****

**RevoDx Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D**

**(RevoDx HDV qPCR Kit)**

**Інструкція з використання**

**Кількісне визначення РНК вірусу гепатиту D**

**Тільки для професійного використання**

**Каталожні номери:**

**IP202230-25 – 25 тестів**

**IP202230-50 – 50 тестів**

**IP202230-100 – 100 тестів**

**IP202230-250 – 250 тестів**

**Склад набору**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Колір кришки** | **Назва компонента** | **25 тестів** | **50 тестів** | **100 тестів** | **250 nестів** |
| **1** | **ЗЕЛЕНИЙ** | HDV RM-1 | 350 мкл | 700 мкл | 1400 мкл | 2 х 1750 мкл |
| **2** | **СИНІЙ** | HDV RМ-2 | 25 мкл | 50 мкл | 100 мкл | 250 мкл |
| **3** | **ЧЕРВОНИЙ** | Внутрішній контрольний зразок, ВК HDV (Internal Control, ІС) | 75 мкл | 150 мкл | 300 мкл | 750 мкл |
| **4** | **ЖОВТИЙ** | HDV Стандартний зразок, СЗ 1 (Quantification Standart 1) (107 МО/мл) | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл |
| **5** | **ЖОВТИЙ** | HDV Стандартний зразок, СЗ 2 (Quantification Standart 2) (106 МО/мл) | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл |
| **6** | **ЖОВТИЙ** | HDV Стандартний зразок, СЗ 3, (Quantification Standart 3) (105 МО/мл) | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл |
| **7** | **ЖОВТИЙ** | HDV Стандартний зразок, СЗ 4 (Quantification Standart 4) (104 МО/мл) | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл |
| **8** | **БІЛИЙ** | HDV Негативний контрольний зразок, НКЗ (Negative Control) | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл |

**Транспортування, зберігання та стабільність**

Набори постачаються в замороженому вигляді. Усі компоненти набору RevoDx HDV 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 HDV RM-1 та RM-2 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 HDV qPCR Kit — це набір реагентів для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D людини у сироватці або плазмі крові людини (EDTA) методом ПЛР у реальному часу. 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 інфікованим вірусом гепатиту D, а тому не повинні використовуватись як єдине підгрунтя для прийняття рішення про подальші діагностику та лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

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

Набір RevoDx HDV qPCR Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією HDV та для формування стратегії противірусної терапії в поєднанні з усіма відповідними клінічними та лабораторними результатами.

**Обмеження щодо використання набору**

* Використовувати лише за призначенням
* RevoDx HDV qPCR Kit призначений лише для дослідницького використання
* RevoDx HDV qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК HDV або для підтвердження діагнозу інфекції HDV
* Потенційні мутації в цільових ділянках генів HDV, що покриваються олігонуклеотидами набору, 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 ампліфікацї BIO-RAD CFX96 та Tianlong Gentier 96. При використанні з іншими приладами характеристики набору можуть відрізнятися.
* Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
* Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
* RevoDx HDV qPCR Kit Kit призначений для допомоги в лікуванні пацієнтів із хронічною інфекцією HDV 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 HDV qPCR Kit — це набір для аналізу методом одностадійної РЧ-ПЛР (або ПЛР у реальному часі) зі зворотною транскрипцією. При цьому спочатку на матриці РНК здійснюється зворотна транскрипція з утворенням комплементарних ланцюгів ДНК (кДНК), а потім відбувається ампліфікація кДНК за допомогою фермента ДНК-полімерази. Під час реплікації кДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридизується з ДНК-матрицею і руйнується 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази Thermus aquaticus (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація кДНК, при чому відбувається розділення молекули флуоресцентного барвника та молекули гасника. Утворені продукти ПЛР можна виявити протягом кількох хвилин завдяки підвищенню рівня флуоресценції, яке відбувається експоненціально з кожним наступним циклом ампліфікації у ході ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) – це номер циклу ампліфікації, при якому флуоресценція реакційної суміші перевищує фіксоване порогове значення. Графік (стандартна крива), що відображує залежність порогового циклу Ct (по осі Y) від логарифму кількості копій НК Стандартних зразків 1-4 (по осі Х), є прямою лінією. Кількісне визначення мішені в досліджуваних зразках здійснюється шляхом вимірювання Ct і використання стандартної кривої для визначення вихідної кількості копій. ПЛР-тест на HDV  використовує зовнішні стандартні зразки для обчислення кількісних результатів. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок BK. Цільова область розташована в 5'- нетрансльованій області (UTR) геному HDV. Концентрація РНК HDV зазначається в міжнародних одиницях/мл (МО/мл).

