

Набір для qPCR **RevoDx** HIV-1/2

Інструкція із застосування

**Якісне виявлення РНК вірусу імунodefіциту людини типу 1 та типу 2
(ВІЛ-1 та ВІЛ-2)
Тільки для
дослідницького
використання Тільки
для професійного
використання**

**Номери продуктів:
IP202238-25 - 25 тестів
IP202238-100 - 100 тестів**

Компоненти продукту

	Назва компонента	25 тестів	100 тестів
1	ВІЛ-1/2 RM-1	350 мкл	1400 мкл
2	ВІЛ-1/2 RM-2	25 мкл	100 мкл
3	Внутрішній контроль ВІЛ-1/2	75 мкл	300 мкл
4	Контроль ВІЛ-позитивного статусу	100 мкл	100 мкл
5	Негативний контроль ВІЛ-1/2	100 мкл	100 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори постачаються в замороженому вигляді. Всі компоненти набору RevoDx HIV-1/2 qPCR слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умови належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці продукту. ВІЛ 1/2 RM 1 флакон не можна заморожувати-розморожувати більше 3 разів, оскільки це може призвести до зниження чутливості. В іншому випадку розділіть його на аліквоти зручного розміру і зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Використання за призначенням

RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit - це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення РНК вірусу імунодефіциту людини типу 1 і типу 2 (ВІЛ-1/2) у сироватці або плазмі крові людини (EDTA) за допомогою набору для очищення вірусних нуклеїнових кислот RevoDx та системи для ампліфікації, детектування та аналізу BIO-RAD CFX96 або Tianlong Gentier 96 в режимі реального часу.

Негативні результати не виключають інфікування ВІЛ 1/2 і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо ведення пацієнта. Негативні результати повинні поєднуватися з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx HIV-1/2 qPCR призначений для використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічних лабораторій, який пройшов спеціальний інструктаж і навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам діагностики in vitro.

Обмеження щодо використання продукту

- Тільки за рецептом лікаря
- Набір RevoDx HIV-1/2 qPCR призначений лише для дослідницьких цілей.
- Набір RevoDx HIV-1/2 qPCR не призначений для скринінгу крові та продуктів крові на наявність РНК ВІЛ-1/2 або для підтвердження діагнозу інфікування ВІЛ-1/2.
- Потенційні мутації в цільових ділянках геному ВІЛ-1/2, що покриваються олігонуклеотидами набору, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Цей набір валідований для використання з людською сироваткою або людською плазмою, зібраною в антикоагулянті EDTA. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, не придатні для використання.
- Цей набір валідований для використання з набором для очищення вірусних нуклеїнових кислот RevoDx. Використання інших наборів для очищення може негативно вплинути на робочі характеристики набору.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або недійсних результатів тесту.
- Цей набір валідований для використання з системами для ПЛР-детекції в реальному часі BIO-RAD CFX96 і Tianlong Gentier 96. Використання інших приладів може негативно вплинути на робочі характеристики набору.
- Надійні результати залежать від правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Він призначений для професійного використання належним чином підготовленим персоналом.
- Для отримання оптимальних результатів ПЛР дотримуйтеся інструкцій в інструкції до продукту.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

Опис продукту

RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit - це одностадійний аналіз ПЛР зі зворотною транскрипцією в реальному часі, в якому шаблони РНК спочатку піддаються зворотній транскрипції для отримання комплементарних ланцюгів ДНК (кДНК), а потім відбувається ампліфікація кДНК, опосередкована ДНК-полімеразою. Під час реплікації кДНК в процесі ПЛР гідролізний зонд гібридується з шаблоном і перетравлюється 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази Thermus aquaticus (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація кДНК, розділяючи флуоресцентні молекули та молекули гасителя. Продукти ПЛР виявляються протягом декількох хвилин шляхом моніторингу збільшення флуоресценції, яке відбувається експоненціально з послідовними циклами ампліфікації ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) визначається як дробовий номер циклу, при якому флуоресценція перевищує фіксований поріг. У ПЛР-аналізі ВІЛ-1/2 у реальному часі використовується внутрішній контроль, який контролює виділення та ампліфікацію мішені.

Інструменти

Набір RevoDx HIV-1/2 qPCR призначений для використання з системами ПЛР-детекції в реальному часі BIO-RAD CFX96 і Tianlong Gentier 96. Але RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit також може бути сумісним з більшістю систем ПЛР-детекції в реальному часі з каналами FAM, HEX і Cy5.

Загальний опис

ВІЛ - це вірус, який може призвести до СНІДу, стану, коли імунна система організму пошкоджена і не може боротися з інфекціями. У Сполучених Штатах ВІЛ поширюється переважно статевим шляхом, через заражені голки, під час пологов та грудного вигодовування.

