



# НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РНК ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С

## HCV RNA Quantification Kit

Кат. №: **LUA-PCR.HCV.192**  
Кількість тестів: **192**

Дата останнього перегляду інструкції: **02-2022**  
Версія: **6**

### **ЗМІСТ**

<b>1 ВСТУП.....</b>	<b>2</b>
1.1 Призначення.....	2
1.2 Інформація про збудника.....	2
1.3 Технічна підтримка .....	2
1.4 Символи та аббревіатури .....	2
<b>2 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ.....</b>	<b>3</b>
<b>3 ОПИС ТА ПРИНЦИП АНАЛІЗУ .....</b>	<b>3</b>
3.1 Принцип аналізу TaqMan® .....	3
3.2 Пояснення кількісного аналізу для визначення РНК вірусу гепатиту С.....	3
3.3 Обмеження.....	4
<b>4 ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ.....</b>	<b>4</b>
4.1 Аналітична чутливість .....	4
4.2 Лінійний діапазон .....	5
4.3 Специфічність.....	5
4.3.1 Виявлення генотипу та кількісна оцінка .....	5
4.3.2 Аналітична специфічність .....	6
4.3.3 Діагностична специфічність .....	6
4.4 Точність.....	6
4.5 Надійність.....	7
4.6 Діагностична оцінка .....	8
<b>5 КОМПОНЕНТИ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ НАБОРУ .....</b>	<b>9</b>
<b>6 НЕОБХІДНЕ ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ДОБАВКИ .....</b>	<b>10</b>
<b>7 ПРОЦЕДУРА .....</b>	<b>10</b>
7.1 Збір та обробка клінічних зразків.....	10
7.2 Очищення РНК HCV від клінічних зразків .....	11
7.3 Внутрішній контроль РНК.....	11
7.4 Загальна процедура кількісних аналізів.....	11
<b>8 ПРОТОКОЛ.....</b>	<b>11</b>
8.1 Підготовка внутрішнього контролю.....	11
8.2 Використання розчиненого ІС для ручного очищення .....	11
8.3 Використання розчиненого ІС для ручного очищення .....	11
8.4 Приготування 25x суміші реагентів .....	11
8.5 Приготування 1x майстер-міксу .....	11
8.6 Підготовка стандартів для кількісної оцінки.....	12
8.7 Приготування реакційного набору .....	12
<b>9 АНАЛІЗ ДАНИХ.....</b>	<b>13</b>
<b>10 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ.....</b>	<b>15</b>

## 1 ВСТУП

### 1.1 Призначення

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С призначений для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С (HCV) за допомогою ПЛР у реальному часі у зразках ЕДТА- або цитрат плазми та сироватки людини. Для очищення зразків перевірено ручний метод (Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA), а також автоматизований метод (Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX). Для ампліфікації та виявлення Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С перевірено на таких пристроях ПЛР у реальному часі: qTOWER 2 & 3; CFX96; LightCycler® 480; 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000/Q. Аналіз призначений для клінічного ведення пацієнтів з хронічним HCV у поєднанні з клінічною картиною та іншими лабораторними маркерами інфекції HCV.

Цей тест призначений для оцінки вірусної відповіді на противірусну терапію, що вимірюється за змінами рівня РНК HCV 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 С не призначений для використання в якості скринінгового тесту для виявлення РНК HCV в крові або продуктах крові або як діагностичний тест для підтвердження наявності інфекції HCV.**

### 1.2 Інформація про збудника

Гепатит С - це вірусна інфекція печінки, яка до ідентифікації збудника в 1989 році називалася парентерально «гепатитом не А, не В». Інфекція вірусу гепатиту С (HCV) становить більшість посттрансфузійних і спорадичних гепатитів. HCV є одноланцюговим, позитивним смисловим РНК-вірусом з геномом приблизно 9700 нуклеотидів, що кодуєть 3000 амінокислот. Існує висока частота прогресуючого хронічного гепатиту. Геном РНК містить висококонсервативні 5' і 3' нетрансльовані області, які використовуються в більшості наборів для виявлення. Різні ізоляти HCV демонструють високу гетерогенність послідовності. На сьогоднішній день класифіковано 7 генотипів і понад 80 підтипів. Генотип 1 є найпоширенішим у світі, за ним йдуть генотип 3 і 2. В Африці та на Аравійському півострові найпоширенішим є генотип 4. Генотип 3а є найпоширенішим, напр. в Пакистані.



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

В інструкції використовуються наступні аббревіатури:

<b>Ct</b>	Порогове значення циклу
<b>CV</b>	Коефіцієнт варіації
<b>dNTP</b>	2'-дезоксинуклеотид 5'-трифосфат
<b>HCV</b>	Вірус гепатиту С
<b>IC</b>	Внутрішній контроль
<b>IFU</b>	Інструкція з використання
<b>IU</b>	Міжнародні одиниці
<b>NTC</b>	Нешаблонний контроль
<b>PEI</b>	Інститут Пауля-Ерліха, Ланген, Німеччина
<b>WHO</b>	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.

Будь ласка, будьте обережні під час піпетування зразка, щоб уникнути перенесення забруднень.

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

Будь ласка, проводьте регулярне технічне обслуговування вашого обладнання, щоб переконатися, що необхідні температури, швидкість центрифугування та інтенсивність змішування (об/хв (rpm)) підтримуються правильно.

