



ОДНОЕТАПНИЙ НАБІР

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ D

Кат. №: **LUA-PCR.HDV.25**
Кількість тестів: **25**

Дата випуску інструкції: **11-07-2022**
Версія: **0**

**Одноетапне кількісне визначення РНК HDV (QT)
ПЛР у режимі реального часу для кількісного визначення геному
вірусу Гепатиту D**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Одноетапний набір для **Кількісного визначення HDV** ПЛР у режимі реального часу з кодом **LUA-PCR.HDV.25** призначений для кількісного виявлення РНК вірусу Гепатиту D у зразку людини (плазма, сироватка) з одночасним контролем реакції ампліфікації за допомогою **Внутрішнього Контролю (IC)**.

Аналіз LUA-PCR.HDV.25 стандартизовано відповідно до 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для РНК вірусу гепатиту D (код PEI 7657/12), щоб виразити концентрацію зразків також у міжнародних одиницях (МО/мл (IU/ml)).

Набір адаптований для використання на Термоциклерах для визначення в режимі реального часу ABI 7500 Sequence Detection System® (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems™) і CFX96 RTS (програмний менеджер CFX версії 1.7, Biorad™™™).

*Applied Biosystems є зареєстрованою торговою маркою, а ABI PRISM® є торговою маркою Applied Biosystems Corporation або її дочірніх компаній у США та/або деяких інших країнах.

**Biorad є зареєстрованою торговою маркою.

ТОВ «ЛАБЮЕЙ» не є власником даних зареєстрованих торгових марок.

В. ВСТУП

Вірус дельта гепатиту (HDV) - це дефектний РНК-вірус, який може інфікувати пацієнта лише з гострим або хронічним вірусом гепатиту В. З цієї причини складання та розмноження віріонів залежить від вірусу гепатиту В.

Геном HDV являє собою кільцеву одноланцюгову молекулу РНК розміром близько 1700 bp і має сильну парну основу. Геном кодує два різні рибонуклеопротеїни, які називаються малим дельта-антигеном гепатиту (sHDAg) і великим дельта-антигеном гепатиту (LHDAg). Це виробництво пов'язане з використанням різних кодонів термінації. Дві форми білка мають різні функції: sHDAg необхідний для реплікації HDV, тоді як LHDAg пригнічує реплікацію HDV і необхідний для утворення віріону. HDV-інфекція може спричинити серйозні захворювання печінки, причому фульмінантний гепатит виникає частіше, ніж лише HBV, і з вищою швидкістю хронізації у разі суперінфекції. У багатьох випадках хронічний дельта-гепатит розвивається до цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми.

Діагноз HDV-інфекції зазвичай ґрунтується на виявленні специфічних антитіл анти-HDV і наявності анти-IgM, що відображає реплікацію вірусу. Реплікацію HDV найефективніше оцінюють шляхом виявлення РНК HDV у сироватці крові або печінці за допомогою ПЛР-аналізу в реальному часі. Крім того, ця технологія демонструє великий потенціал для діагностики та моніторингу хронічного гепатиту D.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір LUA-PCR.HDV.25 базується на ПЛР у режимі реального часу, яка використовує спеціальні Праймери та Проби.

РНК HDV, виділена з досліджуваного біологічного зразка на стадії екстракції, ретротранскрипується та ампліфікується за допомогою системи ампліфікації RT-Real Time. Ампліфікований продукт виявляють і кількісно визначають порівняно зі стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для унікальної геномної послідовності HDV.

Внутрішній контроль (IC) служить контролем ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації інгібіторів реакції.

Додається зовнішня стандартна крива, що дозволяє визначити вірусне навантаження.

D. КОМПОНЕНТИ

Стандартний формат продукту з кодом LUA-PCR.HDV.50 містить реагенти для 50 тестів.