ВІЛ-1 та ВІЛ-2 - це два типи вірусу імунодефіциту людини, які були охарактеризовані на сьогоднішній день. Обидва віруси були виявлені у пацієнтів зі СНІДом. ВІЛ-2 зустрічається рідше, ніж ВІЛ-1, але все одно дуже небезпечний. Хоча він вражає переважно людей, які живуть у Західній Африці, він повільно, але неухильно поширюється в таких регіонах, як Європа, Азія та Америка.

Рання діагностика дозволяє людям з ВІЛ розпочати лікування одразу, коли вони можуть отримати найбільшу користь від регулярних візитів до лікаря. Тестування на ВІЛ дає всім людям інформацію про їхній ризик, щоб вони могли захистити себе, своїх партнерів і сім'ї від цієї серйозної та невеличкової хвороби.

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 з б у д н и к а інфекції.
- Всі отримані відходи слід розглядати як потенційно інфекційні. З ними слід поводитися та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реактивами набору. У разі потрапляння ретельно промити водою.
- Уникайте утворення розливів або аерозолів.
- Ніколи не піпетуйте розчини в рот
- Не їжте, не пийте і не паліть у місцях проведення лабораторних робіт.
- Мийте руки після роботи зі зразками та тестовими реагентами.
- Вся інформація про MSDS доступна за запитом
- Під час роботи завжди одягайте захисний лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри.
- До і після процедури ретельно дезінфікуйте всі робочі поверхні свіжоприготовленим 10% розчином відбілювача або противірусного засобу.
- Переконайтеся, що в роботі з цією системою не використовується DNase/RNase.
- Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до належних лабораторних практик, щоб запобігти перехресному забрудненню.
- Використовуйте тільки відкалібровані піпетки, завжди мийте наконечники піпеток між перенесеннями рідини (рекомендується використовувати наконечники з аерозольним бар'єром)
- Тримайте набір подалі від будь-яких джерел забруднюючих нуклеїнових кислот, особливо ампліфікованих нуклеїнових кислот.
- В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих приміщеннях. (наприклад, для очищення ДНК/РНК, налаштування ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти забрудненню.
- Все обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між окремими зонами. Рукавички слід знімати і утилізувати перед тим, як залишити одну зону і перейти до іншої. Лабораторні халати повинні бути специфічними для кожної зони і ніколи не носити їх за межами цієї зони.
- Роботи повинні виконуватися в одному напрямку, починаючи з ділянки видобутку і з а к і н ч у ю ч и обраними областями застосування.

Дані про продуктивність

Аналітична чутливість Для визначення межі виявлення (МД) була підготовлена серія розведень вторинного стандарту ВІЛ-1/2 для отримання кінцевих концентрацій 1000, 200, 40, 8 і 1,6 МО/мл. Вірусну РНК очищали за допомогою набору для очищення вірусних нуклеїнових кислот RevoDx. Кожне розведення тестували в 24 повтореннях. Межа виявлення (LoD) с т а н о в и л а 62 МО/мл.

Діагностична специфічність Для визначення діагностичної специфічності набору RevoDx HIV-1/2 qPCR було протестовано 106 РНК-негативних клінічних зразків ВІЛ-1/2 від індивідуальних донорів. Було використано 52 клінічні зразки **сироватки крові** з негативною РНК В І Л - 1 / 2 та 54 клінічні зразки **плазми крові** з негативною РНК В І Л - 1 / 2 за тестом **EDTA**. Жоден з протестованих зразків не дав позитивного результату на мішень. Діагностична специфічність набору RevoDx HIV-1/2 qPCR становить $\geq 99\%$.

Перехресна реактивність Аналіз in silico праймерів і зондів RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit проти послідовностей 29 патогенів показав, що набір є специфічним до цільових генів ВІЛ-1/2 і не дає перехресної реакції з цими патогенами. 15 патогенів, перерахованих нижче, були протестовані за допомогою набору RevoDx HIV-1/2 qPCR на перехресну реактивність. Хибнопозитивних результатів не виявлено.

Результати перехресної реактивності, як в силіконі, так і в мокрому тестуванні, підсумовані нижче.