### 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 зондами олігонуклеотидів, що є комплементарними для бажаних цільових послідовностей. У присутності цілей зонди гібридизуються зі своїми ціль-комплементарними послідовностями. ДНК-полімераза Taq від ферменту ПЛР в реальному часі має екзонуклеазну активність 5' → 3', яка гідролізує зонди 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 С

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С - це ампліфікаційний аналіз для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С у зразках плазми та сироватки людини. Аналіз дозволяє виявити всі 8 відомих генотипів HCV, застосовуючи праймери та зонди, специфічні для підпослідовності 5' нетрансльованої області вірусного геному. Кількісне визначення зразків виконується паралельною ампліфікацією включеної кількісної стандартної смуги.

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 HCV у зразках і стандартах, а також РНК IC вимірюють незалежно, на різних довжинах хвилі, завдяки зондам, міченим різними флуоресцентними репортерними барвниками. Виявлення РНК HCV проводиться в каналі FAM. Для моніторингу внутрішнього контролю набір надає два варіанти залежно від налаштування пристрою ПЛР у реальному часі та дозволяє визначати в каналі Yakima Yellow/VIC/JOE або Cy5.

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 2: Виділення вірусної РНК/ДНК із 400 мкл (µl) сироватки/плазми за допомогою ІС спайк-пробірки».

Автоматизовану підготовку зразків слід проводити за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX у поєднанні з автоматичним пристроєм для піпетування «CyBio Felix Basic Unit with Enclosure» разом із додатковим модулем для екстракції «CyBio Felix Extraction Set».

### 3.3 Обмеження

Цей тест підтверджено для використання з ЕДТА- або цитратною плазмою, або сироваткою людини. Гепаринізовану плазму слід виключити з аналізу (див. розділ «Точкова надійність тесту»). Дуже високі концентрації ліпідів можуть гальмувати результати кількісного визначення. Якщо замість рекомендованих використовуються інші типи зразків, то можна отримати неправильні результати. Продукт повинен використовуватися тільки персоналом, який спеціально проінструктований та знає процедури діагностики *in vitro*. Щоб отримати оптимальні результати ПЛР необхідно чітко дотримуватися інструкції з використання. Цей набір можна використовувати лише зі згаданими пристроями ПЛР у реальному часі та рекомендованими витратними матеріалами для ПЛР. Не використовуйте протерміновані компоненти та не змішуйте їх з компонентами з різних лотів.

## 4 ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ

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

Перевірку Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С проводили за допомогою обох методів очищення, ручного очищення за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA, а також автоматичного методу очищення з використанням Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX. З будь-яким методом було досягнуто порівнянних результатів, як показано в розділі «Аналітична чутливість».

### 4.1 Аналітична чутливість

Аналітичну чутливість Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С визначали шляхом аналізу серії розведень PEI Референсний матеріал HCV РНК (№ 3443/04, генотип 1). Аналітичну чутливість використовуваних пристроїв ПЛР у реальному часі визначали, як узагальнено нижче.

Таблиця 1a: Визначені специфічні для пристрою межі виявлення та довірчі інтервали за допомогою ручного очищення нуклеїнових кислот

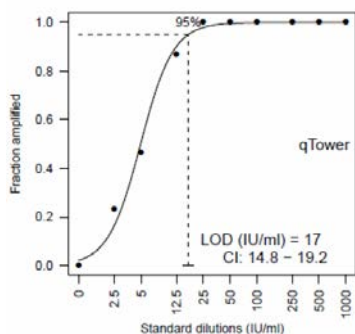
Пристрій qPCR	Межа виявлення (LOD) (МО/мл (IU/mL))	95% довірчий інтервал (МО/мл (IU/mL))	
qTOWER <sup>3</sup>	17.0	14.8	19.2
CFX96	13.6	11.6	15.5
LightCycler <sup>®</sup> 480	14.1	11.5	16.8
7500 Fast	20.2	17.1	23.2
Rotor-Gene <sup>®</sup> 6000	17.4	14.7	20.1

Таблиця 1b: Визначені специфічні для пристрою межі виявлення та довірчі інтервали за допомогою автоматичного очищення нуклеїнових кислот

Пристрій qPCR	Межа виявлення (LOD) (МО/мл (IU/mL))	95% довірчий інтервал (МО/мл (IU/mL))	
qTOWER <sup>3</sup>	11.7	9.8	13.7
CFX96	14.7	12.4	17.0
LightCycler <sup>®</sup> 480	13.2	11.2	15.1
Rotor-Gene <sup>®</sup> 6000	19.6	17.2	22.0
RealLine Cyler 48	26.5	22.6	30.5
RealLine Cyler 96	23.6	20.7	26.6
QuantStudio 5	19.7	17.4	22.0

Межу виявлення розраховували за допомогою аналізу PROBIT принаймні 24 повторами кожного розведення референсного матеріалу на кожному пристрої qPCR з достовірністю 95 % (див. Рисунок 1).

**Позитивна ампліфікація ПЛР в реальному часі**



**Позитивна ампліфікація ПЛР в реальному часі**

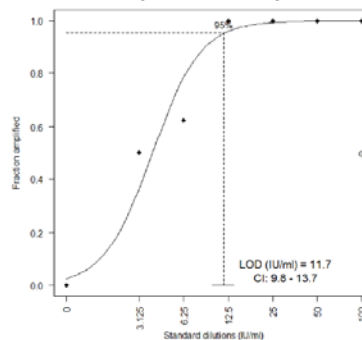


Рисунок 1: Аналіз PROBIT для визначення специфічних для пристрою ПЛР меж виявлення (LOD) з достовірністю 95 %, показаний, як приклад, для пристрою qTOWER<sup>3</sup> для ручного (ліворуч) та автоматичного (FX) очищення (праворуч)

Окремі значення нижче межі виявлення можуть бути правдоподібними, але з більшою ймовірністю помилки. Щоб зменшити ймовірність цієї помилки, рекомендується 3 повторення таких зразків.