Компонент	Вміст	LUA-PCR.HDV.50 50 тестів
A КОД: ALL/ММ-8 Кольорове кодування: блакитний	5xМайстер-мікс	х 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/RB, зазначеним на етикетці флакона)
RB КОД: ALL/RB Кольорове кодування: блакитний	Майстер-мікс Буфер для відновлення	х 2 флакони/0.1 мл (ml)
B КОД: HDVONE/СВ Кольорове кодування: жовтий	Ліофілізовані Праймери/Проби для послідовності кодування рибозиму HDV	х 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
C КОД: ALL/C Кольорове кодування: червоний	MG Вода	х 3 флакони/1.5 мл (ml)
NTC КОД: ALL/NTC Кольорове кодування: білий	Негативний контроль	х 1 флакон/1.5 мл (ml)
STD Стандарт кількісного визначення (5.0x10 ⁴ копій/мкл (μl)) КОД: HDVONE /STD Кольорове кодування: червоний	Ліофілізований стандарт кількісного визначення	х 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
I.C. Внутрішній Контроль КОД: ALL/IC Кольорове кодування: зелений	Ліофілізований Внутрішній контроль	х 1 флакон (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладиш інструкції	Інструкція по застосуванню	1

Важлива примітка: За запитом Лабюей може надати реагенти для 25 та 100 тестів, як зазначено нижче:

Компонент А	х1 флакон	Х4 флакони
Компонент RB	х1 флакон/0.1 мл (ml)	х4 флакони/0.1 мл (ml)
Компонент В	х1 флакон	х4 флакони
Компонент С	х2 флакони/1.5 мл (ml)	х5 флаконів/1.5 мл (ml)
NTC	х1 флакон/1.5 мл (ml)	х1 флакон/1.5 мл (ml)
Компонент STD	х1 флакон	х4 флакони
Компонент IC	х2 флакони	х2 флакони
Інструкція	1	1
Кількість тестів	25	100
Код	LUA-PCR.HDV.25	LUA-PCR.HDV.100

E. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір LUA-PCR.HDV.25 необхідно зберігати при +2...25 °C (°C) не довше 12 місяців. На етикетках чітко вказано термін придатності та температура зберігання кожного компонента.

Після розчинення ліофілізовані компоненти стабільні протягом 1 місяця при -20 °C (°C). Якщо компоненти будуть використовуватися лише час від часу, їх слід заморожувати аліквотами, слід уникати повторного розморожування та заморожування.

Допускається лише два процеси розморожування.

F. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (0.5 мкл (µl) < об'єм < 1000 мкл (µl)).
2. Набір для екстракції РНК.
3. MG EtOH.
4. Термоблок.
5. Мікроцентрифуга.
6. Штативи для пробірок.
7. Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
8. 0.2 мл (ml) мікропробірки, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
9. Одноразові рукавички без тальку.
10. Термоциклер для ПЛР у реальному часі (*).
11. Абсорбуючі паперові серветки.
12. Вортекс або подібні інструменти для змішування.

(* **Увага:** Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

G. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Лабораторне середовище слід контролювати, щоб уникнути таких забруднень, як пил або мікробні агенти, що переносяться повітрям, під час відкриття флаконів набору та Компонентів і під час проведення тесту.
7. Компоненти А і В світлочутливі. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі +2...+25 °C (°C) у приміщенні з контролем температури.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері.
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками крові/плазми людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте позитивні матеріали (зразки, контролю та амплікони) окремо від інших реагентів та використовуйте окреме приміщення для роботи з ними.
17. Розчиніть ліофілізовані реагенти з правильною кількістю, зазначеною на етикетках, води молекулярного класу (компонент С з кодом: ALL/C), що постачається в наборі.
18. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше.
19. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.

20. Використання одноразового пластикового посуду рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.
22. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
23. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

H. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма або сироватка готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Не спостерігалось впливу внаслідок підготовки зразка з цитратом або EDTA.

Увага: Гепарин (≥10 МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР.

Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати зразки пацієнтів із гепарином.

3. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків.
4. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Якщо набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування штрих-кодом і електронне зчитування. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
6. Плазму та сироватку, якщо вони не використовуються негайно, після збору необхідно аліквотувати та зберігати при -20 °C (-80 °C (°C)). Зразки можна зберігати замороженими при температурі -20 °C (-80 °C (°C)) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може вплинути на результат тесту.
7. Зразки плазми для екстракції РНК необхідно відбирати відповідно до звичайних лабораторних процедур, транспортувати та зберігати при +2-8 °C (°C) протягом максимум 4 годин. Зразки плазми можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або при -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду.
8. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 200 мкл (µl) і зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
9. Використовуючи заморожені зразки, розморожуйте зразки безпосередньо перед етапом екстракції, щоб уникнути розпаду нуклеїнової кислоти.
10. Зразки цільної периферичної крові для екстракції РНК необхідно зібрати в EDTA відповідно до лабораторних пристроїв, транспортувати та зберігати при +2 °C (°C)/+8 °C (°C) протягом максимального періоду 3 днів. Не заморожуйте зразки цільної периферичної крові, щоб уникнути лізису клітин і втрати титру вірусу.

I. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Майстер-мікс:

Компонент А. Розчиніть однорідно ліофілізований Компонент А з об'ємом Компонента RB (код: ALL/RB), зазначеним на етикетці флакона.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Буфер для відновлення RB:

Компонент RB. Готовий до використання. Коротко відцентрифугувати, щоб зібрати весь об'єм.

Праймери/Проби:

Компонент В.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

МГ вода:

Компонент С. Готовий до використання.

Негативний Контроль:

NIC. Готовий до використання.

Внутрішній контроль:

I.C.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

Стандартна крива:

Компонент STD.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований STD з відповідним об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.
- Підготуйте 4 безнуклеазних флакони для приготування стандартної кривої.
- Налаштуйте серійне розведення 1:10 у Компоненті С (код: ALL/C), щоб отримати точки стандартної кривої, як описано в таблиці нижче:

Підготовка Стандартної кривої		
STD	Калібратор 50000 копій/мкл (µl)	Додайте об'єм Компонента С (код: ALL/C) зазначений на етикетці флакона
STD 1	5000 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 2	500 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 1) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 3	50 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 2) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)
STD 4	5 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 3) + 90 мкл (µl) Компонента С (код: ALL/C)

L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікропіпетки:** Повинні бути відкалібровані, щоб вносити коректний об'єм, необхідний для аналізу, а також повинно проводитися регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. **Пристрій для екстракції:** Набір LUA-PCR.HDV.25 призначений для використання в комбінації з набором NucleoSpin Virus (Macherey-Nagel) та InnuPREP Virus DNA/RNA (AJ Innuscreen). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробником.

3. **Термоциклери в режимі реального часу:** Набір LUA-PCR.HDV.25 призначений для використання в поєднанні з Термоциклерами реального часу ABI 7500 (програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems) та CFX96 Real-Time System, програмне забезпечення CFX manager версії 1.7 (Biorad™). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки.
3. Увімкніть Термоциклер, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
4. Суворо дотримуйтесь посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
5. Перевірте, чи встановлені мікропіпетки на необхідний об'єм.
6. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
7. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

N.1 Екстракція вірусного РНК

Крок екстракції геномної РНК HDV має проводитися виключно в поєднанні з таким набором:

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Сироватка/Плазма	Набір Nucleospin Virus	740983	Macherey-Nagel
Сироватка/Плазма	Набір InnuPREP Virus DNA/RNA	845-KS-4800nnn	AJ Innuscreen

Виділення РНК необхідно проводити лише згідно з інструкцією виробника (MN™, AnalitikJena).

Важлива примітка: У процедурах екстракції слід суворо використовувати наступні об'єми.

Опис	Об'єм зразка, мкл (µl)	Об'єм елюату, мкл (µl)
Nucleospin Virus	200	100
Набір InnuPREP Virus DNA/RNA	200	100

РНК, екстрагована зі зразка і не використана в аналізі, повинна зберігатися замороженою (-20...-80 °C (°C)).

Важлива примітка: IC набору LUA-PCR.HDV.25 може бути використується в процедурі ізоляції як контроль екстракції. Значення Ст Внутрішнього Контролю використовується для оцінки правильності виконання процедури екстракції (див. розділ Q).

Для цієї програми

- додати **2 мкл (µl) I.C.** до суміші зразка після етапу термічної інкубації (AJ: 70 °C (°C) x 10 хв; MN: RT x 3 хв) і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником набору для екстракції.

