виявлення ранніх госпітальних інфекцій. RevoDx HCV Genotyping 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 гібридується 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. Метод виконується безпосередньо на РНК, виділеній із зразків пацієнта. Ідентифікація генотипів/підтипів HCV-RNA 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 і 6 здійснюється за допомогою 4 різних реакцій, у яких одночасно виявляється специфічний внутрішній контроль (IC).

| Пробірка № | Генотип/мішень      | Канал детекції |
|------------|---------------------|----------------|
| HCV GMM 1  | ВГС, Генотип 1b     | FAM            |
|            | ВГС, Генотип 1a     | HEX            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |
| HCV GMM 2  | ВГС, Генотип 5      | FAM            |
|            | ВГС, Генотип 2      | HEX            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |
| HCV GMM 3  | ВГС, Генотип 6      | FAM            |
|            | ВГС, Генотип 4      | HEX            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |
| HCV GMM 4  | ВГС, Генотип 3      | FAM            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |

## Прилади

Набір RevoDx HCV Genotyping 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). Але RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами FAM, HEX та ROX.

## Загальний опис

Вірус гепатиту С (ВГС) характеризується значною генетичною варіабельністю, що призвело до класифікації на 7 генотипів та кілька підтипів (1). Генотипи 1a і 1b є найбільш поширеними в Західній Європі та Сполучених Штатах, також розповсюджені 2 і 3 генотипи. У той час як генотип 4 широко поширений у Єгипті, генотип 5 поширений у Південній Африці, а генотип 6 – у Південно-Східній Азії (2). У пацієнтів з Канади та Бельгії також виявлено ще один сьомий генотип (3). У Туреччині переважає генотип 1b ВГС (4).

Генотипування вірусу гепатиту С є важливим етапом належного клінічного лікування гепатиту С (5). Генотипування, яке включає принаймні субтипкування, яке диференціює підтипи 1a і 1b, необхідно проводити перед початком противірусної терапії, оскільки вибір прямих противірусних засобів і тривалість лікування безпосередньо залежать від генотипу HCV (6). Успіх лікування та показники одужання пацієнтів значною мірою залежать від правильного визначення генотипу. Генотипування також сприяє дослідженню молекулярної епідеміології, що допомагає визначенню поширення ВГС у світі (7).

### Список літератури

- Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. In: Tang H, editor. Hepatitis C: Methods and Protocols. Totowa: Humana Press, 2009: 33-53 [DOI: 10.1007/978-1-59745-394-3\_4]
- Lin HJ, Lau JY, Lauder IJ, Shi N, Lai CL, Hollinger FB. The hepatitis C virus genome: a guide to its conserved sequences and candidate epitopes. Virus Res 1993; 30: 27-41 [PMID: 7505514]
- Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote EJ, Dusheiko G, Marcellin P. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. Liver Int 2010; 30: 342-355 [PMID: 20015149 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.02188]
- Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Turkiylmaz AR, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. Arch Virol. 2004;149(11):2115–29. doi: 10.1007/s00705-004-0363-2.
- European Association for Study of Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. J Hepatol. 2015; 63(1):199–236. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.025 PMID: 25911336
- AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. Hepatology. 2015; 62(3):932–954. doi: 10.1002/hep.27950 PMID: 26111063
- 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 знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.

- Поводьтеся 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 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 ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Характеристики набору  
Ліміт детекції (LoD) - Аналітична чутливість:

Для визначення межі виявлення (limit of detections, LoD) було підготовлено серію розведень еталонних зразків генотипів ВГС (1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6). Вірусне навантаження цих еталонних зразків було визначено шляхом калібрування за стандартом ВООЗ для ВГС, а їхні генотипи/підтипи були ідентифіковані шляхом секвенування. Кожен зразок генотипу/підтипу розводили для отримання кінцевих концентрацій 3000, 1000, 300, 100, 30 і 10 МО/мл. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) були розраховані за допомогою пробіт-аналізу. Для кожного генотипу/підтипу значення межі виявлення (LoD) і 95% довірчі діапазони підсумовані в таблиці 2.