Аналіз перехресної реакційної здатності in silico

Організм	Цільові оліго
Вірус гепатиту С	Немає гомології
Цитомегаловірус людини (HCMV)	Немає гомології
Вірус гепатиту В	Немає гомології
SARS-CoV-2	Немає гомології
Людський коронавірус 229E	Немає гомології
Коронавірус людини OC43	Немає гомології
Людський коронавірус HKU1	Немає гомології
Людський коронавірус NL63	Немає гомології
ГРПІ-коронавірус	Немає гомології
MERS-коронавірус	Немає гомології
Аденовірус (наприклад, C1 Ad. 71)	Немає гомології
Металневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4	Немає гомології
Грип А та В	Немає гомології
Ентеровірус (наприклад, 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>Кашлюкова паличка (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>Стафілокок епідермісу</i>	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності мокрим методом

Організм	Джерело	Результат
РНК вірусу гепатиту С для методів ампліфікації нуклеїнових кислот (6-та конференція ВООЗ Міжнародний стандарт)	NIBSC (кат. №: 18/184)	Не виявлено
Цитомегаловірус людини (HCMV) для методів ампліфікації нуклеїнових кислот (1-е видання) Міжнародний стандарт	NIBSC (кат. №: 09/162)	Не виявлено
4-й Міжнародний стандарт ВООЗ щодо ДНК ВГВ для НАТ	NIBSC (кат. №: 10/266)	Не виявлено
Перший міжнародний стандарт ВООЗ на РНК SARS-CoV-2	NIBSC (кат. №: 20/146)	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (кат. №: 09/132)	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (кат. №: 08/324)	Не виявлено
Аденовірус людини	NIBSC (кат. №: 16/324)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (кат. №: 07/296)	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (кат. №: 07/298)	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (кат. №: 07/300)	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини А2	NIBSC (кат. №: 08/120)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 1	NIBSC (кат. №: 08/176)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 2	NIBSC (кат. №: 08/178)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 3	NIBSC (кат. №: 08/118)	Не виявлено
Вірус парагрипу типу 4	NIBSC (кат. №: 08/180)	Не виявлено

Перехресна контамінація Було оцінено потенційну перехресну контамінацію між зразками. Було проведено п'ять різних циклів тестування з чергуванням високопозитивних і негативних зразків. 4 високопозитивних зразки ВІЛ-1/2 і 4 негативних зразки ВІЛ-1/2 використовувалися в кожному циклі. Перехресної контамінації не спостерігалось, і жоден зі зразків не містив ознак наявності інгібіторів ПЛР, на що вказує ампліфікація внутрішнього контролю.

Неспроможність всієї системи Неспроможність всієї системи аналізували за використанням стандарту в концентрації, що в 3 рази перевищує 95% позитивне значення відсікання, визначене за допомогою дослідження аналітичної чутливості. ВІЛ-1/2 негативні клінічні зразки (сироватка та плазма EDTA) були розведені міжнародним стандартом ВООЗ ВІЛ-1/2 для отримання кінцевої концентрації 186 МО/мл. Всі 110 зразків з додаванням ВІЛ-1/2 дали позитивний результат на РНК ВІЛ-1/2. Частота відмов всієї системи RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit становить $\leq 1\%$.

Клінічне порівняльне дослідження Всього було протестовано 109 клінічних зразків. Згідно з результатами, дані, зібрані за допомогою RevoDx HIV-1/2 qPCR Kit, сумісні з результатами інших приладів, маркованих знаком CE. Логові концентрації всіх 109 клінічних зразків знаходяться в діапазоні $\pm 1 \log$ концентрації від результату порівняльного приладу.

Необхідні додаткові матеріали

- Набір для очищення вірусних нуклеїнових кислот RevoDx (кат. №: IP201906; idil biotech, Туреччина)
- Система ПЛР-детекції в реальному часі,
- Відповідний захист (захисний лабораторний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри тощо)
- Мікропіпетки (0,5 мкл - 1000 мкл),
- Наконечники для мікропіпеток без DNase/RNase з фільтрами,
- Мікроцентрифужні пробірки, що не містять ДНК/РНКаз, по 1,5 мл,
- Вихровий змішувач,
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стрип-пробірок,
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок на 2,0 мл,
- Робоча станція ПЛР,

Реакційні пробірки або планшети для ПЛР в режимі реального часу:

Підготовка зразків

Цей набір валідований для використання зі свіжою або замороженою людською сироваткою або плазмою, зібраною в антикоагулянті EDTA. Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, не підходять для використання. З клінічними зразками слід поводитися як з потенційно інфекційними; при зборі та обробці зразків рекомендується дотримуватися запобіжних заходів щодо патогенів, які переносяться з кров'ю. Клініцисти (включаючи фельдшерів, медсестер, лікарів і фахівців, пов'язаних з медициною) несуть відповідальність за дотримання правильної процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на дотестовому етапі, тому важливо, щоб документація була точною і повною.

Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Відцентрифугуйте кров і перенесіть сироватку або плазму в кріопробірку з гвинтовою кришкою. Транспортування цільної крові, сироватки або плазми повинно відповідати державним або місцевим правилам. Зразки сироватки або плазми можна зберігати при температурі 2-8°C до 24 годин або заморозити при -70°C або нижче для тривалого зберігання. Слід уникати повторних циклів заморожування/розморожування, оскільки це призведе до зниження титру вірусу. Перед перенесенням у пробірку зразки необхідно перемішати, перевернувши пробірку або піпетуючи кілька разів. Якщо ви використовуєте заморожені зразки, врівноважте їх до кімнатної температури перед початком процедури. Видаліть осад, якщо він є, центрифугуванням протягом 3 хв при 5 000 x g.