N.2 Постановка реакції

Набір **LUA-PCR.HDV.25** призначений для використання виключно в комбінації з ABI 7500 (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems) та CFX96 Real-Time System, програмне забезпечення CFX manager версії 1.7 (Biorad™).

N.2.1 Підготовка ПЛР в режимі реального часу

Важливо: Приклад схеми розподілу наведено в Розділі О. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі І.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Стандартної кривої (підготовленої, як описано в розділі І).

Важлива примітка: Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в двох примірниках.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Однокрокову Суміш** для **Зразків, NTC та стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:

Підготовка Однокрокової суміші (І.С. як Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	5xМайстер-Мікс	4.0 мкл (µl)	48 мкл (µl)
B	Праймери/Проби	2.0 мкл (µl)	24 мкл (µl)
І.С.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (µl)	6 мкл (µl)
C	Вода MG	3.5 мкл (µl)	42 мкл (µl)
Загальний об'єм		10.0 мкл (µl)	120 мкл (µl)

Якщо Внутрішній Контроль було додано під час процедури виділення РНК, підготуйте **Однокрокову Суміш** для **Зразків, NTC і стандартної кривої**, як зазначено в таблиці нижче:

Підготовка Однокрокової суміші (І.С. як Екстракційний та Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	5xМайстер-Мікс	4.0 мкл (µl)	48 мкл (µl)
B	Праймери/Проби	2.0 мкл (µl)	24 мкл (µl)
C	Вода MG	4.0 мкл (µl)	48 мкл (µl)
Загальний об'єм		10.0 мкл (µl)	120 мкл (µl)

- внесіть **10 мкл (µl)** Однокрокової Суміші в кожну реакційну пробірку або лунку мікропланшета
- додайте **10 мкл (µl)** Зразків, NTC і стандартної кривої в реакційні пробірки

Схема підготовки ПЛР-аналізу

Кількість реакцій	1
Однокрокова суміш	10 мкл (µl)
Зразок, NTC, Стандартна крива	10 мкл (µl)
Загальний об'єм	20 мкл (µl)

- щільно закрийте пробірки
- короткочасно відцентруйуйте реакційну пробірку при 2000 об/хв (rpm)
- не залишайте реакційну пробірку при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і на світлі (накрийте пробірки)
- завантажте пробірки Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу
- після операції налаштування, описаної в розділі N3 (Програмування приладу), запустіть цикл термоциклера.

N.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

N.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	49 °C (°C)	30 хвилин
2	1	95°C (°C)	10 хвилин
3	45	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилина

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.

Попередження: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

N.3.2 Вибір Детекторів

Дотримуючись інструкцій з експлуатації Термоциклерів для визначення в режимі реального часу (ABI 7500 та CFX96), виберіть Детектори, зазначені в таблиці нижче:

Виявлення	Репортер	Гасник
HDV	FAM	Не флуоресцентний
Внутрішній Контроль (І.С.)	VIC/JOE	Не флуоресцентний
Пасивний Стандарт (тільки для ABI 7500)	ROX	Не флуоресцентний

Попередження: Зверніть увагу на те, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Термічним Профілем, дотримуючись інструкцій до інструментів, наданих виробником.

О. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

Мікропланшет/Пробірки

	1	2	3		
A	STD 1	Зразок 1			
B	STD 2	Зразок 2			
C	STD 3	Зразок 3			
D	STD 4	Зразок 4			
E	NTC	Зразок 5			
F					
G					
H					

Легенда: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива HDV, Зразок 1-5 = Зразки, що оцінюються.

P. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

P.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати інтерпретацію даних:

- Встановіть **«Baseline/Початкові умови»** (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™ PRISM 7500 SDS	Автоматичні початкові умови
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови

- Встановіть вручну **«Threshold/Попір»** флуоресценції FAM/JOE/VIC.

«Threshold/Попір»	FAM	JOE/VIC
ABI™ PRISM 7500 SDS	0.20	0.08
BIORAD™ CFX96®	300	150

P.2 Аналіз даних

Перевірка на калібраторах STD проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їх значення Ct очікуваним і зазначеним в таблиці нижче.

