



НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РНК ВІРУСУ ГЕПАТИТУ D

HDV RNA Quantification Kit

Кат. №: **LUA-PCR.HDV-RG.32**
Кількість тестів: **32**

Дата останнього перегляду інструкції: **07-2020**
Версія: **7**

ЗМІСТ

1 ВСТУП.....	2
1.1 Призначення.....	2
1.2 Інформація про збудника.....	2
1.3 Технічна підтримка	2
1.4 Символи та аббревіатури	2
2 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ.....	3
3 ОПИС ТА ПРИНЦИП АНАЛІЗУ.....	3
3.1 Принцип аналізу TaqMan®	3
3.2 Пояснення кількісного аналізу для визначення РНК вірусу гепатиту D	4
3.3 Обмеження.....	4
4 ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ.....	4
4.1 Аналітична чутливість	4
4.2 Лінійний діапазон	5
4.3 Специфічність.....	5
4.4 Точність.....	6
4.5 Надійність.....	7
4.6 Діагностична оцінка	7
6 НЕОБХІДНЕ ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ДОДАТКИ.....	9
7 ПРОЦЕДУРА.....	9
7.1 Збір та обробка клінічних зразків.....	9
7.2 Очищення РНК HDV від клінічних зразків	10
7.3 Внутрішній контроль РНК.....	10
7.4 Загальна процедура кількісного аналізу.....	10
8 ПРОТОКОЛ.....	10
8.1 Підготовка внутрішнього контролю.....	10
8.2 Приготування 25x Суміші реагентів.....	10
8.3 Приготування 1x Майстер-міксу	11
9 АНАЛІЗ ДАНИХ.....	12
10 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ.....	14

1 ВСТУП

1.1 Призначення

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D призначений для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D (HDV) за допомогою ПЛР у реальному часі у зразках ЕДТА плазми та сироватки людини за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA. Доступні дві версії набору: низькопрофільні стрипи 0.1 мл (мл) (білі) для систем LightCycler® 480 та 7500 Fast ПЛР в режимі реального часу і пробірки зі звичайним профілем 0.2 мл (мл) (прозорі) для застосування на Rotor-Gene™ 3000/6000/Q відповідно. Аналіз призначений для клінічного лікування пацієнтів із хронічними інфекціями HDV у поєднанні з симптомами та іншими лабораторними маркерами захворювання.

Цей тест призначений для оцінки вірусної відповіді на противірусну терапію, що вимірюється за змінами рівня РНК HDV у плазмі та сироватці. Крім того, під час курсу противірусної терапії можна судити про ймовірність стійкої вірусної відповіді.

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D не призначений для використання в якості скринінгового тесту для виявлення РНК HDV в крові або продуктах крові або як діагностичний тест для підтвердження наявності інфекції HDV.

1.2 Інформація про збудника

Вірус дельта-гепатиту - це патогенний вірус людини, геном РНК і цикл реплікації якого нагадують віруси рослин, але кодуєть один ядерний фосфопротейн - антиген дельта-гепатиту (HDAg), необхідний для реплікації вірусу. Він асоціюється з вірусом Гепатиту В і викликає захворювання лише в поєднанні з цим конкретним вірусом.

Суперінфекція HDV призводить до гострого гепатиту та спричиняє прогресування до цирозу печінки у значної частини носіїв HBsAg. Таким чином, лікування інфекції HBV та імунізація проти HBV протидіють інфекції HDV.



ЗВЕРНІТЬСЯ ДО ІНСТРУКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯ

Перед використанням необхідно уважно ознайомитися з цим вкладишем в упаковці. Наведені інструкції необхідно відповідним чином виконувати. Достовірність результатів не може бути гарантована, якщо є будь-які відхилення від вказівок у цій інструкції.

1.3 Технічна підтримка

Якщо у вас виникли запитання чи проблеми щодо будь-яких аспектів Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D, будь ласка, не соромтеся звертатися до нашої служби технічної підтримки, яка складається з експертів з багаторічним досвідом у сфері молекулярної діагностики. Для технічної підтримки зв'яжіться з нами на сайті виробника, який вказаний на обкладинці інструкції з використання.

1.4 Символи та аббревіатури

Для довідки та орієнтації в інструкції використано наступні попереджувальні та інформаційні символи, а також показану методологію:

Символ	Інформація
	КАТ. № Каталоговий номер
	Вміст Містить достатню кількість реагентів для <N> тестів
	Умови зберігання
	Зверніться до інструкції з використання Цієї інформації необхідно дотримуватися, щоб уникнути неправильного використання набору та компонентів набору
	Використати до
	Номер лоту Номер лоту набору чи компоненту
	Символ IVD Цей набір є медичним приладом для діагностики <i>in vitro</i>
	Виробник
	Тільки для одноразового використання
	Примітка/Увага Дотримуйтесь зазначених таким чином приміток, щоб забезпечити правильну роботу пристрою та уникнути помилок при експлуатації для отримання правильних результатів.

В інструкції використовуються наступні аббревіатури:

Ct	Порогове значення циклу
CV	Коефіцієнт варіації
dNTP	2'-дезоксинуклеотид 5'-трифосфат
HBV	Вірус гепатиту В
HDAg	Антиген гепатиту Дельта
HDV	Вірус гепатиту D
IC	Внутрішній контроль
IFU	Інструкція з використання
IU	Міжнародні одиниці
LPW	Низькопрофільні стрипи 0.1 мл (ml) (білі)
NTC	Нешаблонний контроль
PEI	Інститут Пауля-Ерліха, Ланген, Німеччина
RG	Прилади Rotor-Gene
SD	Стандартне відхилення
WHO	Всесвітня організація охорони здоров'я

2 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

ПРИМІТКА

Заради безпеки та безперебійної роботи пристрою, уважно прочитайте цей розділ.

Дотримуйтесь усіх інструкцій з безпеки, пояснених в інструкції з використання, а також усіх повідомлень та інформації, які відображаються.

Зразки плазми та сироватки людини слід розглядати як потенційно інфекційні. Тому, завжди носіть лабораторний халат і рукавички.

Завжди використовуйте чисте обладнання без нуклеаз.

Налаштування підготовки матриці, збірка ПЛР-реагентів, ампліфікація та визначення повинні проводитися в різних приміщеннях.

Утилізуйте відходи від зразків та аналізів відповідно до ваших внутрішніх правил безпеки.

УВАГА

Не їжте і не пийте компоненти набору!

У лабораторних умовах з набором повинен працювати тільки навчений персонал!