#### 4.2 Лінійний діапазон

Лінійний діапазон для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С визначали шляхом аналізу серії розведень синтетичної РНК вірусу гепатиту С у діапазоні від  $4 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^1$  МО/мл (IU/mL) та нативного матеріалу зразка від  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^1$  МО/мл (IU/mL). Експериментальне оцінювання проводили двічі, кількісно оцінюючи всі зразки у трьох примірниках за допомогою пристроїв ПЛР у реальному часі CFX96, qTOWER<sup>3</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 480, 7500 Fast та Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000.

Отримані результати кількісного визначення охоплювали лінійний діапазон протягом 9  $\log_{10}$  кроків від 50 МО/мл (IU/mL) до  $4 \times 10^{10}$  МО/мл (IU/mL).

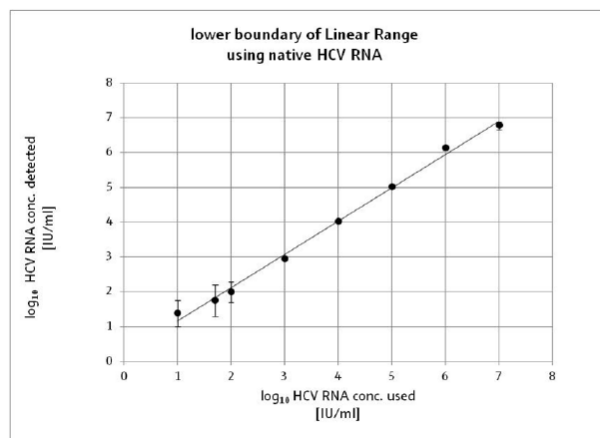
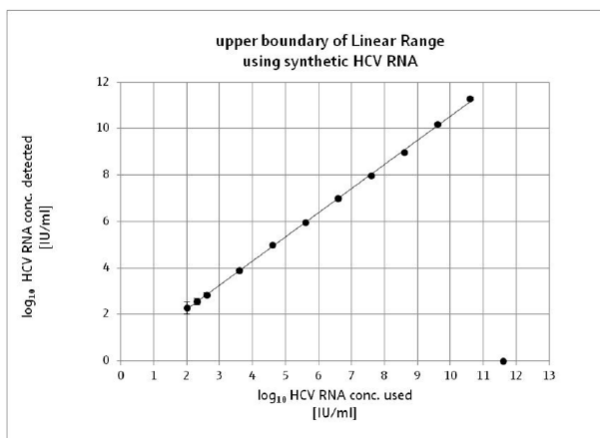


Рисунок 1: Межі лінійного діапазону, як приклад, показано для пристрою CFX96. Показані середні кількісні значення, а варіативність позначена стандартними відхиленнями. Найвищу концентрацію синтетичної РНК HCV ( $11.6 \log_{10}$  МО/мл (IU/mL)) виявити не вдалося

#### 4.3 Специфічність

##### 4.3.1 Виявлення генотипу та кількісна оцінка

Специфічність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С для виявлення та кількісної оцінки відомих генотипів/підтипів HCV була протестована за допомогою панелі генотипів, наданої Університетом Ессена (Німеччина), що містить зразки HCV-1a, -1b, -2a, -2b, -2c, -2i, -3a, -4a, -5a та -6e. Були підготовлені серії напівлогарифмічних розведень усіх зразків, і РНК екстрагували за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA за допомогою початкового об'єму зразка 400 мкл ( $\mu$ L).

Усі зразки були визначені кількісно за допомогою Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С в межах  $\pm \log_{10}$  інтервалу точності (див. Рисунок 3) порівняно з вихідним кількісним визначенням за допомогою Abbott HCV в реальному часі. Усі протестовані підтипи показали порівнянну ефективність кількісного визначення.

