



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для **виявлення НК HBV/HCV** **RevoDx** HBV/HCV qPCR Kit

Інструкція з використання

**Набір реагентів для виявлення ДНК вірусу гепатиту В (HBV)
та РНК вірусу гепатиту С (HCV)**

Тільки для професійного використання

**Каталожні номери:
IP202411-25 – 25 тестів
IP202411-100 – 100 тестів**

Склад набору

	Назва компоненту	25 реакцій	100 реакцій
1	HBV/HCV RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	HBV/HCV RM-2	25 мкл	100 мкл
3	HBV/HCV Внутрішній контрольний зразок (Internal control, IC)	75 мкл	300 мкл
4	HBV/HCV Позитивний контрольний зразок (Positive control sample, PC)	100 мкл	100 мкл
5	HBV/HCV Негативний контрольний зразок (Negative control sample, NC)	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти набору RevoDx HBV/HCV 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/HCV 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 HBV/HCV qPCR Kit – це набір реагентів для якісного виявлення ДНК вірусу гепатиту В (ВГВ, HBV) та РНК вірусу гепатиту С (ВГС, HCV) в сироватці або плазмі крові людини (EDTA) методом ПЛР у реальному часі. Призначений для *in vitro* діагностики.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими збудниками. Виявлений агент може не бути єдиною причиною захворювання.

Негативні результати тесту ПЛР не виключають можливості, що пацієнт є 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 HBV/HCV qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання набору

- Використовувати лише за призначенням
- RevoDx HBV/HCV qPCR Kit призначений для використання у дослідницьких цілях.
- Потенційні мутації в цільових ділянках генів вірусів, 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, оброблені гепарином, непридатні для використання з набором.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або невалідних результатів тесту.
- Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.

- Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
- 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/HCV qPCR Kit — це RT-PCR-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ділянки S-гену геному HBV та 5'-нетрансльованої області (UTR) геному HCV в одній пробірці, в якій одночасно виявляється внутрішній контроль.

RevoDx HBV/HCV 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 перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Метод виконується безпосередньо на ДНК/РНК, виділених зі зразків пацієнта. Виявлення ДНК вірусу гепатиту В (HBV) та РНК вірусу гепатиту С (HCV) здійснюється в одній пробірці, в якій одночасно виявляється внутрішній контроль. Область гена S геному HBV детектується за каналом FAM. 5'-нетрансльована ділянка (UTR) геному ВГС детектується за каналом Cy5. Внутрішній контроль детектується за каналом HEX.

Прилади

Набір RevoDx HBV/HCV qPCR Kit можна використовувати із ампліфікаторами для ПЛР у реальному часі BIO-RAD CFX96, Tianlong Gentier 96, Applied Biosystems QuantStudio5, а також деякими приладами ДНК-технології серії ДТ (DT-prime, DT-lite). Але набір RevoDx HBV/HCV qPCR Kit також може бути використовуватись із більшістю ампліфікаторів для ПЛР у реальному часі з каналами детекції FAM, HEX та Cy5.

Загальний опис

Набори для одночасного виявлення кількох патогенів високого ризику, як наприклад RevoDx HBV/HCV qPCR Kit, важливі з кількох наступних причин.

Тести для аналізу нуклеїнових кислот (NAT) здатні виявити генетичний матеріал вірусів (РНК або ДНК) на ранній стадії інфекції, часто до вироблення антитіл імунною системою. Така рання діагностика дозволяє швидке втручання та лікування інфікованих осіб, що дозволяє запобігти прогресуванню захворювання та знизити ризик передачі іншим. Порівняно з традиційними тестами на основі антитіл, аналізи NAT значно скорочують період серонегативного вікна — часу між зараженням і виявленням антитіл, і таким чином мінімізувати отримання хибно негативних результатів під час цієї критичної фази перебігу захворювання.

Завдяки можливості точної ідентифікації осіб, інфікованих вірусами гепатиту В та С, тести NAT відіграють важливу роль у

моніторингу громадського здоров'я, і дозволяють органам охорони здоров'я контролювати поширеність цих інфекцій та впроваджувати відповідні профілактичні заходи та ефективно використовувати ресурси. Людям, які піддаються ризику зараження даними вірусами, наприклад медичним працівникам або особам із поведінкою високого ризику, регулярне тестування може забезпечити емоційний спокій і допомогти в ранній діагностиці та лікуванні інфекцій.