**Прилади**

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

**Загальний опис**

Гепатит D, також відомий як «дельта-гепатит», — це інфекція печінки, спричинена вірусом гепатиту D (HDV). Гепатит D виникає лише у людей, які також інфіковані вірусом гепатиту B. Гепатит D поширюється, коли кров або інші рідини організму людини, інфікованої вірусом, потрапляють в організм людини, яка не інфікована. Гепатит D може бути гострою короткочасною інфекцією або стати тривалою хронічною інфекцією. Гепатит D може викликати серйозні симптоми та серйозне захворювання, яке може призвести до хронічного печінки та навіть смерті (1).

Було підраховано, що вірус гепатиту D (HDV) вражає майже 5% людей у всьому світі, які мають хронічну інфекцію вірусного гепатиту B (HBV), і що супутня інфекція HDV може пояснити приблизно 1 із 5 випадків захворювання печінки та раку печінки у людей з інфекцією HBV (2).

HDV наразі є найменшим вірусом, здатним інфікувати людей, з діаметром частинок 36 нм і геномом лише близько 1,7 кб, який може кодувати дві форми антигену гепатиту D (HDAg), а саме малий HDAg (S-HDAg) і великий HDAg (L-HDAg) (3).

**Список літератури**

1. https://www.cdc.gov/hepatitis/hdv/index.htm

2. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d

3. Chen, LY., Pang, XY., Goyal, H. et al. Hepatitis D: challenges in the estimation of true prevalence and laboratory diagnosis. Gut Pathog 13, 66 (2021).

**Інформація про безпеку**

* 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 ЗІЗ.
* На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючиими розчинами.
* Переконайтесь що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
* Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лаборіях, 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 НК і закінчуючи відповідними зонами використання.

**Характеристики набору**

**Аналітична чутливість** Для визначення межі чутливості набору (limit of detections, LoD) була підготовлена серія розведень міжнародного стандарту HDV від ВООЗ для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірене в 24 повторах. Значення межі виявлення (LoD) становило 47 МО/мл.

**Лінійний діапазон** Серію розведень зразків HDV приготували за допомогою стандарту -- відкаліброваної транскрибованої in vitro РНК, що містить фрагмент геному HDV. Ця стандартка РНК була відкалібрована за стандартами ВООЗ. У клінічні зразки, негативні щодо наявності РНК HDV, додавали цей стандарт, щоб отримати кінцеві концентрації в діапазоні від 1 x 103 МО/мл до 1 x 109 МО/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. У цьому діапазоні залежність між логарифмом цільової РНК і значеннями Ct є лінійною. Аналіз лінійної регресії, що описує значення Ct зележно від логарифму концентрації цільової ДНК, наведено нижче:

Значення Ct = -3,271 (логарифм цільової РНК) + 42,53; з коефіцієнтом кореляції (R2) 0,99.

Верхня межа становить принаймні 1 x 109 МО/мл.

Нижня межа була розрахована за допомогою пробіт-аналізу, виконаного програмою PASW Statistics 18 відповідно до результатів дослідження аналітичної чутливості набору. 95 % нижня довірча межа становить 56 МО/мл. Відповідно до результатів RevoDx HDV qPCR Kit має лінійний діапазон від 35 МО/мл до 1 x 109 МО/мл.

**Прецизійність** Порівнювали отримані результати на одному і тому ж наборі в одній постановці ПЛР (повторюваність, intra-assay), у різних постановках (відтворюваність, inter-assay), між різними партіями (відтворюваність, inter-batch), та для різних типів зразків (плазма EDTA та сироватка). Для кожного окремого аналізу використовували 24 повтори з кожною концентрацією 5x102 та 5x105  МО/мл. Загальна прецизійність набору за значеннями Ct підсумована в наступних таблицях.