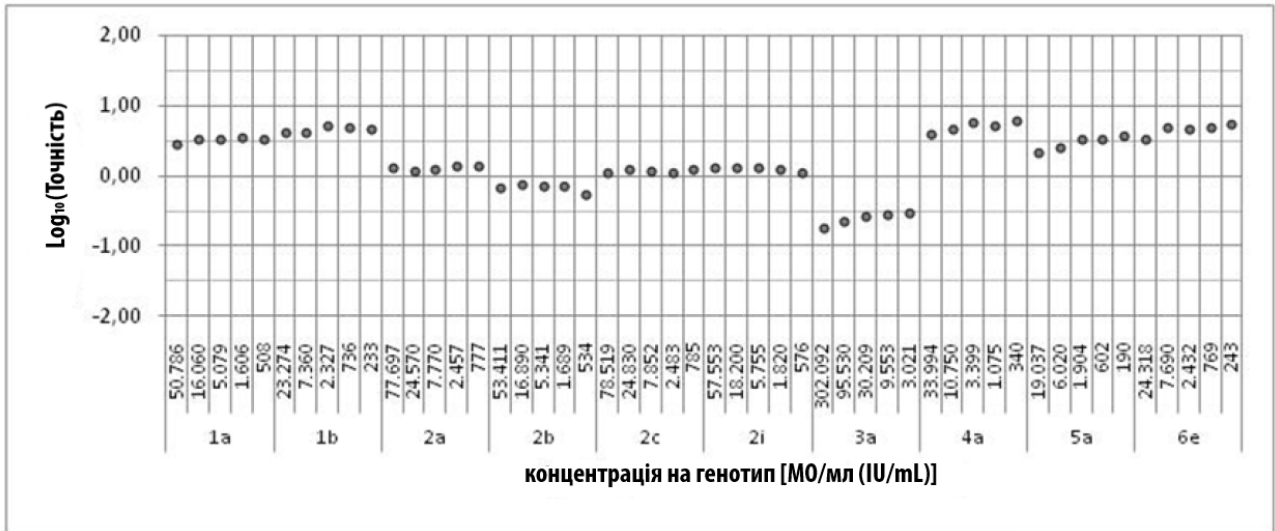


Рисунок 2: Графік точності для кількісної оцінки серії розведень різних підтипів HCV порівняно з HCV Abbott в реальному часі

Теоретична специфічність для виявлення всіх інших підтверджених генотипів і підтипів HCV була доведена шляхом вирівнювання послідовностей основних олігонуклеотидів з даними послідовності відповідних референсних штамів підтипів (дані не показані).

#### 4.3.2 Аналітична специфічність

Аналіз 10 непозитивних на HCV зразків флавівірусу людини (вірус Зіка, вірус Західного Нілу I та II, генотипи вірусу Денге 2-4) підтвердив 100 % аналітичну специфічність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С (див. таблицю 2).

Таблиця 2: Результати аналізу 10 непозитивних на HCV зразків флавівірусу людини

Зразок	Виявлення HCV	ІС виявлення
HCV позитивний контроль (к-сть = 1)	1/1	1/1
HCV негативний контроль (к-сть = 1)	0/1	1/1
Вірус Зіка (к-сть = 4)	0/4	4/4
Вірус Західного Нілу (к-сть = 3)	0/3	3/3
Вірус Денге (к-сть = 3)	0/3	3/3

#### 4.3.3 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність виражається як негативний результат при відсутності цільового значення. 100 зразків пацієнтів з негативним результатом тесту на РНК HCV за допомогою аналізу Procleix Ultrio були визначені за допомогою Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С. Усі зразки показали негативні результати на РНК HCV, але позитивні на РНК внутрішнього контролю (див. Таблицю 3).

Таблиця 3: Діагностична специфічність

Зразок	Виявлення HCV	ІС виявлення
HCV негативні зразки пацієнта (к-сть = 100)	0/100	100/100

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

#### 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 HCV за допомогою Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С.

Серію розведень, що складаються з 3 різних рівнів вірусного навантаження, вимірювали за допомогою 3 різних партій Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С у 3 різні дні та на 3 різних пристроях для ПЛР у реальному часі (CFX96, qTOWER3 та LightCycler® 480) для оцінки точності, точності в аналізі та між аналізами (див. Таблицю 4).

Таблиця 4: Точність, точність в межах і між аналізами Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С - Точні дані показані в цілому

Задана конц. [МО/мл (IU/mL)]	Середня визн. конц. [МО/мл (IU/mL)]	Достовірність	Достовірність log <sub>10</sub>	В межах інтервалу приймання *	Точність в аналізі		Точність між аналізами	
					СВ [МО/мл (IU/mL)]	КВ [%]	СВ [МО/мл (IU/mL)]	КВ [%]
25 000	26 303	1.05	0.02	так	3 870	15	5 200	20
2 500	2 764	1.11	0.04	так	373	13	565	20
250	237	0.95	-0.02	так	55	23	79	33

\*визначається як  $\pm 0.6 \log_{10}$  заданої точки

#### 4.5 Надійність

Надійність виражає загальну частоту відмов Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С і була перевірена для повної процедури тестування з використанням Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA для вилучення РНК.

Загальна кількість щонайменше 104 зразків, що містять референсну плазму, розведену до 50 МО/мл (IU/mL) (що представляє 3-кратну концентрацію вірусу від 95% граничного значення тесту), було проаналізовано на CFX96, qTOWER3, LightCycler® 480, 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000. Результати аналізу наведені в Таблиці 5a.

Таблиця 5a: Результати дослідження частоти невдач з використанням Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С

	(+) Результати	Частота невдач
<b>CFX96</b>		
HCV-РНК (FAM)	110/110	0%
IC-РНК (VIC/Cy5)	110/110	
<b>qTOWER<sup>3</sup></b>		
HCV-РНК (FAM)	110/110	0%
IC-РНК (YY/Cy5)	110/110	
<b>LightCycler® 480</b>		
HCV-РНК (FAM)	104/104	0%
IC-РНК (VIC/Cy5)	104/104	
<b>7500 Fast</b>		
HCV-РНК (FAM)	109/110	0.9%
IC-РНК (VIC/Cy5)	110/110	
<b>Rotor-Gene® 3000</b>		
HCV-РНК (FAM)	110/110	0%
IC-РНК (JOE/Cy5)	110/110	

Ще 112 зразків, екстрагованих за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX, що містить референсну плазму, розведену до 50 МО/мл (IU/mL), аналізували за допомогою RealLine Cyler 48/96, а також QuantStudio 5. Результати аналізу наведені в Таблиці 5b.