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.
- Поводьтеся 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 виявлення набору (limit of detections, LoD), була підготовлена серія розведень вторинного стандарту ВООЗ для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл. Вірусну РНК очищували за допомогою RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) для кожної мішені було наступним:

Для HBV: 16 МО/мл Для HCV: 18 МО/мл

Діагностична специфічність 167 клінічних зразків від окремих донорів, що показали негативний результат на наявність ДНК ВГВ та РНК ВГС, були протестовані для визначення діагностичної специфічності RevoDx HBV/HCV qPCR Kit. Було використано 71 клінічний зразок сироватки крові, негативні на НК вірусів, і 96 клінічних зразків плазми ЕДТА, негативні на НК вірусів. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx HBV/HCV qPCR Kit становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HBV/HCV qPCR Kit проти послідовностей 27 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 13 збудників були протестовані на перехресну реактивність за допомогою RevoDx HBV/HCV qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось. Нижче наведені результати перевірки перехресної реактивності, як *in silico*, так і у постановці ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *In silico*

Організм	Результат
Цитомегаловірус (CMV)	Немає гомології
Коронавірус SARS-CoV-2	Немає гомології
Коронавірус людини 229E	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології
Коронавірус людини HKU1	Немає гомології
Коронавірус людини NL63	Немає гомології
Коронавірус SARS	Немає гомології
Коронавірус MERS	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу A і B	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Candida albicans</i>	Немає гомології
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології

Перевірка перехресної реактивності методом ПЛР

Організм*	Джерело	Результат
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Cat. No: 09/162)	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 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 стандартного зразка з концентрацією вірусних часток, що втричі перевищує 95% порогове значення чутливості набору, визначене при дослідженні аналітичної чутливості**. До негативних клінічних зразків (сироватки та ЕДТА-плазми) додали міжнародні стандарти BOO3 відповідного вірусу для отримання кінцевої концентрації, що втричі перевищує 95% порогове значення чутливості набору для даного вірусу. Усі 122 зразки із додаванням стандартів BOO3 дали позитивний результат тесту на НК відповідного вірусу. Загальна частота відмов системи RevoDx HBV/HCV qPCR Kit становить $\leq 1\%$

****Це концентрація аналіту, при якій 95 % тестів дають позитивні результати після серійних розведень міжнародного еталонного матеріалу, наприклад, стандарту BOO3 або каліброваних еталонних матеріалів.**

Порівняльні клінічні випробування Усього було протестовано 112 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на наборі RevoDx HBV/HCV qPCR Kit, співпадають 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 забору 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 кровіалу/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 прогріти їх до кімнатної температури перед початком процедури. При наявності осаду, видалити його центрифугуванням протягом 3 хв при 5000x g.

Протокол

Виділення РНК вірусу Для екстракції НК вірусів 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 вірус-мішень, оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою ДНК/РНК вірусу під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 28 ± 4 , інші значення вказують на проблему під час екстракції НК.

Позитивний контроль Позитивний контроль включає плазмиду, що містить вставку – для ВГВ, і транскрибовану *in vitro* РНК, що містить вставку для ВГС. Позитивний контроль ампліфікується в окремій реакційній пробірці. Щоб можна було оцінити експеримент, значення Ct позитивного контролю повинні дорівнювати 26 ± 4 , інші значення вказують на проблему при ампліфікації.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім HBV/HCV RM-2. Компонент HBV/HCV 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 HBV/HCV RM-1 та 1 мкл HBV/HCV RM-2 на один зразок. Перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл суміші у пробірки для ПЛР. Внести по 5 мкл досліджуваних зразків, позитивного та негативного контролів 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, HEX та Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM, HEX та Cy5.
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Результати вважати валідними, якщо значення порогового циклу Ct для позитивного контрольного зразка становить 26±4 по каналах FAM та HEX, а для негативного контрольного зразка сигнал відсутній. В іншому разі випробування необхідно провести повторно.

Результати інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (ДНК HBV)	Сигнал по каналу Cy5 (РНК HCV)	Сигнал по каналу HEX (ВК)	Інтерпретація
+	-	+/-	ДНК HBV виявлена
-	+	+/-	РНК HCV виявлена
-	-	+	Результат валідний. НК збудників не виявлено
-	-	-	Невалідний результат. Зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx HBV/HCV qPCR Kit	25 тестів	IP202411-25
RevoDx HBV/HCV qPCR Kit	100 тестів	IP202411-100