



**НАБІР
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РНК
ВІРУСУ ГЕПАТИТУ D,
ДОДАТКОВИЙ ПРОТОКОЛ ДЛЯ CFX 96**

**HDV RNA Quantification Kit
Supplemental Protocol for CFX 96**

Кат. №: **LUA-PCR.HDV-LPB.32**
Додатковий протокол

Дата випуску інструкції: **09-2017**
Версія: **2**

ЗМІСТ

1 ПРИЗНАЧЕННЯ ДОДАТКОВОГО ПРОТОКОЛУ	2
2 КОМПОНЕНТИ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ НАБОРУ	2
3 ПРОТОКОЛ ДЛЯ CFX96.....	2
3.1 Підготовка внутрішнього контролю.....	2
3.2 Приготування 25x Суміші реагентів.....	3
3.3 Приготування 1x Майстер-міксу	3
4 АНАЛІЗ ДАНИХ.....	3

1 ПРИЗНАЧЕННЯ ДОДАТКОВОГО ПРОТОКОЛУ

Цей стислий протокол містить спеціальну інформацію про застосування набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D для приладу CFX96, включаючи компоненти набору, протокол і умови проведення циклів. Додаткові відомості містяться у основній інструкції набору.

2 КОМПОНЕНТИ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ НАБОРУ

		32		96
Кат. №:				
низькопрофільні смужки 0.1 мл (мл) (білі)		847-0207400584		847-0207400582
РНК ВК (RNA IC)¹		ВК спайк-пробірка для 1 x 0.50 мл (мл) робочого розчину		ВК спайк-пробірка для 2 x 0.50 мл (мл) робочого розчину
Суміш реагентів ВГД/ВК (HBV/IC RM)²		Суміш реагентів для 1 x 0.05 мл (мл) робочого розчину		Суміш реагентів для 2 x 0.05 мл (мл) робочого розчину
Вода без РНКаз (PCR grade H₂O)³		1 x 1.5 мл (мл)		2 x 1.5 мл (мл)
Ферментна суміш FS ПЛР РЧ (RT PCR Enzyme)⁴		1 x 0.235 мл (мл)		1 x 0.660 мл (мл)
Інструкція (IFU)		1		1

Компоненти набору для застосування на CFX96 з використанням низькопрофільних смужок 0.1 мл (мл) (білі)

Компонент		32		96	Опис
Смужки для зразків HDV LPW		4 смужки (4 x 8 пробірок)		12 смужок (12 x 8 пробірок)	Смужки для зразків, покриті підсилювачем ампліфікації
Стандарти ВГД/ВК 1-4 LPW		4 смужки (4 x 4 пробірки)		4 смужки (4 x 4 пробірки)	Стандарт кількісного визначення, покритий РНК HDV, РНК ВК та підсилювачем ампліфікації
Оптична стрічка		1		2	Оптична стрічка

3 ПРОТОКОЛ ДЛЯ CFX96

Використовуйте RoboGene® HDV RNA Quantification Kit 2.0 - Low profile strips 0.1 ml (білі) (Order no.: 847-020740058X).

3.1 Підготовка внутрішнього контролю

ПРИМІТКА

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D оцінювали разом з набором для екстракції вірусної РНК/ДНК (LUA-PCR.EXTR.50). Внутрішній контроль надається у вигляді спайк-пробірки **РНК ВК** в Наборі для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D. Підготуйте пробірку **РНК ВК** відповідно до наведених нижче інструкцій та екстрагуйте РНК, дотримуючись інструкцій до Набору LUA-PCR.EXTR.50.

- Коротко центрифугуйте спайк-пробірку **РНК ВК** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізований **РНК ВК** на дні пробірки. Додайте у флакон 520 мкл (μl) **Води без РНКаз**; закрийте пробірку, коротко перемішайте на вортексі, а потім нетривало центрифугуйте на повній швидкості.
- Інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 5 хвилин, використовуючи термошейкер (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте шляхом короточасного перемішування на вортексі, а потім центрифугуйте на повній швидкості.
- Додайте 10 мкл (μl) ресуспендованого **РНК ВК** на реакцію екстракції до Лізуючого розчину відповідного набору LUA-PCR.EXTR.50., перемішайте шляхом короточасного перемішування на вортексі.
- Дотримуйтесь інструкцій набору для екстракції «Протокол 3: Екстракція вірусної РНК/ДНК з 400 мкл (μl) сироватки/плазми за допомогою **спайк-пробірки РНК ВК** (модифікований)». Зверніть увагу на правильність температури лізису (70 °C (°C)).

3.2 Приготування 25х Суміші реагентів

1. Коротко центрифугуйте **Суміш реагентів ВГД/ВК** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізовану суміш реагентів на дні пробірки.
2. Додайте 53 мкл (μl) **Води без РНКа** до **Суміш реагентів ВГД/ВК**; закрийте пробірку, перемішайте шляхом короткого перемішування, а потім центрифугуйте на повній швидкості.
3. Інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 20 хв, використовуючи термошейкер (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте шляхом короткого перемішування, а потім центрифугуйте на повній швидкості.

3.3 Приготування 1х Майстер-міксу

1. Перед нперед приготуванням Майстер-міксу декілька разів обережно переверніть **Ферментну суміш FS ПЛР РЧ** і коротко центрифугуйте.
2. Приготуйте 1х Майстер-мікс відповідно до наведеної нижче таблиці. Перемішайте на вортексі протягом щонайменше 10 секунд, а потім центрифугуйте.