ABI™PRISM®7500 SDS	
Перевірка	Вимоги
STD 1	18.0 < Ct (Пороговий цикл) < 21.0

BIORAD™ CFX96®	
Перевірка	Вимоги
STD 1	19.0 < Ct (Пороговий цикл) < 22.0

Крім того, значення Нахилу і R² перевіряються, щоб перевірити якість виконання. Повинні бути виконані наступні вимоги.

Перевірка FAM	Вимоги
Нахил	-3.9 < Нахил < -3.1

Перевірка FAM	Вимоги
Ефективність	R ² > 0.98

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція Внутрішнього Контролю JOE/VIC підтверджують виявлення HDV, як описано в таблиці нижче:

HDV FAM	Внутрішній Контроль VIC	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	25 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	ВІРНО*
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	25 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

ВАЖЛИВО:

(*) Висока початкова концентрація сДНК HDV зразка (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.

(**) У цьому випадку проблеми можуть виникнути на етапі ампліфікації (неефективна ампліфікація або її відсутність) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів), що призводить до неправильного результату та хібнонегативних значень. Процедуру тестування необхідно повторити, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

На основі результатів, отриманих для стандартизації LUA-PCR.HDV.25 за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ для РНК вірусу гепатиту D (код PEI 7657/12), можна застосувати правильну кількісну оцінку вірусного навантаження HDV, як зазначено в таблиці нижче:

Набір NucleoSpin Virus	
ABI™PRISM® 7500 SDS - BIORAD™ CFX96®	
Вірусне навантаження HDV (МО/мл (IU/ml))	
Кількість > 1.0E+05	HDV POS > ULOQ
2.5E+02 ≤ Кількість ≤ 1.0E+05	КІЛЬКІСНА ОЦІНКА (МО/мл (IU/ml))
Кількість < 2.5E+02	HDV POS < LLOQ

ULOQ = верхня межа кількісного визначення
LLOQ = нижня межа кількісного визначення

Набір InnuPREP Virus DNA/RNA	
ABI™PRISM® 7500 SDS - BIORAD™ CFX96®	
Вірусне навантаження HDV (МО/мл (IU/ml))	
Кількість > 5.75E+05	HDV POS > ULOQ
2.50E+02 ≤ Кількість ≤ 5.75E+05	КІЛЬКІСНА ОЦІНКА (МО/мл (IU/ml))
Кількість < 2.50E+02	HDV POS < LLOQ

ULOQ = верхня межа кількісного визначення
LLOQ = нижня межа кількісного визначення

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: Для кількісного визначення зразків у МО/мл (IU/ml) див. розділ R.

Результати, отримані з набором, код LUA-PCR.HDV.25, необхідно інтерпретувати з урахуванням клінічних симптомів та інших лабораторних параметрів, пов'язаних із станом пацієнта.

Можливі наступні результати:

Таблиця усунення несправностей

FAM	JOE	Результат	Перевірити
ЗРАЗОК невідомий	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація РНК HDV (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилка в процедурі або не функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення HDV і VIC/JOE для І.С. виявлення; 4. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки;

				7. щоб процедура екстракції та ПЛР була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
STD	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC правильний, лише якщо І.С. використовувався як контроль екстракції
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення HDV і VIC/JOE для І.С. виявлення; 3. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 4. що набір правильно зберігався; 5. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
STD	-	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення HDV і VIC/JOE для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався.
NTC	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	
NTC	+	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 2. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 3. що набір зберігався належним чином.
NTC	+	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 2. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 3. що набір зберігався належним чином.

Якщо результати тесту співпадають з **КОРЕКТНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ**, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

R. КІЛЬКІСНА ОЦІНКА

Калібратори STD розглядаються як зразки пацієнтів, і той самий об'єм, 10 мкл (μl), використовується в кроці ампліфікації.

Концентрація калібраторів STD визначається в копіях/мкл (μl).

