

RevoDx Набір для виявлення ДНК вірусу гепатиту В

RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне визначення ДНК вірусу гепатиту В
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP201922-25 – 25 тестів
IP201922-50 – 50 тестів
IP201922-100 – 100 тестів
IP201922-250 – 250 тестів

Склад набору

	Компонент	25 тестів	50 тестів	100 тестів	250 тестів
1	HBV RM-1	350 мкл	700 мкл	1400 мкл	2 x 1750 мкл
2	HBV PM-2	25 мкл	50 мкл	100 мкл	250 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок (Internal Control, IC)	75 мкл	150 мкл	300 мкл	750 мкл
4	Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контрольний зразок (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 HBV 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 HBV 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 аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачуване використання

RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit — це набір реагентів для якісного виявлення ДНК вірусу гепатиту В людини у сироватці або плазмі крові людини (EDTA) методом ПЛР у реальному часі. Призначений для in vitro діагностики. Рекоменуємо використовувати з набором для екстракції вірусних нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit.

Негативні результати тесту ПЛР не виключають можливості, що пацієнт є інфікованим вірусом гепатиту, 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 HBV 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 продукту

- Використовувати лише за призначенням
- RevoDx HBV qPCR Kit призначений лише для дослідницького використання
- RevoDx HBV qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність ДНК HBV або для підтвердження діагнозу інфекції HBV
- Потенційні мутації в цільових ділянках генів HBV, залучених 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.
- Набір валідовано з використанням приладів для ампліфікації BIO-RAD CFX96 та Tianlong Gentier 96. При використанні з іншими приладами характеристики набору можуть відрізнитися.
- 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 Набір HBV qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією HBV та для формування стратегії противірусної 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 HBV Qualitative qPCR Kit — це набір для ПЛР у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення гена S ДНК HBV та одночасного виявлення внутрішнього контролю.

RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit — це одноетапний ПЛР-аналіз у реальному часі, у якому мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з матрицею та розщеплюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) у 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.

Метод виконується безпосередньо на ДНК, виділений із зразків пацієнта. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок. Цільова область розташовується в консервативній ділянці гена S.

Прилади

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

Загальний опис

Вірус гепатиту В (HBV), з геномом розміром 3,2 kbp і частково подвійним ланцюгом ДНК, є членом родини *Hepadnaviridae*(1). Вірус гепатиту В може викликати гостре або хронічне захворювання печінки. У хронічному випадку інфекція може стати небезпечною для життя, оскільки може призвести до цирозу печінки або гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) (2). Способи передачі збудника аналогічні ВІЛ, але значно більше інфекційно небезпечні. До шляхів інфікування належать передача від матері до дитини, парентеральний і статевий через

контакт з зараженими кров'ю або рідинами організму. Після потрапляння в організм, вірус уражує гепатоцити печінки завдяки своєму поверхневому антигену (HBsAg). Інфекція ВГВ часто набувається протягом дитинства і в цілому безсимптомна. Ураження HBV на цьому етапі в основному призводить до розвитку хронічної інфекції (3). Приблизно 400 млн людей у світі є хронічно хворими на вірус гепатиту В (HBV) і приблизно 1 млн щорічно помирає від пов'язаних з ВГВ захворювань. Світове поширення вірусного гепатиту В варіює від 0,1% до 20%. Це широкий діапазон значною мірою через різницю у віці на момент зараження. Гостра інфекція ВГВ та ризик розвитку хронічної інфекції змінюються з віком: 90% для перинатальної інфекції, 25–50% для інфікування у віці 1-5 років і 1–5% для решти (4). Наприклад у Туреччині, як проміжній ендемічній області, поширеність серопозитивності по HBsAg становить від 2 до 10% (5).

Список літератури

1. Gerlich W, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' end of its complete strand. Cell. 1980;21:801–811.
2. McMahon The natural history of chronic hepatitis B virus infection. Hepatology. 2009;49(suppl):S45–S55.
3. Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, Mack D, Schellekens H, Driss F, et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. Lancet. 1988;2:1273–1276.
4. Custer B et al. Global epidemiology of hepatitis B virus. Journal of Clinical Gastroenterology, 2004, 38(10 Suppl):S158–S168.
5. Toy M, Onder FO, Wormann T, Bozdayi AM, Schalm SW, Borsboom GJ, et al. Age- and region-specific hepatitis B prevalence in Turkey estimated using generalized linear mixed models: a systematic review. BMC Infect Dis. 2011;11:337. doi: 10.1186/1471-2334-11-337.

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 знезаражуючими 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 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 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 HBV від WHO для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл. Вірусну ДНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірене в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) становило 10 МО/мл.

Виявлення генотипів Ефективність набору RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit було оцінено за допомогою стандартної панелі зразків SeraCare Life Sciences – AccuSet HBV DNA Genotype Performance Panel (кат. №: 0805-0362 / партія № 10387873). Згідно з результатами, дані, отримані RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit, співставні з результатами інших наборів. RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit може виявити та кількісно визначити всі генотипи HBV.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit було протестовано 115 клінічних зразків від різних донорів, негативних на наявність ДНК HBV. Було використано 55 клінічних зразків сироватки, і 60 клінічних зразків плазми з EDTA. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату. Діагностична специфічність RevoDx HBV qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

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

Аналіз переxресної реактивності *In silico*

Організм	Результати
Цитомегаловірус людини (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту С (HCV)	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
Коронавірус SARS	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології
Аденовірус (наприклад, C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус паратифу 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
<i>Chlamydia pneumoniae</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
Hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (6th WHO International Standard)	NIBSC (Кат . №: 18/184)	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
Парагрип вірус тип 3	NIBSC (Кат . №: 08/118)	Не виявлено
Парагрип вірус тип 4	NIBSC (Кат . №: 08/180)	Не виявлено

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 ВГВ і 4 негативні зразки. 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 негативних зразків плазми (ЕДТА) та сироватки крові додали комерційний стандартний зразок HBV від ВООЗ у кількості необхідній для отримання фінальної концентрації 30 МО/мл, що втричі перевищує 95% порогове значення чутливості набору, визначене при дослідженні аналітичної чутливості**. Усі 120 зразків із додаванням HBV дали позитивний результат тесту на ДНК HBV. Загальна частота відмов системи RevoDx HBV Qualitative 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 118 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на RevoDx HBV Qualitative qPCR Kit, співставні з результатами інших наборів із маркуванням CE.

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 тестування.

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 ДНК вірусу Для екстракції ДНК 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 Наявність внутрішнього контролю (ВК) під час процедури очищення є необхідною. Внутрішній контроль включає плазмідну ДНК, що містить вставку. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, 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 HBV оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК HBV 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.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контрольного зразка повинні дорівнювати 26 ± 4 , інші значення вказують на проблему при ампліфікації.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HBV RM 2. Компонент HBV 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. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.
3. В окрему пробірку внести реагенти із розрахунку 14 мкл HBV RM 1 та 1 мкл HBV 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, позитивного та негативного контролів. 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
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 мати можливість проаналізувати експеримент, значення Ct позитивного контролю за каналом FAM має дорівнювати 26 ± 4 , а негативний контроль по всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати можна інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (HBV)	Сигнал по каналу HEX (ВК)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК HBV виявлено
-	+	Результат валідний. ДНК HBV не виявлено
-	-	Результат невалідний. Цей зразок слід перевірити повторно.