Таблиця 5b: Результати дослідження частоти невдач з використанням Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С

	(+) Результати	Частота невдач
<b>RealLine Cyler 48</b>		
HCV-РНК (FAM)	112/112	0%
IC-РНК (Cy5)	112/112	
<b>RealLine Cyler 96</b>		
HCV-РНК (FAM)	111/112	0.9%
IC-РНК (Cy5)	112/112	
<b>QuantStudio 5</b>		
HCV-РНК (FAM)	112/112	0%
IC-РНК (YY/Cy5)	112/112	

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

Результати кількісного визначення зразків з високою концентрацією ліпідів можуть бути значно зменшені. Таким чином, результати, отримані з ліпемічної плазми або сироватки, слід ретельно інтерпретувати. Гепаринізовану плазму необхідно виключити з аналізу через її інгібуючу дію на активність Taq-полімераз.

Ефективність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С під час сероконверсії аналізували за допомогою панелей попередньої сероконверсії PHV 922, PHV 924 і PHV 925, отриманих від SeraCare Life Sciences, Inc. (США). Дані кількісної оцінки РНК HCV порівнювали з аналізом NAT, який використовувався для початкового кількісного визначення вірусного навантаження відповідної панелі сероконверсії. Результати показані на Рисунку 4.



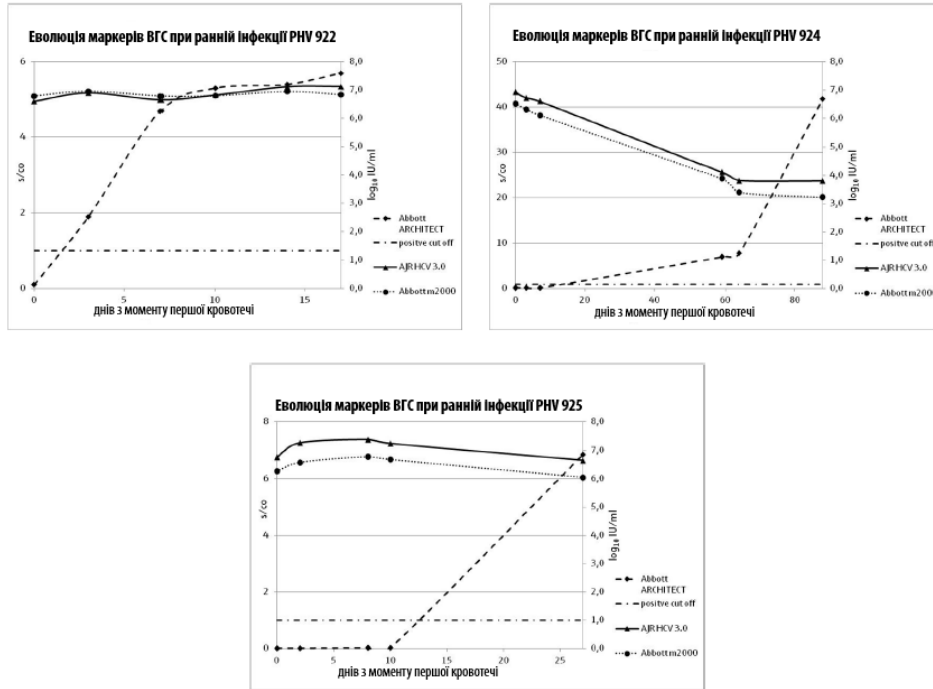


Рисунок 3: Ефективність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С під час сероконверсії. Концентрації РНК HCV блотували з початково вимірними рівнями антитіл і результатами аналізу Abbott m2000 для кількісного визначення вірусного навантаження. Крім того, концентрації РНК HCV спочатку визначали за допомогою аналізу CAP/CTM (Roche) і bDNA Versant (Siemens) (дані не показані)

У порівнянні з початково застосованими аналізами NAT Abbott m2000, CAP/CTM (Roche) і Versant bDNA (Siemens), Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С показав порівнянну продуктивність.

#### 4.6 Діагностична оцінка

Діагностичну чутливість і лінійність Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С було проаналізовано за допомогою 102 РНК HCV позитивних зразків на приладах CFX96, qTOWER3, LightCycler® 480, 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000.

Кількісні дані порівнювали з результатами, отриманими заздалегідь за допомогою CE-сертифікованого CAP/CTM аналізу (Roche) і CE-сертифікованого внутрішнього аналізу (MVZ Volkmann, Карлсруе, Німеччина), виконуючи лінійну регресію та додаткову регресію Демінга. Результати показані на Рисунку 5.

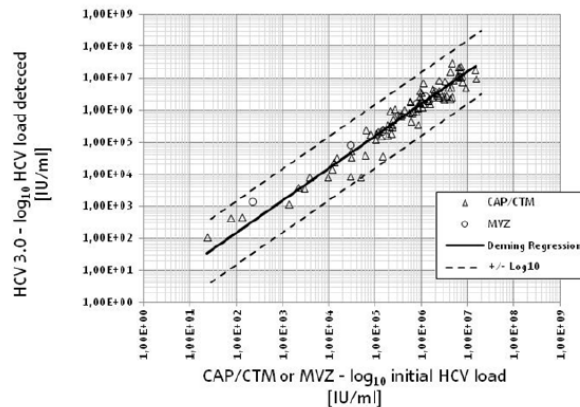


Рисунок 4: Діагностична оцінка: порівняння Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С за допомогою аналізу CAP/CTM (Roche) і сертифікованого внутрішнього аналізу (MVZ KA). Дані наведені для прикладу для кількісного визначення CFX96

Усі зразки були кількісно визначені в межах інтервалу приймання  $\pm \log_{10}$ . Лінійна регресія та регресія Демінга показали високий ступінь кореляції (див. Таблицю 6).