3 ОПИС ТА ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

3.1 Принцип аналізу TaqMan®

TaqMan® ПЛР у реальному часі - це високочутливий аналіз, який поєднує ампліфікацію з онлайн-виявленням нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес (ціль, матриця), на основі флуоресценції. Аналіз заснований на традиційному наборі цільових і специфічних для внутрішнього контролю праймерів у поєднанні з флуоресцентно-міченими пробами олігонуклеотидів, що є комплементарними для бажаних цільових послідовностей. У присутності цілей проба гібридується зі своїми ціль-комплементарними послідовностями. ДНК-полімераза Taq від ферменту ПЛР в реальному часі має екзонуклеазну активність 5' → 3', яка гідролізує пробу і витісняє флуоресцентний барвник із гасника. Таке явище призводить до збільшення сигналу флуоресценції, що прямо пропорційно ампліфікації мішені під час кожного циклу ПЛР.

3.2 Пояснення кількісного аналізу для визначення РНК вірусу гепатиту D

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D - це ампліфікаційний аналіз для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D у зразках плазми та сироватки людини. Аналіз дозволяє виявити всі 8 відомих генотипів HDV, застосовуючи праймери та проби, специфічні для підслідовності антигену дельта-гепатиту (HDAg). Кількісне визначення зразків виконується паралельною ампліфікацією включеної кількісної стандартної смужки.

Синтетичний внутрішній контроль включено для контролю всієї процедури від екстракції РНК до ПЛР у реальному часі. Таким чином, ризик хибнонегативних результатів різко знижується, що призводить до підвищення коректності діагностики. Ампліфікацію РНК HDV у зразках і стандартах, а також РНК IC вимірюють незалежно, на різних довжинах хвилі, завдяки пробам, міченим барвниками різних флуоресцентних репортерів (РНК HDV: FAM, РНК IC: Yakima Yellow).

Підготовку зразків вручну слід проводити за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA. Екстракція РНК повинна виконуватися відповідно до інструкцій виробника з використанням «Протоколу 3: Виділення вірусної РНК/ДНК із 400 мкл (μl) сироватки/плазми за допомогою IC спайк-пробірки (модифікований)».

3.3 Обмеження

Усі реагенти можна використовувати виключно для діагностики *in vitro*. Цей тест валідований для використання разом з людською плазмою або сироваткою. Плазма або сироватка з гепарином повинні бути виключені з аналізу (див. розділ щодо надійності аналізу). Якщо використовуються зразки, відмінні від рекомендованих, можна отримати неправильні результати. Продукт повинен використовуватися лише персоналом, який пройшов спеціальний інструктаж і навчений процедурам діагностики *in vitro* (DIN EN ISO 18113). Для отримання оптимальних результатів ПЛР необхідне суворе дотримання інструкції із застосування. Продукт можна використовувати лише із зазначеними приладами ПЛР у реальному часі. Не використовуйте прострочені компоненти та не змішуйте з компонентами з різних партій.

4 ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D був валідований відповідно до загальних технічних специфікацій (CTS) для медичних пристроїв для діагностики *in vitro* (2002/364/EC) [5].

4.1 Аналітична чутливість

Аналітичну чутливість набору визначали шляхом аналізу розведень 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для РНК HDV, генотип 1 (№ 7657/12, наданий PEI). Використовуючи Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA (початковий об'єм зразка 400 мкл (μl) плазми), були виявлені такі аналітичні чутливості (див. Таблицю 1).

Таблиця 1: Межа виявлення (LOD) з використанням різних приладів

Пристрій	Межа виявлення (LOD) (МО/мл (IU/ml))
7500 Fast	6
Rotor-Gene™ 3000	8
LightCycler® 480	14

Межа виявлення означає, що зі статистичної точки зору принаймні 95% зразків, які містять цю концентрацію HDV, правильно визначаються з вірогідною помилкою 5%. Індивідуальні значення нижче межі виявлення можуть бути правдоподібними, але з високою ймовірністю помилки. Щоб зменшити цю ймовірність помилки, рекомендується 3 повтори таких зразків.

Прогнозовані ймовірності для прос
з Довірчими Інтервалами 95%

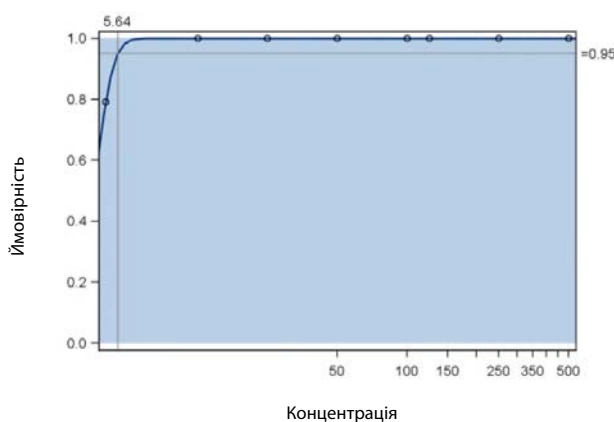


Рисунок 1: Аналітична чутливість Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D залежить від використовуваного приладу для ПЛР у реальному часі та набору для очищення. Як приклад показано Probit-аналіз на 7500 Fast. Концентрації наведені в МО/мл (IU/ml)

4.2 Лінійний діапазон

Лінійний діапазон Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D був визначений шляхом аналізу серії розведень стандарту кількісної оцінки синтетичного HDV в діапазоні від 5 до 1×10^9 копій синтетичного HDV на цикл. Кожне розведення було протестовано в дублях на Rotor-Gene™ 3000, 7500 Fast і LightCycler® 480 (n=10 для кожної концентрації). Для тестування клінічних зразків доступ до добре охарактеризованих зразків із високим вірусним навантаженням був обмежений. Таким чином, серії розведень зразка пацієнта з позитивним результатом тесту на РНК HDV були протестовані в повторях на Rotor-Gene™ 3000, 7500 Fast і LightCycler® 480 (n=12 для кожної концентрації).

Лінійність аналізу становила > 8 log, як визначено з використанням результатів стандарту синтетичного HDV шляхом лінійної регресії \log_{10} , розрахованого з номінальними концентраціями \log_{10} для всіх використаних приладів ПЛР у режимі реального часу (див. приклад для 7500 Fast на Рисунок 2a). Крім того, лінійний діапазон був визначений з використанням нативного матеріалу пацієнта між 10^1 і 10^6 МО/мл (IU/ml), що в результаті дало порівнянні параметри стандартної кривої та лінійності (див. Рисунок 2b).