**Таблиця 1:** Описова статистика для даних щодо прецизійності роботи набору, значення логарифмічних концентрацій для зразка 5x105 МО/мл.

|  |
| --- |
| **Описова статистика** |
|  | **N** | **Мінімум,****Min** | **Максимум,****ma** | **Середнє значення, Mean** | **Стандартне відхилення, Std.Deviation** | **Дисперсія, Variance** | **Коефіцієнт варіації, Coefficient of****variation (%)** |
| Intra\_assay | 24 | 5,64 | 5,74 | 3,3319 | ,01141 | ,000 | 0,34 |
| Inter\_assay | 24 | 5,64 | 5,77 | 3,3701 | ,01546 | ,001 | 0,46 |
| Inter\_batch | 24 | 5,62 | 5,71 | 3,3409 | ,01058 | ,000 | 0,32 |
| Сироватка | 24 | 5,66 | 5,76 | 3,3502 | ,01343 | ,000 | 0,40 |
| РАЗОМ | 96 | 5,62 | 5,77 | 3,3483 | ,01752 | ,001 | 0,52 |

**Таблиця 2:** Описова статистика для даних щодо прецизійності роботи набору, значення логарифмічних концентрацій для зразка 5x102 МО/мл.

|  |
| --- |
| **Описова статистика** |
|  | **N** | **Мінімум,****Min** | **Максимум,****ma** | **Середнє значення, Mean** | **Стандартне відхилення, Std.Deviation** | **Дисперсія, Variance** | **Коефіцієнт варіації, Coefficient of****variation (%)** |
| Intra\_assay | 24 | 24 | 2,11 | 2,72 | 1,3779 | ,14975 | ,073 |
| Inter\_assay | 24 | 24 | 2,14 | 2,74 | 1,5963 | ,09373 | ,028 |
| Inter\_batch | 24 | 24 | 2,31 | 2,84 | 1,4993 | ,12616 | ,051 |
| Сироватка | 24 | 24 | 2,15 | 2,71 | 1,4179 | ,11123 | ,040 |
| РАЗОМ | 96 | 96 | 2,24 | 2,75 | 1,4729 | ,13461 | ,059 |

**Діагностична специфічність** Для визначення діагностичної специфічності RevoDx HDV qPCR Kit було протестовано 113 клінічний зразок, негативний на РНК HDV від окремих донорів. Було використано 51 клінічний зразок **сироватки крові** та 62 клінічних зразків **плазми ЕДТА, негативних на РНК вірусу гепатиту D.** Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx HDV qPCR Kit становить ≥ 99 %.

**Перехресна реактивність.** Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HDV qPCR Kit проти послідовностей 30 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів HDV і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 17 збудників були протестовані методом ПЛР за допомогою набору RevoDx HDV qPCR Kit на перехресну реактивність. Хибнопозитивних результатів не спостерігалося.

Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР.

**Аналіз перехресної реактивності *in silico***

|  |  |
| --- | --- |
| **Oрганізм** | Цільовий олігонуклеотид |
| Вірус гепатиту С | Немає гомології |
| Цитомегаловірус людини (CMV) | Немає гомології |
| Вірус гепатиту В (HBV= | Немає гомології |
| SARS-CoV-2 | Немає гомології |
| Коронавірус людини 229E | Немає гомології |
| Коронавірус людини OC43 | Немає гомології |
| Коронавірус людини HKU1 | Немає гомології |
| Коронавірус людини NL63 | Немає гомології |
| ГРВІ-коронавірус | Немає гомології |
| MERS-коронавірус | Немає гомології |
| Аденовірус ( наприклад , C1 Ad. 71) | Немає гомології |
| Метапневмовірус людини ( hMPV ) | Немає гомології |
| Парагрип вірус 1-4 | Немає гомології |
| Грип А і В | Немає гомології |
| Ентеровірус ( наприклад , EV68) | Немає гомології |
| Дихальний 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 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 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 (Кат. No: 18/184) | Не виявлено |
| Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard) | NIBSC (Кат. No: 09/162) | Не виявлено |
| 4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT | NIBSC (Кат. No: 10/266) | Не виявлено |
| First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA | NIBSC (Кат. No: 20/146) | Не виявлено |
| Human coronavirus (229E) | NIBSC (Кат. No: 09/132) | Не виявлено |
| Rhinovirus | NIBSC (Кат. No: 08/324) | Не виявлено |
| Human Adenovirus | NIBSC (Кат. No: 16/324) | Не виявлено |
| Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1) | NIBSC (Кат. No: 07/296) | Не виявлено |
| Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2) | NIBSC (Кат. No: 07/298) | Не виявлено |
| Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003) | NIBSC (Кат. No: 07/300) | Не виявлено |
| Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) | NIBSC (Кат. No: 16/194) | Не виявлено |
| Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2) | NIBSC (Кат. No: 16/296) | Не виявлено |
| Human Respiratory syncytial virus A2 | NIBSC (Кат. No: 08/120) | Не виявлено |
| Parainfluenza virus type 1 | NIBSC (Кат. No: 08/176) | Не виявлено |
| Parainfluenza virus type 2 | NIBSC (Кат. No: 08/178) | Не виявлено |
| Parainfluenza virus type 3 | NIBSC (Кат. No: 08/118) | Не виявлено |
| Parainfluenza virus type 4 | NIBSC (Кат. 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 HDV і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалося, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

