

RevoDx Набір для виявлення РНК вірусу імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1) **RevoDx** HIV-1 Qualitative qPCR Kit

Інструкція з використання

**Якісне виявлення РНК-вірусу
імунодефіциту людини 1 типу (ВІЛ-1, HIV-1)**

Тільки для професійного використання

**Каталожні номери:
IP201924-25 – 25 тестів
IP201924-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Назва компонента	25 Тестів	100 Тестів
1	HIV-1 RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	HIV-1 RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок HIV-1 (Internal Control, IC)	75 мкл	300 мкл
4	HIV-1 Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	100 мкл
5	HIV-1 Негативний контрольний зразок (Negative Control)	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 Qualitative 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 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.

Передбачене використання

RevoDx HIV-1 Qualitative qPCR Kit – це набір реагентів для якісного виявлення РНК вірусу імунodefіциту 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.

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 Qualitative 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 HIV-1 Qualitative qPCR Kit призначений для використання у дослідницьких цілях.
- 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.
- 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.
- 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 Qualitative 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. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Прилади

Набір RevoDx HIV-1 Qualitative PCR 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 Qualitative PCR 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 двошаровою 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 субодинаця 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 (С) ділянки. Варіабельність V-областей може бути важливою складовою функціональності оболонки, як було особливо добре описано для V3, де амінокислотні заміни змінюють використання корецепторів. 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, Mauciere P, Roques P, Lousert-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 знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь що всі 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 BOO3 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.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx HIV-1 Qualitative 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 Qualitative qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HIV-1 Qualitative qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільового гену ВІЛ-1 і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 15 збудників були протестовані на перехресну реактивність за допомогою RevoDx HIV-1 Qualitative 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	Результати
Вірус гепатиту С (HCV)	Немає гомології
Цитомегаловірус (CMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В (HBV)	Немає гомології
Коронавірус SARS-CoV-2	Немає гомології
Коронавірус людини 129E	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
Chlamydia pneumoniae	Немає гомології
Haemophilus influenzae	Немає гомології
Legionella pneumophila	Немає гомології
Mycobacterium tuberculosis	Немає гомології
Streptococcus pneumoniae	Немає гомології
Streptococcus pyogenes	Немає гомології
Bordetella pertussis	Немає гомології
Mycoplasma pneumoniae	Немає гомології
Pneumocystis jirovecii (PJP)	Немає гомології
Candida albicans	Немає гомології
Staphylococcus epidermis	Немає гомології
Streptococcus salivarius	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 (EDTA) 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 186 МО/мл (108 копій/мл) у об'ємі елюції, що втричі перевищує 95% порогове значення чутливості набору, визначене при дослідженні аналітичної чутливості**. Усі 110 зразків із додаванням ВІЛ-1 дали позитивний результат тесту на РНК ВІЛ-1. Загальна частота відмов системи RevoDx HIV-1 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 Усього було протестовано 151 клінічний зразок. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HIV-1 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 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 ДНК/РНК 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 ДНК/РНК.

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 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 (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 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 екстрагованої ДНК/РНК, позитивного та негативного контролів. Осадити краплі центрифугуванням.

4. Запрограмувати 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 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 інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (HIV-1)	Сигнал по каналу HEX (ВК)	Інтерпретація
+	+/-	РНК ВІЛ-1 виявлено
-	+	Результат валідний. РНК ВІЛ-1 не виявлено
-	-	Результат невалідний. Цей зразок слід перевірити повторно.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx HIV-1 Qualitative qPCR Kit	25 тестів	IP201924-25
RevoDx HIV-1 Qualitative qPCR Kit	100 тестів	IP201924-100