RevoDx Набір для виявлення РНК вірусу гепатиту С

RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне визначення РНК вірусу гепатиту С
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP201923-25 – 25 тестів
IP201923-50 – 50 тестів
IP201923-100 – 100 тестів
IP201923-250 – 250 тестів

Склад набору

	Компоненти	25 тестів	50 тестів	100 тестів	250 тестів
1	HCV RM - 1	350 мкл	700 мкл	1400 мкл	2 x 1750 мкл
2	HCV RM - 2	25 мкл	50 мкл	100 мкл	250 мкл
3	Внутрішній контрольний зразок (Internal Control)	75 мкл	150 мкл	300 мкл	750 мкл
4	HCV Позитивний контрольний зразок (Positive Control)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл
5	HCV 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 RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25 °C до -15 °C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умови належного зберігання всі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, який вказаний на етикетці продукту. Реагенти HCV RM 1 і RM 2 не можна заморожувати та розморожувати більше 3 разів; оскільки це може призвести до зниження чутливості. 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 HCV Qualitative qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення РНК вірусу гепатиту С (ВГС, HCV) у сироватці або плазмі 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. 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, 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 HCV Qualitative qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики in vitro.

Обмеження використання продукту

- Використовувати лише за призначенням.
- RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit призначений лише для дослідницького використання.
- RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК HCV або для підтвердження діагнозу інфекції HCV.
- Потенційні мутації в цільових областях геному ВГС, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідовано для використання з людською сироваткою або плазмою, зібраною в антикоагулянті EDTA . Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, непридатні для використання.
- Цей набір валідовано для використання з RevoDx Viral Nucleic Acid Purification Kit. Використання інших наборів для екстракції може негативно вплинути на характеристики тест-системи.
- 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 HCV 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 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. Для контролю якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Прилади

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

Загальний опис

Майже 170 мільйонів людей у всьому світі інфіковані вірусом гепатиту С (ВГС, HCV). Приблизно 85% цих людей мають персистентну форму інфекції, що може мати такі ускладнення як цироз печінки та гепатоцелюлярна карцинома (1). ВГС класифікують на генотипи 1-6 в залежності від генетичних особливостей (2). Головна мета генотипування ВГС полягає у можливості підібрати правильну схему і тривалість терапії, оскільки генотипи відрізняються за сприйнятливістю до противірусної терапії (3).

Геноми вірусу гепатиту С (HCV) розрізняють за допомогою рекомбінантних комплементарних РНК. Вірус гепатиту С (HCV) належить до родини *Flaviviridae*. Це сферичний оболонковий вірус діаметром 30-60 нм з геномом, що представлений одноланцюговою РНК. З усуненням використання HBsAg позитивної крові, ВГС став найпоширенішою причиною посттрансфузійного гепатиту (4).

Список літератури

1. Banker PD. Viral hepatitis. Ind J Med Sci 2003; 57: 461-68.
2. Conte D, Fraquelli M, Prati D et al. Prevalence and clinical worse of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission on a cohort of 15, 250 pregnant women. Hepatology 2000; 31: 751-55.
3. BankerDD,DesaiP,BrawnerTAetal.Hepatitisdeltavirusinfection in Bombay. Trans Roy Soc TropMed Hyg 1992; 86: 424-25.
4. Kuo G, Choo QL, Aher HJ. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of non-A non-B viral hepatitis. Science 1989; 244: 362-647. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2015; 61(1):77–87. doi: 10.1002/hep.27259 PMID: 25069599

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.
- 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 якомога далі 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 HCV 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 14 МО/мл.

Виявлення генотипів Ефективність набору RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit було оцінено за допомогою стандартної панелі зразків SeraCare Life Sciences HCV RNA Genotype Performance Panel. Згідно з результатами, дані, отримані RevoDx HCV qPCR Kit, сумісні з результатами інших наборів. RevoDx HCV qPCR Kit може виявляти всі генотипи HCV.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit було протестовано 121 клінічний зразок, негативний на РНК HCV від окремих донорів. Було використано 60 клінічних зразків **сироватки крові** і 61 клінічний зразок **плазми ЕДТА, негативних на РНК вірусу гепатиту С.** Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit становить ≥ 99 %.

Перехресна реактивність. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx HCV Qualitative qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір буде специфічним для цільових генів HCV і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 16 збудників були протестовані методом ПЛР за допомогою набору RevoDx HCV Qualitative 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*

Організм	Результат
Цитомегаловірус людини (HCMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В	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
Вірус парагрипу 1-4	Немає гомології
Грип A і B	Немає гомології
Ентеровірус (наприклад, 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
Pseudomonas aeruginosa	Немає гомології
Staphylococcus epidermis	Немає гомології
Streptococcus salivarius	Немає гомології

Перевірка перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Результат
Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification Techniques (1st International Standard)	NIBSC (Кат. №: 09/162)	Не виявлено
4th WHO International Standard for HBV DNA for NAT	NIBSC (Кат. №: 10/266)	Не виявлено
First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	NIBSC (Кат. №: 20/146)	Не виявлено
Human coronavirus (229E)	NIBSC (Кат. №: 09/132)	Не виявлено
Rhinovirus	NIBSC (Кат. №: 08/324)	Не виявлено
Human Adenovirus	NIBSC (Кат. №: 16/324)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Кат. №: 07/296)	Не виявлено
Influenza Virus (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Кат. №: 07/298)	Не виявлено
Influenza Virus (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Кат. №: 07/300)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)	NIBSC (Кат. №: 16/194)	Не виявлено
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)	NIBSC (Кат. №: 16/296)	Не виявлено
Human Respiratory syncytial virus A2	NIBSC (Кат. №: 08/120)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 1	NIBSC (Кат. №: 08/176)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 2	NIBSC (Кат. №: 08/178)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 3	NIBSC (Кат. №: 08/118)	Не виявлено
Parainfluenza virus type 4	NIBSC (Кат. №: 08/180)	Не виявлено

**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 ВГС і 4 негативні зразки. Перехресної контамінації не спостерігалося, і жоден із зразків не виявив ознак вмісту інгібіторів ПЛР, що видно з ампліфікації внутрішнього контролю.

Збій тест-системи (Whole System Failure) Можливість збою роботи тест-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 HCV від ВООЗ у кількості необхідній для отримання фінальної концентрації 42 МО/мл. Усі 120 зразків із додаванням HCV дали позитивний результат тесту на РНК HCV. Загальна частота збоїв RevoDx HCV Qualitative 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 109 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, отримані на RevoDx HCV Qualitative 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 (Кат.№: IP201906; IdilBiotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту (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/strip-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі

Підготовка зразка

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, які передаються через кров. Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані з 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 точне і повне документування.
Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Центрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в кріопробірку 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 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 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 HCV оскільки існує конкуренція між молекулою внутрішнього контролю та молекулою РНК HCV під час використання компонентів ПЛР. Значення Ct внутрішнього контролю для негативних зразків має дорівнювати 30 ± 4, інші значення вказують на проблему під час екстракції 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 HCV RM-2. Компонент HCV 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. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки (стандарти 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 HCV RM 1 та 1 мкл HCV 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, позитивного контролю та негативного контролю 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 мати можливість проаналізувати експеримент, значення Ct позитивного контролю за каналом FAM має дорівнювати 26±4, а негативний контроль по всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати можна інтерпретувати наступним чином:

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