

RevoDx Набір для
кількісного визначення РНК
вірусу імунодефіциту
людини 1 типу (ВІЛ-1)
RevoDx HIV-1 qPCR Kit

Інструкція з використання

**Кількісне визначення РНК-вірусу імунодефіциту людини 1
типу (ВІЛ 1, HIV-1)
Тільки для професійного використання**

Каталожні номери:

**IP201903-25 – 25 тестів
IP201903-50 – 50 тестів
IP201903-100 – 100 тестів
IP201903-250 – 250 тестів**

Склад набору

	Колір кришки	Назва компонента	25 Тестів	50 Тестів	100 Тестів	250 Тестів
1	Зелений	HIV-1 RM-1	350 мкл	700 мкл	1400 мкл	2 x 1750 мкл
2	Синій	HIV-1 RM-2	25 мкл	50 мкл	100 мкл	250 мкл
3	Червоний	Внутрішній контрольний зразок, ВК HIV-1 (Internal Control, IC)	75 мкл	150 мкл	300 мкл	750 мкл
4	Жовтий	HIV-1 Стандартний зразок, СЗ-1 (Quantification Standart 1) (10^7 МО/мл, $6 \cdot 10^6$ копій/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
5	Жовтий	HIV-1 Стандартний зразок, СЗ-2 (Quantification Standart 2) (10^6 МО/мл, $6 \cdot 10^5$ копій/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
6	Жовтий	HIV-1 Стандартний зразок, СЗ-3, (Quantification Standart 3) (10^5 МО/мл, $6 \cdot 10^4$ копій/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
7	Жовтий	HIV-1 Стандартний зразок, СЗ-4 (Quantification Standart 4) (10^4 МО/мл, $6 \cdot 10^3$ копій/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
8	Білий	HIV-1 Негативний контрольний зразок, НКЗ (Negative Control)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx HIV-1 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. Реагент HIV-1/2 RM-1 не можна заморожувати-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

RevoDx HIV-1 qPCR Kit – це набір реагентів для кількісного визначення РНК вірусу імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1) в сироватці або плазмі крові людини (EDTA) методом ПЛР у реальному часі. Призначений для *in vitro* діагностики. Рекомендуємо використовувати з набором для екстракції вірусних нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Набір може використовуватись з наступними приладами для ампліфікації у режимі реального часу: BIO-RAD CFX96, Applied Biosystems QuantStudio5, Tianlong Gentier 96 Real-Time PCR, а також приладами ДНК-технології серії ДТ (DT-prime, DT-lite), та аналогічними.

Негативні результати тесту ПЛР не виключають можливості, що пацієнт є ВІЛ-інфікованим, а тому не повинні використовуватись як єдине підґрунтя для прийняття рішення про подальші діагностику та лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx HIV-1 qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання набору

- Використовувати лише за призначенням
- RevoDx HIV-1 qPCR Kit призначений для використання у дослідницьких цілях.
- RevoDx HIV-1 qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК ВІЛ-1 або для підтвердження діагнозу інфекції ВІЛ-1.
- Потенційні мутації в цільових ділянках генів ВІЛ-1, 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 вірусних нуклеїнових кислот 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.
- 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 HIV-1 qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією ВІЛ-1 та для формування стратегії противірусної терапії разом із 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 HIV-1 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. 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 ДНК. 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. Цей ПЛР-тест передбачає використання стандартних зразків для обчислення кількісних результатів. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок. Цільова область розташована в консервативній для вірусу ділянці гена gag.

Прилади

Набір RevoDx HIV-1/2 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 набір RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit також може бути використовуватись із більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами детекції FAM та HEX.

Загальний опис

ВІЛ належить до вірусів родини *Retroviridae*, підродини *Lentivirinae* та риду *Lentivirus* (1). ВІЛ характеризується типовою для родини моделі будови. Геном представлений одноланцюговою позитивною РНК, розміром приблизно 9,7 тисяч пар основ. Геном має 2 копії РНК, кожна з яких містить 9 вірусних генів. Геном оточений конусоподібним капсидом, що складається з 2000 білків р24, який в свою чергу покритий ліпідною двохшаровою мембраною, утвореною з клітинної мембрани клітини-господаря під час брунькування новоутвореної вірусної частинки. Білки клітини-хазяїна, такі як антигени головного комплексу гістосумісності (major histocompatibility complex, МНС) і актин, залишаються вбудованими у вірусну оболонку разом із білком вірусної оболонки. Кожна субодиниця оболонки складається з двох нековалентно пов'язаних мембранних білків: глікопротеїну (gp) 120, білка зовнішньої оболонки, і gp41, трансмембранного білка, який прикріплює глікопротеїновий комплекс до поверхні віріону. Білок оболонки є найбільш варіабельним компонентом ВІЛ, хоча сам gp120 структурно розділений на дуже варіабельні (V) і більш консервативні (C) ділянки. Варіабельність V-областей може бути важливою складовою функціональності оболонки, як було особливо добре описано для V3, де амінокислотні заміни змінюють використання корцепторів. Варіабельність оболонки ВІЛ також надає унікально складну антигенну різноманітність (1). ВІЛ-1 поділяється на три чіткі групи: М, N і О. Поширення цих груп у всьому світі неоднакове: штами групи М (основні) є значно більш поширеними в глобально, ніж інші штами ВІЛ-1. Штами групи О (Outlier) здебільшого поширені в Африці, зі спорадичними випадками, зареєстрованими в інших місцях. Штами групи N (нон-М, нон-О) були виявлені лише в Камеруні (2).