Концентрація вірусного геному на мл (ml) для кожного зразка пацієнта розраховується за такою формулою:

$$\text{Результати (копій/мл (ml))} = \frac{\text{копій/мкл (μl) (дані циклу) x Об'єм елюйованого зразка (мкл (μl))}{\text{Об'єм екстрагованого зразка (мл (ml))}}$$

Приклад:

$$\text{Результат (копій/мл (ml))} = \frac{500 \text{ (копій/мкл (μl)) x 100 мкл (μl)}{0.2 \text{ мл (ml)}}$$

Результат (копій/мл (ml)) = 2.50E+05

Для перетворення вірусного навантаження зразків, вираженого в копіях/мл (ml), в МО/мл (IU/ml) використовується відповідний коефіцієнт перетворення, як зазначено в таблиці нижче:

Метод екстракції	ABI™PRISM® 7500 SDS BIORAD™ CFX96®	
	Коефіцієнт перетворення	Результат (МО/мл (IU/ml))*
Набір NucleoSpin Virus	0.55	копій/мл (ml)/0.55
Набір InnuPREP Virus DNA/RNA	0.53	копій/мл (ml)/0.53

*відкалібровано за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ (код PEI 7657/12)

Приклад:

Метод екстракції	ABI™PRISM® 7500 SDS BIORAD™ CFX96®		
	Результат (копій/мл (ml))	Коефіцієнт перетворення	Результат (МО/мл (IU/ml))
Набір NucleoSpin Virus (MN)	2.50E+05	0.55	4.55E+05
Набір InnuPREP Virus DNA/RNA	2.50E+05	0.53	4.72E+05

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
2. Коли результати випробувань передаються з лабораторії до центру інформатики, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.

5. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Загальних Технічних Специфікаціях або CTS (ст. 5, Розділ 3 Директиви IVD 98/79/EC).

Оцінку ефективності проводили в лабораторіях на референсних матеріалах (PEI, QCMD) і на матеріалі, наданому референсними клінічними лабораторіями.

5.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість кількісного молекулярного методу відноситься до найменшої кількості цільового маркера, яку можна правильно виявити. У контексті CTS це може бути виражено як: **межа виявлення** або **межа кількісної оцінки**:

Межа виявлення (LOD): Це найменше число цільового значення, яке може виявити система із заявленою ймовірністю.

Для тестів NAT вона виражається як найменша концентрація **аналіту**, яка при багаторазовому повторенні дає позитивний результат.

Межа виявлення (LOD) визначається тестуванням серійних розведень, що містять відомі концентрації аналіту.

LOD - це найнижча концентрація аналіту, яку можна постійно виявляти (наприклад, у > 95% зразків у звичайних лабораторних умовах).

У наборі з кодом LUA-PCR.HDV.25 **LOD** було визначено шляхом тестування кількох серійних розведень 1-го міжнародного стандарту РНК вірусу гепатиту D (код PEI 7657/12), екстрагованого за допомогою валідованого ручного набору для екстракції до граничної концентрації. П'ять точок розведення було протестовано у 8 повторях у трьох різних прогонах (8 повторень x 3 прогони), виконаних на приладі для визначення у реальному часі ABI 7500 і CFX96 RTS. Результати, отримані з 24 повторів, на кожному інструменті, враховуючи також використаний метод екстракції, були проаналізовані за допомогою аналізу **Probit**, щоб визначити межу виявлення на рівні 95%.

Результати аналізу **PROBIT** є наступними:

Межа виявлення (LOD) (p=0.05)		
Метод екстракції	ABI™PRISM® 7500 SDS	BIORAD™CFX96®
InnuPREP Virus DNA/RNA	66.71 МО/мл (IU/ml)	75.43 МО/мл (IU/ml)
NucleoSpin Virus	75.39 МО/мл (IU/ml)	85.55 МО/мл (IU/ml)

5.1.1 Межа кількісного визначення

Межа кількісного визначення була визначена шляхом вимірювання **Лінійності, динамічного діапазону та відтворюваності**.

Лінійність - це міра ступеня наближення кривої до прямої. Вона виражається значенням **SLOPE/НАХИЛ**.

Динамічний діапазон - це діапазон концентрацій стандартних точок, для яких кінцеве вихідне значення (пороговий цикл Ct) системи прямо пропорційне концентрації аналіту, з прийнятною правдивістю та точністю.

Межами динамічного діапазону є нижня і верхня межі кількісного визначення (**Межа кількісного визначення**).