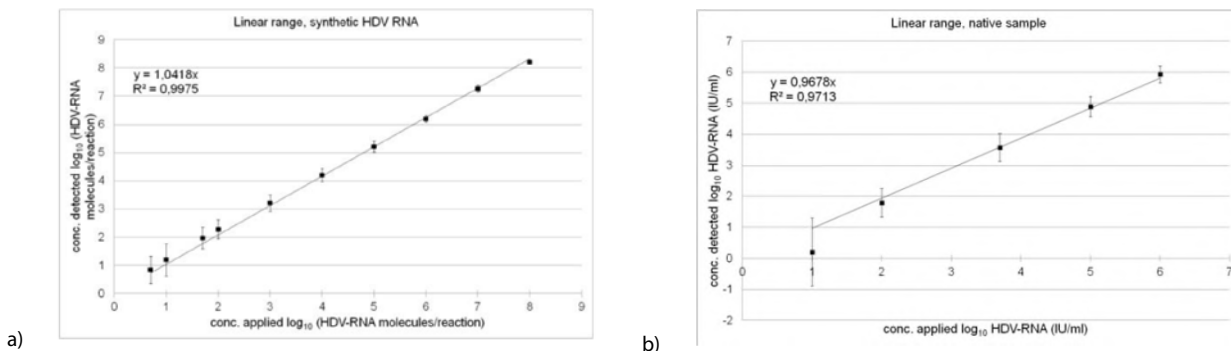


Рисунок 2: Лінійність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D на 7500 Fast з використанням стандарту кількісного визначення синтетичного HDV (a) і матеріалу нативного зразка, позитивного на РНК HDV (b).

4.3 Специфічність

Виявлення генотипу HDV та кількісна оцінка

Продуктивність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D щодо виявлення та кількісного визначення генотипу HDV була оцінена у Французькій національній референс-лабораторії для HBV, HCV та HDV (доктор Еммануель Гордьєн, Бобіньї, Франція) та у Фонді тропічної медицини (FMT-HVD, доктор Ворней Брага, Манаус, Бразилія).

Проаналізовані зразки охоплювали всі відомі генотипи: HDV-1, -2 та 4-8 (FNRL, по 1 зразку кожного) та HDV-3 (FMT-HVD, 2 зразки) відповідно. Зразки обробляли та кількісно визначали, використовуючи 400 мкл (μl) матеріалу зразка.

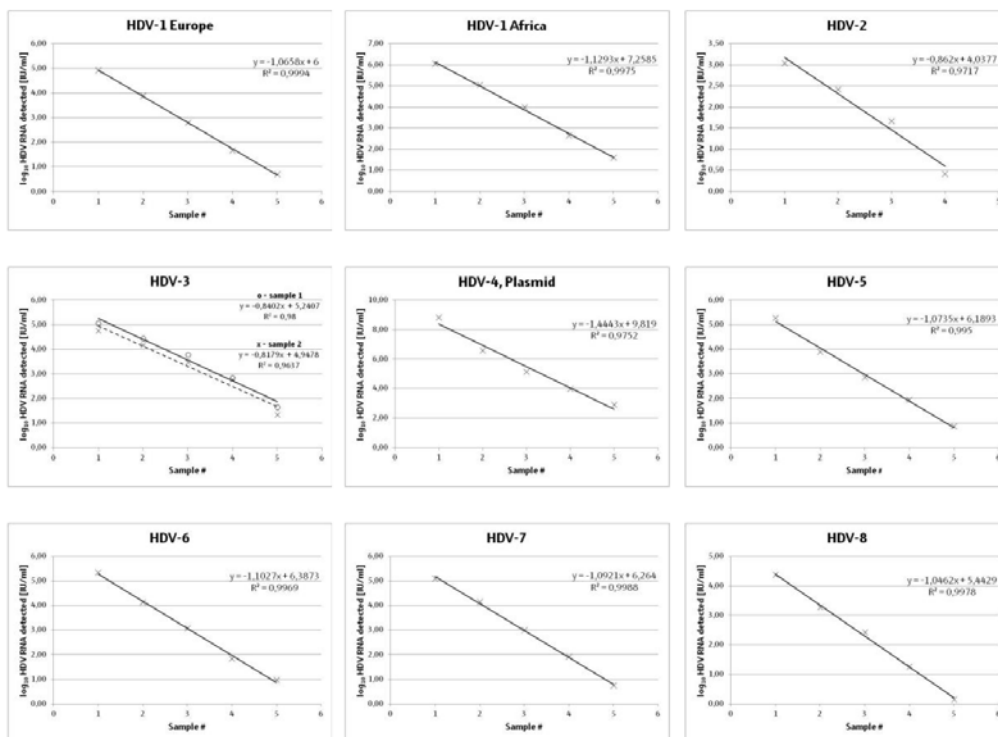


Рисунок 3: Виявлення генотипу та кількісне визначення розведень генотипу HDV за допомогою Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D з приладом 7500 Fast. Зразок №1 представляє собою оригінальні зразки. Усі інші представляють логарифмічні розведення того самого зразка, за винятком HDV-3. Тут оцінювали лише половинні логарифмічні розведення. Будь ласка, зверніть увагу, що ефективність HDV-4 була визначена за допомогою плазмідної конструкції через відсутність позитивних зразків HDV-4.

Усі проаналізовані генотипи HDV були виявлені правильно. Зразки кількісно визначали лінійно, аж до межі виявлення (6 МО/мл (IU/ml) = 0.8 log₁₀). Таким чином, Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D був набагато чутливішим у порівнянні з внутрішнім аналізом FNRL (дані не показано).

Діагностична та аналітична специфічність

Згідно з науковим визначенням, реплікація HDV суворо залежить від присутності HBV, тобто HBV-негативні зразки також є HDV-негативними. Таким чином, зразки плазми з негативним результатом тесту на HBV за допомогою Набору Cobas® TaqMan® HBV були проаналізовані для визначення діагностичної специфічності Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D, яка виражається як негативний результат за відсутності мішені. (див. Таблицю 2).

Таблиця 2: Діагностична специфічність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D

Аналізовані зразки	Позитивний РНК HDV	Позитивний РНК IC
HDV негативна плазма (n = 100)	0	100

Аналітичну специфічність оцінювали шляхом аналізу 20 зразків, не позитивних на HDV. У цих зразках не повинно бути виявлено жодного сигналу РНК HDV (FAM) (див. Таблицю 3).