Таблиця 6: Діагностична оцінка - порівняння Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С з аналізом CAP/CTM (Roche) та сертифікованим внутрішнім аналізом (MVZ KA)

	CFX96	qTOWER <sup>3</sup>	7500 Fast	LightCycler® 480	Rotor-Gene® 6000
<b>Кореляція</b>	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96
<b>За <math>\pm \log_{10}</math></b>	0/102	0/102	0/102	0/102	0/64



#### ПРИМІТКА

Стандарти кількісної оцінки Набору для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С відкалібровані за референсним матеріалом PEI HCV-РНК (#3443/04), який сам був відкалібрований відповідно до 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для РНК HCV (NIBSC 96/790). Відомо, що кількісна оцінка кількох стандартних поколінь ВООЗ з однаковим NAT може призвести до різних концентрацій, хоча початкова концентрація встановлена на рівні 100 000 МО/мл (IU/mL) для всіх випусків. Ймовірно, цей артефакт спричинений процесами зберігання або транспортування («Оновлення щодо стабільності міжнародних стандартів HCV та пропозиція щодо 5-го міжнародного стандарту ВООЗ щодо HCV», Fryer J.F., NIBSC).

Тому ми дослідили наявний наразі 5-й міжнародний стандарт ВООЗ для РНК HCV (NIBSC 14/150). Результати виявили завищену оцінку стандарту (середнє значення  $5.27 \log_{10}$  [МО/мл (IU/mL)], СВ 0.06  $\log_{10}$  [МО/мл (IU/mL)]). Це слід враховувати при посиланні аналізу на 5-й міжнародний стандарт ВООЗ.

#### 5 КОМПОНЕНТИ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ НАБОРУ

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








- коробка 1 для ферменту для ПЛР в реальному часі (RT PCR) і внутрішнього контролю (IC)
- коробка 2 для HCV/IC RM та H<sub>2</sub>O для ПЛР,
- сумка для HCV/IC STD 1-4.

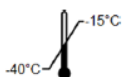
#### ПРИМІТКА

Фермент для ПЛР у реальному часі має бути ПОВТОРНО УПАКОВАНИЙ у коробку 1 після прибуття.

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С доступний у 3 розмірах, зведених у таблиці 7.

Таблиця 7: Версії та компоненти набору

		 32	 96	 192
<b>Кат. №:</b>		LUA-PCR.HCV.32	LUA-PCR.HCV.96	LUA-PCR.HCV.192
<b>IC<sup>1</sup></b>		IC Спайк-пробірка для 1 x 0.50 мл (мл) робочого розчину	IC Спайк-пробірка для 3 x 0.50 мл (мл) робочого розчину	IC Спайк-пробірка для 6 x 0.50 мл (мл) робочого розчину
<b>HCV/IC STD 1-4</b>		4 смужки (4 x 4 лунки)	4 смужки (4 x 4 лунки)	4 смужки (4 x 4 лунки)
<b>HCV/IC RM<sup>2</sup></b>		Суміш реагентів для 1 x 0.05 мл (мл) робочого розчину	Суміш реагентів для 1 x 0.05 мл (мл) робочого розчину	Суміш реагентів для 1 x 0.05 мл (мл) робочого розчину
<b>PCR grade H<sub>2</sub>O<sup>3</sup></b>		1 x 1.5 мл (мл)	2 x 1.5 мл (мл)	4 x 1.5 мл (мл)
<b>RT PCR Enzyme<sup>4</sup></b>		1 x 0.235 мл (мл)	1 x 0.660 мл (мл)	2 x 0.660 мл (мл)
<b>IFU</b>		1	1	1



#### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

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

#### ВАЖЛИВО

<sup>1</sup>Відповідну кількість **IC** слід розчинити в **H<sub>2</sub>O для ПЛР** незадовго перед використанням. Залишок розчиненого **IC** можна правильно розподілити на аликвоти та зберігати при -20 °C (°C). Збережені аликвоти можна використовувати до 60 днів. Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів.

<sup>2</sup>Відповідну кількість суміші реагентів **HCV/IC RM** слід розчинити в **H<sub>2</sub>O для ПЛР** незадовго перед використанням. Залишок розчиненого **HCV/IC RM** можна зберігати при -20 °C (°C). Заморожений **HCV/IC RM** можна використовувати до 60 днів. Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів. Завжди оберігайте від світла!

<sup>3</sup>Можливе повторне заморожування та розморожування H<sub>2</sub>O для ПЛР.

<sup>4</sup>Фермент для ПЛР у реальному часі загалом слід зберігати при -20 °С (°C). Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів. Тим не менш, Фермент для ПЛР у реальному часі слід завжди зберігати на крижаній підставці під час використання.