Для набору LUA-PCR.HDV.25 Межа кількісного визначення була визначена шляхом тестування, з попередньою екстракцією, серійного розведення 1-го міжнародного стандарту РНК вірусу гепатиту D - штаму генотипу 1 HDV (код PEI 7657/12) з відомою концентрацією (МО/мл (IU/ml)).

На основі результатів, отриманих за допомогою набору LUA-PCR.HDV.25 на ABI 7500 і BioRad CFX96, динамічні діапазони були встановлені таким чином:

ABI™PRISM® 7500 SDS - BIORAD™ CFX96®	
InnuPREP Virus DNA/RNA	NucleoSpin Virus
2.50E+02 ≤ (МО/мл (IU/ml)) ≤ 5.75E+05	2.50E+02 ≤ (МО/мл (IU/ml)) ≤ 1.00E+05
1.33E+02 ≤ (копій/мл (ml)) ≤ 3.05E+05	1.38E+02 ≤ (копій/мл (ml)) ≤ 5.50E+04

Крім того, аналітичний динамічний діапазон перевіряли на всіх підтипах геному HDV з використанням плазмідних векторів ДНК, згрупованих за специфічною гомологією цільової послідовності щодо штаму генотипу 1 HDV, концентрація якого була визначена спектрофотометром.

Результати наведено нижче:

Штам генотипу HDV	Результат аналізу
1-2-4-5	5.0E-01 ≤ (копій/мкл (μl)) ≤ 5.0E+04
3-6-7-8	5.0E-01 ≤ (копій/мкл (μl)) ≤ 5.0E+04

5.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти та кількісно визначати тільки цільовий маркер.

Аналітичну специфічність аналізу РНК HDV вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з HDV, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів HDV.
3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Було протестовано інтерферуючий зразок, наданий NIBSC і Acrometrix.

Результати представлені в наступній таблиці:

Кількість зразків	Організм	Результат
4	HBV (HDV Негативний)	негативний
4	HCV	негативний
4	HIV	негативний

5.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

5.3.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що пристрій дає негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований пристроєм.

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	100
ХИБНО ПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	100
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів Діагностична специфічність системи була розрахована як **≥ 99.5%**.

5.3.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що прилад дає позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований пристроєм.

Для набору з кодом LUA-PCR.HDV.25 цей параметр досліджували шляхом дослідження 12 позитивних зразків РНК HDV та панелі QCMD 2019 та 2021 років.

Позитивні зразки HDV РНК

СПРАВЖНІЙ ПОЗИТИВНИЙ	27
ХИБНО НЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	27
ЧУТЛИВІСТЬ %	100

На основі результатів отримана Діагностична Чутливість системи була розрахована і становить 100%.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	≥ 99.5%

5.4 ТОЧНІСТЬ

Точність показує ступінь надійності системи. Кожна процедура вимірювання має притаманну випадкову зміну, яка називається «випадкова похибка». Випадкова похибка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання у вигляді стандартного відхилення (DevST) і коефіцієнта варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу стосується відповідності між повторними вимірюваннями того самого матеріалу.

У наборі з кодом LUA-PCR.HDV.25 **точність** була виражена як варіабельність у межах аналізу та між аналізами. Він був протестований в одному циклі (внутрішній аналіз) і в трьох різних циклах (між аналізами) з кривою 4 стандартних точок у дублікатах.

Потім розраховували варіабельність всередині та між аналізами.

За відсутності встановлених параметрів у Європейській директиві IVD CTS ми визначили наступне значення прийнятності для РНК HDV:

Коефіцієнт варіації в аналізі (CV%) < 3%.

Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) < 3%.

Т. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору рекомендується уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Суворе дотримання протоколу необхідне для отримання надійних результатів тесту. Зокрема, точне піпетування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням етапів термоцикування є важливими для точного та відтворюваного виявлення та кількісного визначення РНК HDV.

Визначення РНК HDV у зразку пацієнта має значні медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.

Рекомендується, щоб конфіденційність, належне консультування та медичне обстеження розглядалися як важливі аспекти послідовності тестування.

СИМВОЛИ

	Код продукту		Температура зберігання
	Прилад для діагностики in vitro		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