Таблиця 3: Зразки патогенів, використані для аналізу аналітичної специфічності

Контрольна група	Позитивний РНК HDV (FAM)	РНК IC (VIC/JOE)
Вірус Гепатиту В (HBV), n = 10	0/10	10/10
Вірус Гепатиту С (HCV), n = 10	0/10	10/10

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D мав ідеальну аналітичну та діагностичну специфічність. Жоден з проаналізованих зразків не дав позитивних результатів тесту на РНК HDV.

4.4 Точність

Дані точності представляють повну процедуру тестування, тобто зразки плазми, очищені за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA і визначені кількісно на РНК HDV за допомогою Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D. Серію розведень, що складаються з 3 різних рівнів вірусного навантаження, а саме, низького (25 МО/мл (IU/ml)), середнього (2.5 x 10³ МО/мл (IU/ml)) і високого (2.5 x 10⁵ МО/мл (IU/ml)), було проаналізовано.

Таблиця 4: Варіабельність в межах аналізу Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D

Фактор	РНК HDV	Стандартне відхилення в log	% CV	В межах інтервалу приймання*
Різні експерименти	високий	4.66	19.1	так
	середній	2.69	22.2	так
	низький	0.69	20.6	так
Різні дні виконання аналізу	високий	4.72	18.3	так
	середній	2.60	13.5	так
	низький	1.11	35.3	так
Різні лоти	високий	4.48	7.5	так
	середній	2.70	11.2	так
	низький	1.18	27.0	так
Різні лабораторії	високий	4.85	30.8	так
	середній	2.56	14.3	так
	низький	0.92	37.8	так
Різні лоти різних лабораторій	високий	4.90	33.5	так
	середній	2.94	28.6	так
	низький	0.59	14.3	так
Різні дні виконання аналізу в різних лабораторіях	високий	4.75	24.3	так
	середній	3.09	39.0	так
	низький	1.19	48.8	так

*визначається як +/- 0.5 log заданої точки

ПРИМІТКА

% CV варіабельності в аналізі в дуже низьких концентраціях вірусного навантаження (близьких до межі виявлення), які зазвичай очікують наприкінці противірусної терапії, може бути неприйнятно високим. У разі сумнівних результатів порівняйте відповідний результат кількісного визначення з попередніми результатами та повторіть аналіз.

4.5 Надійність

Надійність виражає загальну частоту відмов Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D і була перевірена для повної процедури тестування з використанням Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA. Референсну плазму, розведену до 3-кратної концентрації вірусу від 95% граничного значення тесту, було проаналізовано на 7500 Fast, Rotor-Gene® 3000 та LightCycler® 480 (Таблиця 5).

Таблиця 5: Надійність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D

	Репліки	(+) Результати	Частота невдач
7500 Fast			0%
HDV (FAM)	122	122	
IC-PHK (VIC)	122	122	
Rotor-Gene®3000			0%
HDV (FAM)	72	72	
IC-PHK (JOE)	72	72	
LightCycler®480			0%
HDV (FAM)	72	72	
IC-PHK (VIC)	72	72	

Ампліфікацію РНК HDV за допомогою Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D не можна було зменшити додаванням ЕДТА, цитрату, білірубину та гемоглобіну.

Результати кількісного визначення ліпемічних зразків можуть бути дещо зниженими: дані перевірки показують можливий вплив ліпідів на реакцію ампліфікації. Таким чином, слід ретельно інтерпретувати результати, отримані від зразків ліпемічної плазми або сироватки. Гепаринізовану плазму або сироватку необхідно виключити з аналізу через її інгібуючу дію на активність полімераз Taq.

4.6 Діагностична оцінка

Діагностичну чутливість і лінійність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D було проаналізовано за допомогою 109 РНК HDV позитивних зразків пацієнтів. Кількісні дані порівнювали з результатами, отриманими в «MVZ Volkmann und Kollegen» (Карлсруе, Німеччина) із застосуванням сертифікованого внутрішнього аналізу. Аналіз лінійної регресії показав, що результати знаходяться в лінійному діапазоні та демонструють високий ступінь кореляції (Рисунок 4).

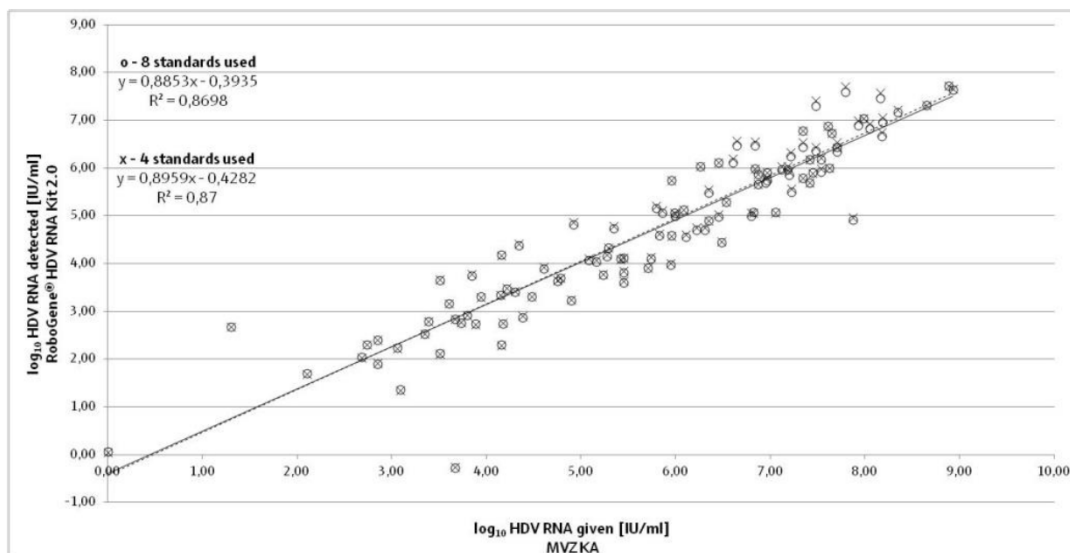


Рисунок 4: Діагностична оцінка: порівняння Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D (очищення зразка за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA) із сертифікованим внутрішнім аналізом (MVZ KA). Кореляція кількісних результатів обох тестів (n=109) з використанням 4 та 8 стандартів кількісної оцінки (порівняння нової та старої версії набору) з набору RoboGene, відповідно, аналізувалася за допомогою лінійної регресії. Нова версія набору (4 стандарти) є потужною для отримання порівнянних результатів кількісного визначення. Рівняння відповідних ліній регресії включені в рисунок.