## 6 НЕОБХІДНЕ ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ДОБАВКИ

- HCV-позитивна контрольна плазма (наприклад, Міжнародний стандарт ВООЗ для РНК вірусу гепатиту С для тесту NAT або референсний препарат РНК HCV [PEI код №3443/04]). Надані стандарти кількісної оцінки можуть розглядатися як позитивний контроль.
- HCV-негативний контроль (наприклад, людська плазма або сироватка без РНК HCV)
- Для автоматичного очищення (Analytik Jena GmbH):
  - «Базовий блок CyBio FeliX з корпусом»
  - «Ноутбук - англійська операційна система» з програмним забезпеченням «Application Studio CyBio FeliX eExtract»
  - «Набір для екстракції CyBio FeliX»
- qTOWER 2 та 3 (Analytik Jena), CFX96 (Bio-Rad), LightCycler® 480 (Roche), 7500 Fast (Applied Biosystems), Rotor-Gene® 3000/6000/Q (Corbett Research/ Qiagen), RealLine 48-4/ 48-5/ 96-4/ 96-5 (Bioron), QuantStudio5 (Thermo)
- Спеціальне програмне забезпечення в режимі реального часу для аналізу даних та звітності
- Рекомендовані витратні матеріали для ПЛР для інструментів у режимі реального часу (див. таблицю нижче)
- Відповідні інструменти для піпетування та стерильні аерозоль-бар'єрні наконечники для піпеток
- Мікро центрифуга
- Центрифуга для планшетів
- Термоміксер
- Вортексний міксер
- 1.5 мл (ml) пробірки
- 2.0 мл (ml) пробірки
- Рукавички, лабораторний халат

Таблиця 8: Рекомендовані витратні матеріали для ПЛР та інформація для замовлення

Платформа ПЛР у реальному часі	ПЛР пластик	Герметизація
qTOWER 2 і 3, CFX 96	96-лунковий ПЛР-планшет 0.2 мл (ml), «зі спідницею», білий	Оптична ущільнювальна фольга
	Джерело: Analytik Jena Номер замовлення 844-70038-0	Джерело: Analytik Jena Номер замовлення 846-050-258
LightCycler® 480	LightCycler® 480 96-мультилунковий планшет, білий	Ущільнювальна фольга LightCycler® 480
	Джерело: Roche Номер замовлення 04729692001	Джерело: Roche Номер замовлення 04729757001
7500 Fast	MicroAmp Fast оптичний 96-лунковий реакційний планшет 0.1 мл (ml) (прозорий)	Ущільнювальна фольга LightCycler® 480
	Джерело: Thermo Fisher Номер замовлення 4346907	Джерело: Roche Номер замовлення: 04729757001
Rotor-Gene® 3000 - 6000/Q	Стрип-пробірки та ковпачки, 0.1 мл (ml)	-
	Джерело: Qiagen Номер замовлення 981103	-
RealLine Cyler 48/96 QuantStudio 5	96 x 0.2 мл (ml) планшет-трансформер Netflex білого кольору, високого профілю	Ущільнювальна фольга та стрічки для мікропластин Ахуген™
	Джерело: BIOplastics Номер замовлення B58709	Джерело: Ахуген UC 500 Номер замовлення 14-222-873

## 7 ПРОЦЕДУРА

### 7.1 Збір та обробка клінічних зразків

- Зібрати 5-10 мл (ml) крові за допомогою стандартних пробірок для забору зразків.
- Для плазми бажано використовувати ЕДТА або цитратний антикоагулянт; гепарин не застосовується через його інгібуючу дію на ПЛР.
- Сироватка: після збору цільної крові дати крові згорнутися, залишавши її при кімнатній температурі до 30 хвилин. Видали згусток центрифугуванням при 1000-2000 x g протягом 10 хвилин.
- Плазма: клітини видалити із плазми шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 1000-2000 x g. Перенести в стерильні пробірки.
- Зберігати сироватку та плазму при температурі 2-8 °С (°C). Протестувати протягом 5 днів.
- Зразки плазми або сироватки можна зберігати в глибоко замороженому вигляді протягом кількох місяців при температурі від -70 °С (°C) до -20 °С (°C) залежно від температури зберігання. Уникайте повторного заморожування та розморожування.

## 7.2 Очищення РНК HCV від клінічних зразків

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С був перевірений за допомогою ручного та автоматизованого методу очищення.

Для ручного методу очищення використовуйте Набір 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 HCV відповідно до конкретних інструкцій з використання, використовуючи «Протокол 2: Виділення вірусної РНК/ДНК із 400 мкл (µl) сироватки/плазми за допомогою ІС спайк-трубки».

Для автоматизованого методу очищення використовуйте Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX (виробництва Roboscreen GmbH).

Виконайте етапи очищення РНК HCV відповідно до конкретних інструкцій з використання.

## 7.3 Внутрішній контроль РНК

Набір для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С містить ІС Спайк-пробірку, стабільно покриту нуклеїновою кислотою внутрішнього контролю та носієм нуклеїнової кислоти. Використання ІС разом із Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX завжди дозволяє контролювати всю процедуру та виявляти хибнонегативні результати через невдалу екстракцію або надлишок інгібіторів у зразку. Щоб судити про очищення, значення Ст внутрішнього контролю, очищеного разом із негативною або позитивною плазмою РНК HCV, має бути в діапазонах, що стосуються інструменту, зведених у Таблиці 15.

