

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	Компонент	25 тестів	50 тестів	100 тестів	250 тестів
1	ЗЕЛЕНИЙ	HDV RM-1	350 мкл	700 мкл	1400 мкл	2 x 1750 мкл
2	СИНИЙ	HDV RM-2	25 мкл	50 мкл	100 мкл	250 мкл
3	ЧЕРВОНИЙ	Внутрішній контрольний зразок HDV (Internal Control, IC)	75 мкл	150 мкл	300 мкл	750 мкл
4	ЖОВТИЙ	HDV Стандартний зразок, C3 1 (Quantification Standart 1) (10 ⁷ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
5	ЖОВТИЙ	HDV Стандартний зразок, C3 2 (Quantification Standart 2) (10 ⁶ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
6	ЖОВТИЙ	HDV Стандартний зразок, C3 3, (Quantification Standart 3) (10 ⁵ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
7	ЖОВТИЙ	HDV Стандартний зразок, C3 4 (Quantification Standart 4) (10 ⁴ МО/мл)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
8	БІЛИЙ	HDV 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 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. Реагенти 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 часі. Набір 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 D, 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 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 протівірусної 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, 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 відрізнятись.
- 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 протівірусної 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 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 відображує 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. 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 (ВК). Цільова ділянка, що розпізнається під час реакції, 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 або «дельта-гепатит» — це інфекція печінки, спричинена вірусом гепатиту D (HDV). Гепатит D виникає лише у людей, які були інфіковані вірусом гепатиту В. Гепатит D передається через кров. Гепатит D може проявлятися у гострій короткочасній формі або хронічній інфекції. Гепатит D може викликати серйозне захворювання, що супроводжується суворими симптомами, які можуть призвести до хронічного ураження 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 В (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 кодує 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 щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
- Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.

- При роботі в лабораторії використовувати засоби індивідуального захисту.
- На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- 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 HDV від ВОЗ 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 повторях. 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 ВОЗ. У клінічні зразки, негативні щодо наявності РНК HDV, додавали цей стандарт, щоб отримати кінцеві концентрації в діапазоні від 1×10^3 МО/мл до 1×10^9 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 залежно 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 1×10^9 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 1×10^9 МО/мл.

Прецизійність

Була оцінена точність (прецизійність) результатів набору щодо внутрішньоаналітичної варіації або **повторюваності** (intra-assay), міжаналітичної варіації (inter-assay) та міжпартійної варіації (inter-batch). Для кожного аналізу було використано 24 повтори з використанням зразків концентрації 5×10^2 та 5×10^5 МО/мл. Загальна точність, що пов'язана зі значеннями Ct (**відтворюваність**), була підсумована в наступних таблицях.

Таблиця 1: Загальний статистичний опис щодо прецизійності даних для зразка 5x10⁵ МО/мл.

Статистичний опис							
	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: Загальний статистичний опис щодо прецизійності даних для зразка 5x10² МО/мл.

Статистичний опис							
	N	Мінімум, Min	Максимум, ma	Середнє значення, Mean	Стандартне відхилення, Std.Deviation	Дисперсія, Variance	Коефіцієнт варіації, Coefficient of variation (%)
Intra_assay	24	2,4	2,11	2,72	1,3779	,14975	,073
Inter_assay	24	2,4	2,14	2,74	1,5963	,09373	,028
Inter_batch	24	2,4	2,31	2,84	1,4993	,12616	,051
Сироватка	24	2,4	2,15	2,71	1,4179	,11123	,040
РАЗОМ	96	2,4	2,24	2,75	1,4729	,13461	,059

Діагностична специфічність

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

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 спостерігалось.

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

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
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
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Перевірка перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	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 висококопозитивних і негативних зразків. У кожному циклі використовували 4 висококопозитивні зразки HDV 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)

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 ВОЗ 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 $\leq 1\%$

****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 102 клінічних зразки. Згідно з результатами, дані, отримані на RevoDx HDV qPCR Kit, співпадають 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; 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, оброблені гепарином, непридатні для використання. Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час збору 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 Наявність внутрішнього контролю (ВК) під час екстракції 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 висококопозитивними 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 ДНК/РНК.

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 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. 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 HDV RM-1 та 1 мкл HDV 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, 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	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 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:

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

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (РНК HDV)	Сигнал по каналу HEX (Внутрішній контроль)	Обчислена концентрація вихідного зразка	Висновок
+	+	<56 МО/мл	Результат валідний. РНК HDV виявлено. Кількісне визначення неможливе, оскільки кількісний результат нижче значення лінійного діапазону аналізу. Відтворюваність позитивного результату не гарантується.
+	+/-	≥56 МО/мл	Результат валідний. РНК HDV виявлено в концентрації, розрахованій програмним забезпеченням, оскільки кількісний результат знаходиться в межах лінійного діапазону аналізу.
+	+/-	>1 x 10 ⁹ МО/мл	Результат валідний. РНК HDV виявлено в концентрації >1 x 10 ⁹ МО/мл. Кількісний аналіз неможливий, оскільки кількісний результат перевищує лінійний діапазон аналізу.
-	+	N/A	Результат валідний. Цільова послідовність (РНК HDV) не виявлена.
-	-	N/A	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

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