Розглядаючи метод внутрішньої неточності, а також мінливість окремих точок даних (регресійний аналіз Демінга), не було виявлено значних статистичних відмінностей між обома методами (дані не показані).

5 КОМПОНЕНТИ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ НАБОРУ

Кожен набір містить дві невеликі внутрішні коробки (1 і 2) і дві невеликі сумки для зберігання наступних компонентів:







- коробка 1 для Ферментної суміші FS для ПЛР в реальному часі (RT PCR),
- коробка 2 для Внутрішнього контролю (IC) РНК, Суміші реагентів Вірус гепатиту D/Внутрішній контроль HDV/IC RM та РНК H₂O для ПЛР,
- сумки для Стандартів Вірус гепатиту D/Внутрішній контроль HDV/IC STD 1-4 та стрипів/пробірок РНК.

ПРИМІТКА



Ферментна суміш FS для ПЛР у реальному часі (RT PCR) має бути повторно упакована в коробку 1 після прибуття.

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D доступний у 2 пакуваннях, зведених у таблицях 6-8.



Таблиця 6: Версії набору та загальні компоненти

	 32	 96
Кат. №: низькопрофільні стрипи 0.1 мл (мл) (білі)	LUA-PCR.HDV-LPB.32	LUA-PCR.HDV-LPB.96
Кат. №: пробірки звичайного профілю 0.2 мл (мл) (прозорі)	LUA-PCR.HDV-RG.32	LUA-PCR.HDV-RG.96
РНК IC¹ 	IC спайк-пробірка для 1 x 0.50 мл (мл) робочого розчину	IC спайк-пробірка для 2 x 0.50 мл (мл) робочого розчину
HDV/IC RM² 	Суміш реагентів для 1 x 0.05 мл (мл) робочого розчину	Суміш реагентів для 2 x 0.05 мл (мл) робочого розчину
H₂O для ПЛР³ 	1 x 1.5 мл (мл)	2 x 1.5 мл (мл)
Ферментна суміш FS для ПЛР у реальному часі (RT PCR)⁴ 	1 x 0.235 мл (мл)	1 x 0.660 мл (мл)
IFU	1	1

Таблиця 7: Компоненти набору для застосування на LightCycler® 480 і 7500 Fast з використанням низькопрофільних стрипів 0.1 мл (мл) (білі)

Компонент	 32	 96	Опис
Стрипи LPW HDV для зразка	4 стрипи (4 x 8 пробірок)	12 стрипів (12 x 8 пробірок)	Стрипи для зразка, покриті підсилювачем ампліфікації
Вірус гепатиту D/Внутрішній контроль Стандарти 1-4 LPW (Низькопрофільні стрипи, білі)	4 стрипи (4 x 4 пробірки)	4 стрипи (4 x 4 пробірки)	Стандарт кількісного визначення, покритий РНК HDV, РНК IC та підсилювачем ампліфікації
HDV/IC STD 1-4 LPW			
Оптична стрічка	1	2	Оптична стрічка

Таблиця 8: Компоненти набору для застосування на Rotor-Gene™ 3000/6000/Q за допомогою стандартних профільних пробірок 0.2 мл (мл) (прозорі)

Компонент	 32	 96	Опис
HDV Пробірки RG для зразка	28 пробірок	92 пробірки	Пробірки для зразків, покриті підсилювачем ампліфікації
Вірус гепатиту D/Внутрішній контроль Стандарти 1-4 RG (Rotor-Gene)	4 стрипи (4 x 4 пробірки)	4 стрипи (4 x 4 пробірки)	Стандарт кількісного визначення, покритий РНК HDV, РНК IC та підсилювачем ампліфікації
HDV/IC STD 1-4 RG			

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ



Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D постачається при кімнатній температурі, за винятком **Ферментної Суміші FS для ПЛР у реальному часі**, яка постачається на сухому льоду. Після прибуття зберігайте Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D, включаючи **Ферментну Суміш FS для ПЛР у реальному часі**, при температурі від -40 °C (°C) до -15 °C (°C) в темряві. Набір стабільний до закінчення терміну придатності при зберіганні в цих умовах.

ВАЖЛИВО

¹Відповідну кількість **IC РНК** слід розчинити в **РНК Н₂O для ПЛР** незадовго перед використанням. Залишок розчиненого **IC РНК** можна правильно розподілити на аліквоти та зберігати при -20 °C (°C). Збережені аліквоти можна використовувати до 60 днів. Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів.

²Відповідну кількість **HDV/IC RM** слід розчинити в **РНК Н₂O для ПЛР** незадовго перед використанням. Залишок розчиненого **HDV/IC RM** можна зберігати при 2-8 °C (°C) до 60 днів. Завжди оберігайте від світла!

³Можливе повторне заморожування та розморожування **РНК Н₂O для ПЛР**.

⁴**Ферментну Суміш FS для ПЛР у реальному часі** загалом слід зберігати при -20 °C (°C). Повторне заморожування та розморожування до десяти разів не має негативного впливу на роботу ферменту. Тим не менш, **Ферментну Суміш FS для ПЛР у реальному часі** слід завжди зберігати на крижаній підставці під час використання.



ЛИШЕ ДЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ВИКОРИСТАННЯ!

Цей набір призначений тільки для одноразового використання!

6 НЕОБХІДНЕ ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ДОДАТКИ

- HDV-позитивна контрольна плазма (наприклад, Міжнародний стандарт BOO3 для РНК вірусу гепатиту D для тесту NAT [PEI код № 7657/12]). Надані стандарти кількісної оцінки HDV/IC STD 1-4 LPW/HDV/IC STD 1-4 RG можуть розглядатися як позитивний контроль
- HDV-негативний контроль (наприклад, людська плазма або сироватка без РНК HDV)
- 7500 Fast (Applied Biosystems), LightCycler® 480 (Roche) або Rotor-Gene™ 3000/6000/Q (Corbett Research/Qiagen)
- Спеціальне програмне забезпечення в режимі реального часу для аналізу даних та звітності
- Відповідні інструменти для піпетування та стерильні аерозоль-бар'єрні наконечники для піпеток
- Мікроцентрифуга
- Центрифуга для планшетів
- Термоміксер
- Вортексний міксер
- 1.5 мл (ml) пробірки
- 2.0 мл (ml) пробірки
- Аплікатор для Оптичної стрічки, з використанням версії набору «низькопрофільні стріпи 0.1 мл (ml) (білі)»
- Прецизійний тримач планшетів для смужок для пробірок (для застосування в системі 7500 Fast Real Time PCR System)
- Пластина-адаптер для смужок для пробірок (для застосування на LightCycler® 480)
- Рукавички, лабораторний халат