Таблиця 1 Склад 1х Майстер-мікс на реакцію

Реагент	Об'єм для 1х гхп (мкл (μl))	Кінцева концентрація
Вода без РНКа	12.75	-
Суміш реагентів ВГД/ВК	1	1х
Суміш реагентів, 25х		
Ферментна суміш FS ПЛР РЧ	6.25	1х
Загальна кількість	20	

3. Помістіть **Смужки для зразків HDV LPW** або **Пробірки для зразків HDV RG** і стандарт для кількісного визначення **Стандарту ВГД/ВК 1-4 LPW** або **Стандарту ВГД/ВК 1-4 RG** на відповідну охолоджувальну платформу.
4. Додайте 20 мкл (μl) 1х Майстер-міксу в пробірки для зразків та кожен пробірку зі стандартом кількісного визначення **Стандарту ВГД/ВК 1-4**.
5. Додайте 5 мкл (μl) **Води без РНКа** в лунки, які служать як NTC, і до всіх стандартів кількісного визначення, що містять 1х Майстер-мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl).
6. Додайте 5 мкл (μl) елюату із екстракції РНК (Набір LUA-PCR.EXTR.50) до відповідних лунок для зразків, що містять 1х 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 смужки ПЛР LPW протягом 1 хвилини при 1000 об/хв (rpm), щоб зібрати суміш ПЛР на дні кожної лунки.
8. Запрограмуйте застосовані платформи ПЛР у реальному часі, як зазначено в таблицях нижче, і запустіть програму.

Таблиця 2 Програма ПЛР для CFX96

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Ремпінг
1	1	Зворотна транскрипція	55 °C (°C)	15 хвилин	3.5 °C (°C)/сек
2	1	Ферментна активація	95 °C (°C)	2 хвилини	3.5 °C (°C)/сек
3	45	Денатурація	95 °C (°C)	15 секунд	3.5 °C (°C)/сек
		Відпал/Елонгація*	60 °C (°C)	1 хвилина	2.2 °C (°C)/сек

*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; VIC)

4 АНАЛІЗ ДАНИХ

Кожна ампліфікація РНК пов'язана з генерацією сигналу флуоресценції, що вимірюється в каналі FAM (для РНК HDV) і в каналі VIC або (для РНК ВК), що призводить до сигмоподібної кривої росту (логарифмічної шкали). Аналіз даних виконується згідно з інструкціями виробника (посібник для приладу CFX96. Перевірте отримані дані, щоб переконатися, що аналіз дійсний, і інтерпретуйте результати (основну інструкцію набору).

ПРИМІТКА

Для усунення несправностей зверніться до основній інструкції набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D.

Концентрацію РНК HDV у клінічних зразках визначають на основі стандартної кривої, отриманої в результаті аналізу стандартної смужки кількісного визначення та Ct значень відповідних зразків. Концентрація РНК HDV виражається в МО/мл (IU/ml). Нижче наведено концентрації стандартів кількісної оцінки РНК HDV у разі використання набору LUA-PCR.EXTR.50. Наступна інформація містить очікувані значення Ct стандартів на відповідних платформах ПЛР у реальному часі.

Таблиця 3: Концентрації стандартів кількісної оцінки РНК HDV (CFX96)

Стандарт ВГД/ВК 1-4	РНК HDV [МО/мл (IU/ml)]
1	20 000 000
2	200 000
3	2 000
4	200

ПРИМІТКА

Стандартні значення залежать від застосування набору для екстракції РНК із набором для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту D, а також витратними матеріалами, необхідними для платформи ПЛР у реальному часі CFX96.

Критеріями для перевірки запуску є нахил і значення R^2 стандартної кривої (див. нижче). Діапазони очікуваних значень Ct стандартів відносяться до власних валідаційних даних і повинні використовуватися як рекомендації для встановлення порогових значень. Якщо один з чотирьох стандартів кількісного визначення знаходиться за межами діапазону, як визначено нижче, розрахунок стандартних кривих все ще можливий, і кількісне визначення залишається дійсним, якщо параметри стандартної кривої знаходяться в межах діапазону. У такому випадку не може бути обмежено жодне право на гарантію на весь продукт.

Таблиця 4: Критерії перевірки запуску

Параметр	CFX96
Діапазони нахилу	-3.10 до -3.60
Коефіцієнт лінійної регресії (R^2) референсної кривої має становити від 0.98 до 1.00.	
Очікувані значення Ct для РНК ВК стандартів кількісної оцінки (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)	
VIC	≤ 39
Очікувані значення Ct для РНК ВК у HDV-негативних та HDV-позитивних зразках пацієнтів (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)	
VIC	≤ 39

Таблиця 5: Очікувані значення Ct стандартів кількісної оцінки зазначені нижче

Стандарт ВГД/ВК 1-4	Очікуваний приріст між значеннями Ct	CFX96	
		середнє	від - до
1		13.8	13.6 - 14.1
2	1 до 2 + ~ 6.64	21.1	20.9 - 21.9
3	2 до 3 + ~ 6.64	27.8	27.5 - 28.2
4	3 до 4 + ~ 3.32	31.8	30.6 - 33.1

СИМВОЛИ

REF	Код продукту		Температура зберігання
IVD	Прилад для діагностики <i>in vitro</i>		Дивіться інструкцію з використання
LOT	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