Протокол

Набір для очищення вірусних нуклеїнових кислот RevoDx слід використовувати для виділення вірусної РНК з сироватки або плазми крові людини, зібраної в антикоагулянті EDTA. Використання інших наборів для очищення може негативно вплинути на робочі характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника, викладених в інструкції до набору. В ідеалі операції слід проводити в трьох окремих зонах. (наприклад, для очищення ДНК/РНК, постановки ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації.

Внутрішній контроль Присутність внутрішнього контролю (ВК) під час процедури очищення є необхідною. Внутрішній контроль включає в себе 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 IC в розчин для лізису з набору для очищення вірусних нуклеїнових кислот RevoDx. **Не додавайте IC безпосередньо в зразок сироватки/плазми.** Залежно від кінцевого об'єму елюції розраховується об'єм IC, який необхідно додати (0,05 мкл IC/1 мкл буфера для елюції). Поганий сигнал або відсутність сигналу може спостерігатися у каналі внутрішнього контролю, де ампліфікуються високопозитивні зразки ВІЛ-1/2, оскільки під час використання компонентів ПЛР відбувається конкуренція між шаблоном внутрішнього контролю і шаблоном РНК ВІЛ-1/2. Значення Ct внутрішнього контролю негативного зразка має дорівнювати 30 ± 4 , в іншому випадку це вказує на проблему під час очищення.

Позитивний контроль Для того, щоб можна було оцінити експеримент, значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4 , інакше це вказує на проблему.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти за кімнатної температури, окрім HIV-1/2 RM 2. Покладіть HIV-1/2 RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, а потім коротко центрифугуйте перед використанням. Перенесіть всі реагенти на лід або холодильний блок.

2. Остаточний об'єм майстер-міксу отримують шляхом множення об'ємів окремих реакцій РМ 1 і РМ 2 на загальний об'єм зразка. При розрахунку загального об'єму зразка слід враховувати кількість негативних/позитивних контролів і клінічних зразків. Для усунення можливих помилок при піпетуванні рекомендується додати додатковий зразок до загального об'єму зразка.

3. Щоб приготувати майстер-мікс, додайте 14 мкл ВІЛ-1/2 РМ 1 і 1 мкл ВІЛ-1/2 РМ 2 для кожного зразка в пробірку з майстер-міксом. Пробірку встряхніть і коротко прокрутіть у мікроцентрифужі. Додайте 15 мкл майстер-міксу в пробірки або капіляри для ПЛР у реальному часі для кожного зразка. Додайте по 5 мкл РНК кожного зразка, негативного і позитивного контролю в пробірки. Коротко прокрутіть.

6. Введіть умови циклізації для системи ПЛР-детекції в режимі реального часу: 50°C протягом 15 хвилин; 95°C протягом 2 хвилин, 1 цикл; 95°C протягом 10 секунд, 60°C протягом 20 секунд, 40 циклів (Таблиця 3). Введіть 20 мкл як об'єм зразка.

Таблиця 3: Програма посилення

Назва програми	Цикли	Програма
кДНК Синтез	1	50°C, 15 хв
Гарячий старт	1	95°C, 2 хв
Посилення*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек

* Флуорогенні дані слід збирати при 60°C; слід обрати канали FAM, HEX та Cy5

7. Флуорогенні дані збираються при 60°C. Необхідно вибрати FAM, HEX і Cy5-канали.

8. Починай біг.

9. Щоб запрограмувати та проаналізувати результати, зверніться до посібника користувача відповідного приладу.

Аналіз даних

Для того, щоб оцінити аналіз, значення Ct позитивного контролю в каналі FAM має дорівнювати 26 ± 4 , а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати можна інтерпретувати як:

Сигнал у будь-якому каналі FAM (РНК ВІЛ-1)	Сигнал у будь-якому каналі HEX (РНК ВІЛ-2)	Сигнал у каналі Cy5 (Внутрішній контроль)	Усний переклад
+	-	+/-	РНК ВІЛ-1 позитивна
-	+	+/-	РНК ВІЛ-2 позитивна
-	-	+	ДНК мішені не виявлено
-	-	-	Неправильний результат. Цей зразок слід протестувати повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Пакет	Кет. Ні.
Набір для qPCR RevoDx HIV-1/2	25 тестів	IP202238-25
Набір для qPCR RevoDx HIV-1/2	100 тестів	IP202238-100