7 ПРОЦЕДУРА

7.1 Збір та обробка клінічних зразків

- Зібрати 5-10 мл (ml) крові за допомогою стандартних пробірок для забору зразків.
- Бажано використовувати антикоагулянт EDTA (червоний ковпачок, Sarstedt або еквівалентний виробник); гепарин не застосовується через його пригнічувальну дію на ПЛР.
- Цільну кров зберігати при 2-25 °C (°C) не більше 6 годин, центрифугувати 20 хвилин при 800-1600 g, щоб відокремити плазму або сироватку від клітин крові та перенести в стерильні пробірки (наприклад, Eppendorf).
- Зразки плазми або сироватки можна транспортувати при кімнатній температурі, не перевищуючи 6 годин після забору крові.
- Зразки плазми або сироватки можна зберігати в глибокій заморозці протягом кількох місяців при температурі від -70 °C (°C) до -20 °C (°C) залежно від температури зберігання. Уникайте повторного заморожування та розморожування!

7.2 Очищення РНК HDV від клінічних зразків

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D був перевірений за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA (Кат. №: LUA-PCR.EXTR.50 для 50 реакцій; LUA-PCR.EXTR.250 для 250 реакцій). Виконайте етапи очищення РНК HDV відповідно до конкретних інструкцій з використання, використовуючи «Протокол 3: Виділення вірусної РНК/ДНК із 400 мкл (µl) сироватки/плазми за допомогою ІС спайк-пробірки (модифікований)».

ПРИМІТКА

Температура лізису 70 °C (°C), зазначена в протоколі ізоляції, є вирішальною для оптимальної екстракції РНК HDV. Переконайтеся, що температуру вашого термозмішувача відкалібровано належним чином і встановлено правильний адаптер для пробірки для лізису. Ми рекомендуємо використовувати пробірки об'ємом 2.0 мл (ml) (не входять до набору).

7.3 Внутрішній контроль РНК

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D містить ІС Спайк-пробірку **РНК**, стабільно покриту РНК внутрішнього контролю та носієм нуклеїнової кислоти.

Використання **ІС РНК** разом із Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA завжди дозволяє контролювати всю процедуру та виявляти хибнонегативні результати через невдалу екстракцію або надлишок інгібіторів у зразку. Щоб судити про очищення, значення **Ст ІС РНК**, очищеного разом із негативною плазмою РНК HDV, має бути в діапазонах, що стосуються інструменту, зведених у Таблиці 16.

7.4 Загальна процедура кількісного аналізу

Стандарти для кількісного визначення постачаються у вигляді готових до використання стандартних смужок, які стабільно вкриті визначеною кількістю стандартної РНК HDV. Стандарти відкалібровано за першим референсним матеріалом ВООЗ РНК HDV, отриманим від Німецького федерального агентства сироваток і вакцин (PEI). Стандартні значення наведені в МО/мл (IU/ml), тобто концентрація РНК HDV в аналізованому зразку може бути безпосередньо розрахована за референсною кривою без необхідності подальшого перетворення за рівнянням.

ПРИМІТКА

Зверніть увагу, що стандартні значення залежать від набору для очищення РНК, який використовується разом із Набором для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D, а також від витратних матеріалів, необхідних для відповідної платформи ПЛР у реальному часі. Результати кількісного визначення дійсні лише тоді, коли Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA використовується в поєднанні з одним із зазначених пристроїв для ПЛР у реальному часі та витратними матеріалами для конкретного пристрою.

8 ПРОТОКОЛ

8.1 Підготовка внутрішнього контролю

ПРИМІТКА

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D оцінювали разом з Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA для екстракції нуклеїнових кислот. Внутрішній контроль надається у вигляді **ІС Спайк-пробірки РНК** в Наборі для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D. Підготуйте пробірку **ІС РНК** відповідно до наведених нижче інструкцій та екстрагуйте РНК, дотримуючись інструкцій до Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA.

1. Коротко центрифугуйте **ІС Спайк-пробірку РНК** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізований **ІС РНК** на дні пробірки. Додайте у флакон 520 мкл (µl) **РНК Н₂О для ПЛР**; закрийте пробірку, перемішайте на вортексі, а потім центрифугуйте на повній швидкості.
2. Інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 5 хвилин, використовуючи термальний змішувач (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте шляхом короткочасного перемішування на вортексі, а потім центрифугуйте на повній швидкості.
3. Додайте 10 мкл (µl) ресуспендованого **ІС РНК** на реакцію екстракції до Лізуючого розчину відповідного Набору Для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA, перемішайте шляхом короткочасного перемішування на вортексі.
4. Дотримуйтесь інструкцій набору для екстракції «Протокол 3: Виділення вірусної РНК/ДНК з 400 мкл (µl) сироватки/плазми за допомогою очищення **ІС Спайк-пробірки РНК** (модифікований)». Зверніть увагу на коректність температури лізису (70 °C (°C)).

8.2 Приготування 25x Суміші реагентів

1. Коротко центрифугуйте **HDV/IC RM** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізовану суміш реагентів на дні пробірки.
2. Додайте 53 мкл (µl) **РНК Н₂О для ПЛР** до **HDV/IC RM**; закрийте пробірку, перемішайте шляхом короткого перемішування, а потім центрифугуйте на повній швидкості.
3. Інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 20 хв, використовуючи термозмішувач (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте шляхом короткого перемішування, а потім центрифугуйте на повній швидкості.

8.3 Приготування 1x Майстер-міксу

1. Перед налаштуванням Майстер-міксу кілька разів обережно інвертуйте **Ферментну суміш FS для ПЛР у реальному часі** і коротко центрифугуйте.
2. Приготуйте 1x Майстер-мікс відповідно до наведеної нижче таблиці. Перемішайте на вортексі протягом щонайменше 10 секунд, а потім центрифугуйте.