Таблиця 2: RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit - значення межі виявлення (LoD) і 95% довірчий діапазон

| Генотип/підтип HCV | Ліміт детекції (МО/мл) | Нижній довірчий інтервал 95 % | Верхній довірчий інтервал 95 % |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Генотип 1a         | 34                     | 29                            | 56                             |
| Генотип 1b         | 35                     | 31                            | 52                             |
| Генотип 2          | 44                     | 42                            | 84                             |
| Генотип 3          | 62                     | 54                            | 99                             |
| Генотип 4          | 47                     | 42                            | 95                             |
| Генотип 5          | 51                     | 41                            | 88                             |
| Генотип 6          | 68                     | 57                            | 97                             |

Інклюзивність:

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit був проведений для послідовностей кожного генотипу ВГС, доступних у базах даних NCBI. Результати показують, що нуклеотидні ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з всіма доступними послідовностями патогенів з баз даних/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність:

Перехресну реактивність RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit було оцінено як за допомогою аналізу *in silico*, так і за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 13 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. Нижче наведені результати перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР.

Перевірка перехресної реактивності *in silico*

| 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 парогрипу 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 |
| <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                 | 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                                       | 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 імунodefіциту людини 1 типу (ВІЛ 1, HIV-1) | NIBSC (Cat. No: 16/194) | 1.25×105 МО/мл               | Не виявлено |
| Вірус імунodefіциту людини 2 типу (ВІЛ 2, HIV-2) | NIBSC (Cat. No: 16/296) | 2.8×105 МО/мл                | Не виявлено |
| Респіраторно-синцитіальний вірус A2              | NIBSC (Cat. No: 08/120) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парогрипу 1 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/176) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парогрипу 2 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/178) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парогрипу 3 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/118) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |
| Вірус парогрипу 4 типу                           | NIBSC (Cat. No: 08/180) | не призначена одиниця виміру | Не виявлено |

Порівняльні клінічні випробування:

Всього було досліджено 144 клінічні та еталонні зразки. Дослідили 25 зразків з підтипом 1a, 27 зразків з підтипом 1b, 22 зразки з генотипом 2, 22 зразки з генотипом 3, 23 зразки з генотипом 4, 14 зразків з генотипом 5, 9 зразків з генотипом 6 і 2 зразки зі змішаним генотипом HCV. Згідно з результатами, дані, отримані за допомогою RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit, співпадають з результатами секвенування послідовностей NS5B. 144 із 144 клінічних зразків з інфекцією з одним генотипом ВГС на ≥ 99 % відповідали секвенуванню.

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. №: IP201906; IdliBiotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Viral Nucleic Acid Purification Kit (Кат. №: IP201920; IdliBiotech, 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 крові людини, зібраною в антикоагулянті EDTA. Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору 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 прогріти їх до кімнатної температури перед початком процедури. При наявності осаду, видалити його центрифугуванням протягом 3 хв при 5000 x g.

Протокол

**Очищення РНК вірусу** Для екстракції РНК вірусу із сироватки або плазми людини, зібраної в антикоагулянті EDTA, бажано використовувати RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit або RevoDx Magnetic Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших реагентів може негативно вплинути на результати. 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.

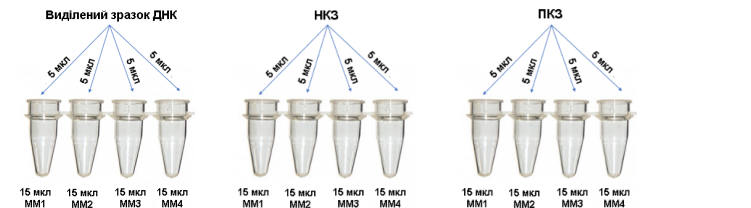
**Внутрішній контроль** Використання внутрішнього контролю (ВК) під час процедури виділення ДНК/РНК є обов'язковим. Внутрішній контроль включає транскрибовану in vitro РНК зі вставкою. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції РНК, а також для перевірки будь-якого 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 Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 30 ± 4, інші значення вказують на проблему під час екстракції РНК. Внутрішній контроль ампліфікується в усіх 4 сумішах.

**Позитивний контроль** Щоб мати можливість інтерпретувати результати дослідження, значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 25 ± 4, інші значення вказують на проблему при ампліфікації.

Протокол ПЛР

- Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім суміші ферментів HCV Gntyp Enzyme Mix. Покладіть суміш ферментів HCV Gntyp на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім ненадовго відцентрифугуйте перед використанням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
- Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів HCV GMM 1-4 та HCV Gntyp Enzyme Mix на загальну кількість зразків. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
- Підготуйте чотири пробірки 1,5 мл для кожної з реакційних сумішей HCV GMM 1-4. Для приготування кожної майстер-суміші додайте 14 мкл HCV GMM і 1 мкл HCV Gntyp Enzyme Mix для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл кожної приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Для кожного клінічного зразка слід використовувати 4 пробірки/лунки (з різними сумішами 1, 2, 3, 4). Після внесення майстер-міксів у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК у кожну лунку, як показано на малюнку нижче. Внести по 5 мкл позитивного та негативного контролів у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.