Використані джерела

1. Chiu IM, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR, et al. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* 1985;317(6035):366-8.
2. Conte D, Simon F, Maucelere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998;4(9):1032-7.

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 незаражувальними 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 подалі 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

Аналітична чутливість Для визначення межі чутливості набору (limit of detections, LoD), була підготовлена серія розведень міжнародного стандарту ВООЗ ВІЛ-1 (WHO International HIV-1 standard) для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл (600, 120, 24, 5 та 1 копій/мл відповідно). Вірусну РНК очищували за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 50 МО/мл, або 30 копій/мл.

Лінійний діапазон Серія розведень зразків ВІЛ-1 була підготовлена за допомогою каліброваного стандарту -- транскрибованої *in vitro* РНК з послідовністю ВІЛ-1. Даний стандарт для кількісного визначення був відкалібрований за стандартами ВООЗ. Клінічні зразки, негативні на РНК ВІЛ-1, були використані для розведення стандарту, щоб отримати кінцеві концентрації в діапазоні від 1×10^3 МО/мл ($5,8 \times 10^2$ копій/мл) до 1×10^9 МО/мл ($5,8 \times 10^8$ копій/мл). Вірусну РНК очищували за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. У вказаному діапазоні залежність між логарифмом концентрації цільової РНК і значеннями C_t є лінійною. Аналіз лінійної регресії, що описує значення C_t залежно від логарифму концентрації цільової РНК, наведено нижче:

Значення $C_t = -3.331(\log \text{ концентрації РНК}) + 44.72$; коефіцієнт кореляції (R^2) 0.999,

Верхня межа становить щонайменше 1×10^9 МО/мл ($5,8 \times 10^8$ копій/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 60 МО/мл. Відповідно до результатів RevoDx HIV-1 qPCR Kit має лінійний діапазон від 60 МО/мл (36 копій/мл) до 1×10^9 МО/мл ($5,8 \times 10^8$ копій/мл).

Прецизійність Була оцінена точність (прецизійність) результатів набору щодо внутрішньоаналітичної варіації або повторюваності (intra-assay), міжаналітичної варіації (inter-assay) та міжпартійної варіації (inter-batch). Було використано різні типи зразків (плазма ЕДТА, сироватка) та різні прилади (CFX96, Gentier 96). Для кожного аналізу було використано 24 повтори з використанням стандартних зразків ВООЗ концентрації 10^5 МО/мл. Загальна точність, що пов'язана зі значеннями C_t (відтворюваність), була підсумована в наступних таблицях.

Таблиця 2: Загальний статистичний опис щодо прецизійності даних

Описова статистика					
	N	Середнє значення, Mean	Стандартне відхилення, Std.Deviation	Дисперсія, Variance	Коефіцієнт варіації, Coefficient of variation (%)
Intra assay	24	32,10	0,43	0,19	1,35
Inter assay	24	31,65	0,26	0,07	0,81
Inter batch	24	31,36	0,25	0,06	0,80
Сироватка	24	30,92	0,24	0,06	0,79
BIO-RAD CFX96	24	29,91	0,06	0,00	0,21
Tianlong Gentier 96	24	30,08	0,62	0,02	2,05
PA30M	144	30,93	0,96	0,92	3,10

Виявлення генотипів Ефективність набору RevoDx HIV-1 qPCR Kit була оцінена за допомогою референтної панелі BOO3 для підтипів ВІЛ-1 для NAT (2nd WHO International Reference Panel Preparation for HIV-1 Subtypes for NAT (Main)) (код NIBSC: 12/224) та стандартного зразка ВІЛ-1 від BOO3 (1st WHO International Reference Preparation for HIV-1 CRF's) (код NIBSC: 13/214). Дані, отримані RevoDx HIV-1 qPCR Kit, відповідають звітам BOO3 ECBS. RevoDx HIV-1 qPCR Kit може виявляти та кількісно визначати усі підтипи ВІЛ-1 групи М та циркулюючі рекомбінантні форми.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx HIV-1 qPCR Kit було протестовано 125 клінічних зразків, негативних на ВІЛ-1 від окремих донорів. Було використано 62 зразки сироватки і 63 зразки плазми ЕДТА. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату. Діагностична специфічність RevoDx HIV-1 qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HIV-1 qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових ділянок геному ВІЛ-1 і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 15 збудників були протестовані на перехресну реактивність за допомогою RevoDx HIV-1 qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. Нижче наведені результати перевірки перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *In silico*