Таблиця 9: Склад 1x Майстер-мікс на реакцію

Реагент	Об'єм для 1x гхп (мкл (μl))	Кінцева концентрація
PHK H₂O для ПЛР	12.75	-
HDV/IC RM	1	1x
Суміш реагентів, 25x		
Ферментна суміш FS для ПЛР у реальному часі	6.25	1x
Загальна кількість	20	

3. Помістіть **Стрипи для зразка HDV LPW** або **Пробірки для зразка HDV RG** і стандарт для кількісного визначення **HDV/IC STD 1-4 LPW** або **HDV/IC STD 1-4 RG** на відповідну охолоджену стійку.
4. Додайте 20 мкл (μl) 1x Майстер-міксу в пробірки для зразків та кожну пробірку зі стандартом кількісного визначення **HDV/IC STD 1-4**.
5. Додайте 5 мкл (μl) **PHK H₂O для ПЛР** в лунки, які служать як NTC, і до всіх стандартів кількісного визначення, що містять 1x Майстер-мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl).
6. Додайте 5 мкл (μl) елюату від виділення РНК (Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA) до відповідних лунок для зразків, що містять 1x Майстер-мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl).
7. Накрийте витратні матеріали для ПЛР у реальному часі. Переконайтеся, що Майстер-мікс і елюат змішані належним чином. Центрифугуйте стрипи ПЛР LPW протягом 1 хвилини при 1000 об/хв (rpm), щоб зібрати суміш ПЛР на дні кожної лунки (необов'язково для пробірок Rotor-Gene).
8. Запрограмуйте застосовані платформи ПЛР у реальному часі, як зазначено в таблицях 10-12 нижче, і запустіть програму.

Таблиця 10: Програма ПЛР для LightCycler®480

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	55 °C (°C)	15 хвилини	3.5 °C (°C)/сек
2	1	Активация Taq	95 °C (°C)	2 хвилини	3.5 °C (°C)/сек
3	45	Денатурація	95 °C (°C)	15 секунд	3.5 °C (°C)/сек
		Нормалізація/Продовження*	60 °C (°C)	1 хвилина	2.2 °C (°C)/сек
4	1	Охолодження	40 °C (°C)	30 секунд	2.2 °C (°C)/сек

*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; VIC)

Таблиця 11: Програма ПЛР для 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	55 °C (°C)	15 хвилин	Максимальний
2	1	Активация Taq	95 °C (°C)	2 хвилини	Максимальний
3	45	Денатурація	95 °C (°C)	15 секунд	Максимальний
		Нормалізація/Продовження*	60 °C (°C)	1 хвилина	Максимальний

*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; VIC/JOE)

Таблиця 12: Програма ПЛР для Rotor-Gene® 6000/Q

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	55 °C (°C)	15 хвилин	Максимальний
2	1	Активация Taq	95 °C (°C)	2 хвилини	Максимальний
3	45	Денатурація	95 °C (°C)	15 секунд	Максимальний
		Нормалізація/Продовження*	60 °C (°C)	1.5 хвилини	Максимальний

*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; JOE)

9 АНАЛІЗ ДАНИХ

Кожна ампліфікація РНК пов'язана з генерацією сигналу флуоресценції, що вимірюється в каналі FAM (для РНК HDV) і в каналі VIC/JOE або (для РНК IC), що призводить до сигмоподібної кривої росту (логарифмічної шкали). Аналіз даних виконується згідно з інструкціями виробника для приладу для ПЛР у реальному часі за допомогою відповідного програмного забезпечення. Перевірте отримані дані, щоб переконатися, що запуск дійсний, і інтерпретуйте результати (Таблиця 13).

Таблиця 13: Інтерпретація результатів

Канал FAM	Канал VIC/JOE	Інтерпретація
Інтерпретація результатів виявлення		
x	x	Дійсний, виявлення РНК HDV зразка
x	-	Недійсний, повторити зразок
-	x	Дійсний, тільки виявлення РНК IC, РНК HDV не виявляється/HDV негативний зразок
-	-	Недійсний, немає ампліфікації/виявлення взагалі, повторити зразок
Інтерпретація результатів кількісної оцінки		
< LOD	x	Нижче нижньої межі виявлення аналізу (наприклад, 6 МО/мл (IU/ml) для 7500 Fast). Для підтвердження позитивного результату рекомендується три повторення аналізу.
x (> 4x10 ⁹ МО/мл (IU/ml))	x	Вище верхньої межі охопленого лінійного діапазону аналізу (4 x 10 ⁹ МО/мл (IU/ml)). Рекомендується розбавити вихідний зразок.

Концентрацію РНК HDV у клінічних зразках визначають на основі стандартної кривої, отриманої в результаті аналізу стандартного стрипа кількісного визначення та Ct значень відповідних зразків. Концентрація РНК HDV виражається в МО/мл (IU/ml). У таблицях 14 та 15 наведено концентрації стандартів кількісної оцінки РНК HDV у разі використання Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA. У таблицях 17 і 18 наведено очікувані значення Ct стандартів на відповідних платформах ПЛР у реальному часі.

Таблиця 14: Концентрації стандартів кількісної оцінки РНК HDV (7500 Fast або LightCycler® 480)

HDV/IC STD 1-4	РНК HDV [МО/мл (IU/ml)]
1	20 000 000
2	200 000
3	2 000
4	200

Таблиця 15: Концентрації стандартів кількісної оцінки РНК HDV (Rotor-Gene™ 3000/6000/Q)

HDV/IC STD 1-4	РНК HDV [МО/мл (IU/ml)]
1	40 000 000
2	400 000
3	4 000
4	400

ПРИМІТКА

Встановлення порогу може суттєво вплинути на значення C_t .

Нижче наведені рекомендації щодо встановлення порогових значень.

7500 Fast: FAM: ≥ 0.2 , VIC: ≥ 0.04

- Інші налаштування: автоматичні початкові умови/baseline

Rotor-Gene™ 3000/6000/Q: FAM: ≥ 0.02 , JOE: ≥ 0.012

- Інші налаштування: Динамічна пробірка: Так; Корекція нахилу: Так; Ігнорувати перші: 4; Шаблонний контроль без порогу: 5%

LightCycler® 480:

Канал	Діапазон шуму	Поріг	Точки підгонки
FAM	≥ 1.8	≥ 5.0	~ 2 - 4
VIC	≥ 1.8	≥ 2.5	~ 2 - 4

- Інші налаштування: Тип аналізу: Abs Quant/Точки підгонки, Компенсація кольору (в базі даних) для каналів FAM і VIC

Критеріями для перевірки запуску є нахил і значення R^2 стандартної кривої (див. Таблицю 16). Діапазони очікуваних значень C_t стандартів відносяться до власних валідаційних даних і повинні використовуватися як рекомендації для встановлення порогових значень (див. Таблиці 17 та 18). Якщо нахил та/або R^2 виходять за межі діапазону (Таблиця 16), один із чотирьох стандартів кількісної оцінки може бути виключений (найбільш віддалений від лінії регресії), оскільки трьох кількісних стандартів достатньо для дійсних результатів. У такому випадку не може бути введено жодне право на гарантію на весь продукт.