**Інтенсивність відмов системи (Whole System Failure)** Інтенсивність відмов системи аналізували за допомогою стандарту ВООЗ у концентрації, що втричі перевищує 95% позитивне порогове значення, яке було визначено при дослідженні аналітичної чутливості\*\*. До негативних зразків плазми (ЕДТА) та сироватки крові додали комерційний стандартний зразок HDV від ВООЗ у кількості необхідній для отримання фінальної концентрації 141 МО/мл. Усі 115 зразків із додаванням HDV дали позитивний результат тесту на РНК HDV. Загальна частота відмов системи RevoDx HDV qPCR Kit становить ≤ 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 102 клінічних зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на RevoDx HDV qPCR Kit, співставні з результатами інших наборів із маркуванням CE. Логарифмічні концентрації всіх 102 клінічних зразків знаходяться в межах ±1 логарифмічних концентрацій результату порівнюваного набору.

**Додаткові матеріали та обладнання**

* Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit (Cat. No: IP201906; ІdilВiotech, Туреччина)
* Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
* Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри, тощо.)
* 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 етапі «попереднього тестування», і дуже важливо, щоб відповідна документація була точною та повною.

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 НК. 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 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 HDV оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою РНК HDV 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 HDV 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 HDV RM-2. Компонент HDV RM-2 тримати на льоду. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним 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 (досліджувані клінічні зразки плюс 4 СЗ та НКЗ). Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується додати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.

**3.** В окрему пробірку внестиреагенти із розрахунку 14 мклHDV RM-1 та 1 мкл HDV RM-2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки для ПЛР. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, СЗ 1-4 та НКЗ 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 | 50ºC  | 15 хв |
| Активація полімерази | 1 | 95ºC | 2 хв |
| Ампліфікація | 40 | 95ºC | 10 сек |
| 60ºC\*\*\* | 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 R2 має бути більше 0,98. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Концентрація кожного позитивного зразка буде розрахована програмним забезпеченням (ПЗ) відповідно до стандартної кривої в міжнародних одиницях на мілілітр (МО/мл) Через різні початковий об’єм зразка та об’єм елюції під час виділення вірусної РНК **ПОТРІБНО** використовувати наступну формулу для розрахунку концентрації вихідного клінічного зразка:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Концентрація вихідного зразка,****МО/мл** | **=** | **Концентрація обчислена ПЗ (МО/мл) х Об'єм елюції (мкл)** |
| **Об'єм зразка, внесений для виділення (мкл)** |

Результати інтерпретувати наступним чином:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Сигнал по каналу FAM (РНК HDV)** | **Сигнал по каналу НЕХ (Внутрішній контроль)** | **Обчислена концентрація вихідного зразка** | **Висновок** |
| + | + | <35 МО/мл | Результат валідний.РНК HDV виявлено. Кількісне визначення неможливе, оскільки кількісний результат нижче значення лінійного діапазону аналізу. Відтворюваність позитивного результату не гарантується. |
| + | +/- |

|  |
| --- |
| ≥35 МО/мл |

 | Результат валідний.РНК HDV виявлено в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням, оскільки кількісний результат знаходиться в межах лінійного діапазону аналізу. |
| + | +/- | >1 х 109 МО/мл | Результат валідний.РНК HDV виявлено в концентрації >1 x 109 МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує лінійний діапазон аналізу. |
| - | + | N/A | Результат валідний.Мішень (РНК HDV) не виявлена. |
| - | - | N/A |

|  |
| --- |
| Результат невалідний.Діагностична інтерпретація неможлива. |

 |

**Інформація для замовлення**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Назва продукту** | **Пакування** | **Кат. №.** |
| RevoDx HDV qPCR Kit | 25 тестів | IP202230-25 |
| RevoDx HDV qPCR Kit | 50 тестів | IP202230-50 |
| RevoDx HDV qPCR Kit | 100 тестів | IP202230-100 |
| RevoDx HDV qPCR Kit | 250 тестів | IP202230-250 |