Організм	Результат
Вірус гепатиту С (HCV)	Немає гомології
Цитомегаловірус (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (HBV)	Немає гомології
Коронавірус 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
Коронавірус SARS	Немає гомології
Коронавірус MERS	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу 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>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Перевірка перехресної реактивності методом ПЛР

Організм*	Джерело	Результат
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Cat. No: 18/184)	Не виявлено
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Cat. No: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Cat. No: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не виявлено
Human Adenovirus	NIBSC (Cat. No: 16/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Cat. No: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Cat. No: 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 ВІЛ-1 і 4 негативні зразки ВІЛ-1. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Інтенсивність відмов системи (Whole System Failure) До 50 ВІЛ-1-негативних зразків плазми (ЕДТА) та 50 ВІЛ-1-негативних зразків сироватки крові додали комерційний стандартний зразок ВІЛ-1 від ВООЗ (WHO International HIV-1 standard) у кількості необхідній для отримання фінальної концентрації 150 МО/мл (90 копій/мл) у об'ємі елюції, що втричі перевищує 95% порогове значення чутливості набору, визначене при дослідженні аналітичної чутливості**. Усі 100 зразків із додаванням ВІЛ-1 дали позитивний результат тесту на РНК ВІЛ-1. Загальна частота відмов системи RevoDx HIV-1 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 Усього було протестовано 151 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HIV-1 qPCR Kit, співставні з результатами інших наборів із маркуванням СЕ. Логарифмічні концентрації всіх 151 клінічного зразка знаходяться в межах ± 1 логарифмічних концентрацій результатів з порівнюваних наборів.

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.

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 забору та обробки зразків необхідно дотримуватись запобіжних заходів щодо збудників, що передаються через кров. 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 преаналітичному етапі, що також передбачає повне і точне документування.

Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Центрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в кріовіалу/пробірку 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 є обов'язковим. Внутрішній контроль включає транскрибовану in vitro РНК, що містить вставку. 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). Поганий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися для каналу внутрішнього контролю у зразках, які є високопозитивними на ВІЛ-1, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою РНК ВІЛ-1 під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 30 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції НК.

Стандартні зразки для кількісного визначення Для створення стандартної кривої для отримання точних даних для кількісного визначення методом ПЛР у реальному часі слід використовувати чотири стандартні зразки (СЗ). Для кожного стандартного зразка відповідну концентрацію слід правильно вказати при програмуванні ампліфікатора для ПЛР у реальному часі перед кожною постановкою, і в кінці реакції стандартна крива буде створена відповідно цих даних. Роботу з кількісними стандартними зразками ВІЛ-1 проводити після підготовки клінічних зразків і негативного контролю в окремій зоні. Кришки пробірок або капілярів клінічних зразків **ПОВИННІ** бути закриті в цій зоні.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HIV-1 RM 2. Компонент HIV-1 RM 2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть 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 (стандартні 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 HIV-1 RM 1 та 1 мкл HIV-1 RM 2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням.

Внести по 15 мкл суміші у пробірки для ПЛР. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, СЗ 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

Щоб отримати достовірні результати, для стандартної кривої ефективність ПЛР має бути між 90%-110%, а значення R^2 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) або копіях на мілілітр (копій/мл) – залежно від того, які одиниці вимірювання обрав оператор при внесенні даних у налаштуваннях приладу. Отримані результати можуть бути переведені з однієї величини в іншу із розрахунку $1\text{МО} = 0,58\text{ копій}$. 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:

$$\text{Концентрація вихідного зразка****, МО/мл або копій/мл} = \frac{\text{Концентрація обчислена ПЗ (МО/мл чи копій/мл) x Об'єм елюції (мкл)}}{\text{Об'єм зразка, внесений для виділення (мкл)}}$$

******-- дані будуть обчислені в одиниці вимірювання, в якій були вказані концентрації СЗ**

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (РНК HIV-1)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Обчислена концентрація вихідного зразка	Висновок
+	+	<60 МО/мл	Результат валідний. РНК ВІЛ-1 виявлено. Кількісне визначення неможливе, оскільки кількісний результат нижче значення лінійного діапазону аналізу. Відтворюваність позитивного результату не гарантується.
+	+/-	≥60 МО/мл	Результат валідний. РНК ВІЛ-1 виявлено в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням, оскільки кількісний результат знаходиться в межах лінійного діапазону аналізу.

+	+/-	$>1 \times 10^9$ МО/мл	Результат дійсний. РНК ВІЛ-1 виявлено в концентрації $>1 \times 10^9$ МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує лінійний діапазон аналізу.
-	+	N/A	Результат валідний. Мішень (РНК ВІЛ-1) не виявлена.
-	-	N/A	Результат невалідний. Діагностична інтерпретація неможлива.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx HIV-1 qPCR Kit	25 тестів	IP201903-25
RevoDx HIV-1 qPCR Kit	50 тестів	IP201903-50
RevoDx HIV-1 qPCR Kit	100 тестів	IP201903-100
RevoDx HIV-1 qPCR Kit	250 тестів	IP201903-250