Таблиця 16: Критерії перевірки запуску

Параметр	7500 Fast, LightCycler® 480, Rotor-Gene® 3000/6000/Q
Діапазони нахилу	-3.10 до -3.60
Коефіцієнт лінійної регресії (R^2) референсної кривої має становити від 0.98 до 1.00 (не застосовується до аналізу LightCycler® 480).	
Очікувані значення C_t для РНК ІС стандартів кількісної оцінки (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)	
VIC/JOE	≤ 39
Очікувані значення C_t для РНК ІС у HDV-негативних та HDV-позитивних зразках пацієнтів (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)	
VIC/JOE	≤ 39

Таблиця 17: Керівні значення C_t стандартів кількісної оцінки на 7500 Fast та LightCycler® 480

HBV/IC STD 1 - 4	Очікуваний приріст між значеннями C_t	7500 Fast		LightCycler® 480	
		середнє	від - до	середнє	від - до
1		13.3	12.2 - 14.4	13.6	11.8 - 15.5
2	1 до 2 + ~ 6.64	20.3	19.1 - 21.6	20.5	18.7 - 22.3
3	2 до 3 + ~ 6.64	27.3	25.9 - 28.6	27.5	25.4 - 29.6
4	3 до 4 + ~ 3.32	30.8	29.0 - 32.6	31.3	29.1 - 33.5

Таблиця 18: Керівні значення Ct стандарту кількісної оцінки на Rotor-Gene™ 3000/6000/Q

HBV/IC STD 1 - 4	Очікуваний приріст між значеннями Ct	Rotor-Gene™ 3000/6000/Q	
		середнє	від - до
1		10.7	9.5 – 11.9
2	1 до 2 + ~ 6.64	17.4	16.0 - 18.8
3	2 до 3 + ~ 6.64	24.4	22.9 - 25.9
4	3 до 4 + ~ 3.32	28.1	26.4 - 29.9

10 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ











Проблема/ймовірна причина	Коментарі та пропозиції
Зовсім немає сигналу	
<ul style="list-style-type: none"> Вимірювання флуоресценції не ввімкнено 	Прочитати посібник користувача пристрою ПЛР у реальному часі.
<ul style="list-style-type: none"> Вибрано помилкові канали 	Вибрати канал FAM для РНК HDV і канал VIC/JOE для РНК IC.
<ul style="list-style-type: none"> Неправильна програма циклу 	Перевірити налаштування приладу, повторити запуск.
<ul style="list-style-type: none"> Неправильне застосування набору 	Почитати інструкцію з використання.
<ul style="list-style-type: none"> Умови зберігання не відповідають інструкції, термін придатності набору для виявлення перевищено 	Перевірити умови зберігання та термін придатності.
Низький сигнал флуоресценції, зафіксований як для цілі, так і для IC, кількість цільових копій знижена	
<ul style="list-style-type: none"> Цільова РНК деградована 	Використовувати витратні матеріали та реагенти без РНКаз, зберігати РНК на льоду. Ознайомитися з інструкцією із застосування набору для екстракції.
<ul style="list-style-type: none"> Забруднені оптичні лінзи (Rotor-Gene) 	Дивитися розділ «Технічне обслуговування» відповідної інструкції для приладу, або очистити лінзи раз на місяць за допомогою абсолютного ізопропанолу та ватних тампонів.
<ul style="list-style-type: none"> Термоблок та/або оптика забруднені (формат 96-лункового блоку) 	Дивитися розділ «Технічне обслуговування» інструкції для приладів, альтернативно заповнити кожну лунку ізопропанолом, інкубувати 10 хвилин при 50 °C (°C), видалити ізопропанол і промити водою.
Відсутній або слабкий сигнал для IC РНК у РНК HDV-негативного зразка	
<ul style="list-style-type: none"> Неправильна програма циклічності 	Перевірити налаштування приладу, повторити запуск.
<ul style="list-style-type: none"> Надлишок інгібіторів у зразку/втрата РНК під час екстракції 	Використовувати рекомендований набір для екстракції та чітко дотримуватися інструкцій виробника.
<ul style="list-style-type: none"> Неправильний матеріал зразка (наприклад, гепаринізована плазма) 	Запит на свіжу ЕДТА- або цитратну плазму або сироватку.
<ul style="list-style-type: none"> Умови зберігання не відповідають інструкції, термін придатності набору для виявлення перевищено 	Перевірити умови зберігання та термін придатності.
Несподівано низькі значення Ct для IC РНК, особливо з високими стандартами або зразками високого вірусного навантаження	
<ul style="list-style-type: none"> Передресна передача сигналів між цільовими та IC каналами запису (особливо VIC/JOE) 	Відкалібруйте прилад за допомогою очищених флуоресцентних барвників.
Несигмоїдні криві зростання стандартів кількісної оцінки, неприпустимо високе відхилення Ct від очікуваних значень	
<ul style="list-style-type: none"> Неправильне зберігання розчиненої суміші реагентів 	Прочитати інструкцію з використання, перевірити умови зберігання, приготувати нову суміш реагентів.
<ul style="list-style-type: none"> Умови зберігання не відповідають інструкції, термін придатності набору для виявлення перевищено 	Перевірити умови зберігання та термін придатності.
Різна поведінка ампліфікації зразка РНК HDV і стандартів, непаралельні криві росту в експоненційній фазі реакції	
<ul style="list-style-type: none"> Надлишок інгібіторів у зразку 	Використовувати рекомендований набір для екстракції, чітко дотримуватися інструкцій виробника; проконсультуватися з лікуючим лікарем щодо лікування пацієнта.
<ul style="list-style-type: none"> Неправильний матеріал зразка 	Використовуйте рекомендований тип зразка.

Записується сигнал FAM для HDV-негативних зразків/NTC

- Забруднення РНК HDV або ампліконами РНК Повторна екстракція та/або ПЛР з новими реагентами; знезаразити інструменти та робоче місце.

Якщо у вас виникли додаткові запитання, будь ласка, зв'яжіться з нашою службою технічної підтримки.

СИМВОЛИ

	Код продукту		Температура зберігання
	Прилад для діагностики <i>in vitro</i>		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
 UA.TR.116	Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером призначеного органу з оцінки відповідності, який був залучений на етапі контролю виробництва		Дата виготовлення

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.

**ВИРОБНИК:**

ТОВ «ЛАБЮЕЙ»

Україна, 76018

м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25

Моб.: +38 (067) 000-20-22

E-mail: info@labua.com.ua

UA.TR.116