Рис.1. Схема внесення зразків у майстер-мікси



- 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    |
|---------------------|------------------|-------------|--------|
| Синтез кДНК         | 1                | 50°C        | 30 хв  |
| Активція полімерази | 1                | 95°C        | 2 хв   |
| Ампліфікація        | 40               | 95°C        | 15 сек |
|                     |                  | 57°C***     | 30 сек |
|                     |                  | 68°C        | 15 сек |

\*\*\* Детекція флуоресценції при 57°C за каналами FAM, HEX та Rox

- Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 57°C за каналами FAM, HEX і Rox.
- Запустити програму.
- Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct для позитивного контролю повинно дорівнювати 25±4, а негативний контроль у всіх каналах повинен бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати для кожного майстер-міксу інтерпретувати наступним чином:

| Сигнал по каналу FAM/HEX | Сигнал по каналу ROX (внутрішній контроль) | Інтерпретація                                                                   |
|--------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| +                        | +/-                                        | Позитивний на специфічний генотип ВГС                                           |
| -                        | +                                          | Результат валідний. Збудник не виявлено                                         |
| -                        | -                                          | Невалідний результат. Зразок слід повторно протестувати для цього майстер-міксу |

Для кожного майстер-міксу в наступній таблиці наведено канали детекції для відповідного цільового генотипу/мішені:

| Пробірка № | Генотип/мішень      | Канал детекції |
|------------|---------------------|----------------|
| HCV GMM 1  | ВГС, Генотип 1b     | FAM            |
|            | ВГС, Генотип 1a     | HEX            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |
| HCV GMM 2  | ВГС, Генотип 5      | FAM            |
|            | ВГС, Генотип 2      | HEX            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |
| HCV GMM 3  | ВГС, Генотип 6      | FAM            |
|            | ВГС, Генотип 4      | HEX            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |
| HCV GMM 4  | ВГС, Генотип 3      | FAM            |
|            | Внутрішній контроль | ROX            |

Примітка:

Результати, що показують кілька генотипів або змішані генотипи вірусу гепатиту С (HCV), можуть виникати внаслідок двох основних факторів: інфекції зі змішаним генотипом або перехресної реактивності. Різниця в значенні Ct при ПЛР-тестуванні може допомогти визначити причину. Важливо зазначити, що ці зауваження допомагають покращити розуміння результатів, але не можуть точно визначити причину. Нижче наведено пояснення того, як різниці значень Ct можна інтерпретувати в цих сценаріях:

1. Різниця значення Ct > 4:

- Якщо різниця в значенні Ct між виявленими генотипами становить понад 4 цикли, це свідчить про значну різницю у вірусному навантаженні різних генотипів.
- У цьому випадку ймовірніше, що отриманий результат є наслідком перехресної реактивності, а не інфекції змішаним генотипом.
- Генотип із меншим значенням Ct слід вважати результатом аналізу, оскільки він вказує на вищу концентрацію генетичного матеріалу, виявленого за допомогою ПЛР.

2. Різниця значення Ct < 4:

- Якщо різниця в значенні Ct між виявленими генотипами становить менше 4 циклів, це вказує на більшу подібність вірусного навантаження між генотипами.
- Цей сценарій свідчить про високу ймовірність інфекції змішаного генотипу, коли у зразку присутні більше одного генотипу з відносно однаковими рівнями вірусного навантаження.
- У таких випадках може знадобитися подальше підтвердження за допомогою додаткових методів тестування, щоб остаточно ідентифікувати та охарактеризувати змішані генотипи.

Використання різниці значень Ct як орієнтира може бути корисним, але дуже важливо обережно інтерпретувати результати. Крім того, для точної діагностики інфікування змішаними генотипами та диференціації їх від артефактів аналізу, часто необхідні підтверджуючі тести та ретельна клінічна оцінка

Інформація для замовлення

| Назва продукту                 | Фасування | Кат. No.    |
|--------------------------------|-----------|-------------|
| RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit | 25 тестів | IP202325-25 |
| RevoDx HCV Genotyping qPCR Kit | 50 тестів | IP202325-50 |