## 7.4 Загальна процедура кількісних аналізів

Чотири стандарти кількісної оцінки представлені у вигляді стандартних смужок, стабільно покритих певною кількістю синтетичної РНК HCV. Стандарти калібровані за референсним матеріалом РЕНК HCV (№ 3443/04, відкалібрований за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ для РНК HCV (NIBSC 96/790)). Стандарти значення наведені в МО/мл (IU/mL), тобто концентрацію РНК HCV в аналізованому зразку можна розрахувати безпосередньо за референсною кривою без необхідності подальшого перетворення за рівнянням.

### ПРИМІТКА

Будь ласка, зверніть увагу, що наведені стандартні значення і, таким чином, кількісна оцінка залежать від набору для очищення РНК, який використовується разом із Набором для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С. Тому результати кількісної оцінки дійсні лише тоді, коли використовувалися Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT VIRUS RNA/DNA або Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX у поєднанні із зазначеними пристроями 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 С оцінювали разом з Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA, а також з Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit Kit-FX для екстракції нуклеїнових кислот. Внутрішній контроль надається у вигляді ІС спайк-трубки в Наборі для кількісного визначення РНК вірусу гепатиту С. Підготуйте пробірку ІС відповідно до наведених нижче інструкцій та витягніть РНК, дотримуючись інструкцій Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit Kit-FX.

1. Коротко центрифугуйте **ІС Спайк-пробірку** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізований **ІС** на дні пробірки.
2. Додайте у флакон 520 мкл (µL) **очищеної води для ПЛР**; закрийте пробірку, перемішайте, а потім центрифугуйте.
3. Інкубуйте при 37 °С (°C) протягом 5 хвилин, використовуючи струшувач (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте шляхом короткочасного перемішування на вортексі, а потім центрифугуйте.

### 8.2 Використання розчиненого ІС для ручного очищення

1. Додайте 10 мкл (µL) ресуспендованого ІС на реакцію екстракції до лізуючого розчину відповідного набору Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA.
2. Дотримуйтесь інструкцій набору для екстракції «Протокол 2: Виділення вірусної РНК/ДНК з 400 мкл (µL) сироватки/плазми за допомогою очищення **ІС Спайк-пробірки**».

### 8.3 Використання розчиненого ІС для ручного очищення

Дотримуйтесь інструкцій Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit Kit-FX.

### 8.4 Приготування 25x суміші реагентів

1. Коротко центрифугуйте **HCV/IC RM** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізовану суміш реагентів на дні пробірки.
2. Додайте 53 мкл (µL) **очищену воду для ПЛР** до **HCV/IC RM**; закрийте пробірку, перемішайте шляхом короткого перемішування, а потім центрифугуйте.
3. Інкубуйте при 37 °С (°C) протягом 5 хв, використовуючи струшувач (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте шляхом короткого перемішування, а потім центрифугуйте.

### 8.5 Приготування 1x майстер-міксу

1. Перед налаштуванням майстер-міксу кілька разів обережно інвертувати **Фермент для ПЛР у реальному часі** і коротко центрифугувати.

- Приготувати 1x майстер-мікс відповідно до наведеної нижче таблиці. Перемішати за допомогою вортекса протягом щонайменше 10 секунд, а потім центрифугувати.

Таблиця 9: Склад 1x майстер-мікс на реакцію

Реагент	Об'єм для 1x гхп (мкл (μl))	Кінцева концентрація
Очищена вода для ПЛР	7.75	-
HCV/IC RM Суміш реагентів, 25x	1.00	1x
Фермент для ПЛР у реальному часі	6.25	1x
Загальна кількість	15.00	

#### 8.6 Підготовка стандартів для кількісної оцінки

- Відкрити стандартну смужку **HCV/IC STD 1-4** і помістити смужку на відповідну крижану стійку.
- Додати 25 мкл (μl) **очищеної води для ПЛР** у кожну лунку стандарту кількісної оцінки **HCV/IC STD 1-4**; перемішати, піпетуючи кілька разів вгору і вниз.

#### ПРИМІТКА

Будьте обережні, використовуйте новий наконечник піпетки для кожного стандарту, щоб уникнути перенесення забруднення. Важливо змішувати стандарти кількісної оцінки **HCV/IC STD 1-4** шляхом піпетування вгору і вниз кілька разів. Не перемішувати на вортексі стандарти кількісної оцінки!  
Зберігайте стандарт кількісної оцінки на льоду або на крижаній решітці до введення в ПЛР!

#### 8.7 Приготування реакційного набору

- Помістіть витратні матеріали для ПЛР у режимі реального часу (не входять до комплекту) на відповідну крижану стійку.
- Додайте 15 мкл (μl) 1x майстер-мікс в лунки, призначені для кількісної оцінки зразків, NTC і додаткові чотири лунки для кожного стандарту кількісної оцінки **HCV/IC STD 1-4**.
- Додайте 10 мкл (μl) очищеної води для ПЛР у лунки, які слугують NTC. Додайте 10 мкл (μl) ресуспендованого **HCV/IC STD 1-4** до всіх лунок, які слугують кількісними стандартами, що містять 1x майстер-мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl). Переконайтеся, що очищена вода для ПЛР і стандартні розчини для кількісної оцінки належним чином змішані з майстер-мікс.

#### ПРИМІТКА

Після використання вилийте залишки розчину **HCV/IC STD 1-4**. Щоб уникнути забруднення, ми рекомендуємо запечатати стандарт кількісної оцінки відповідною кришкою (наприклад, параплівкою, не входить до набору).

- Додайте 10 мкл (μl) елюату із виділеної РНК (Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX) у відповідні лунки для зразків, що містять 1x майстер-мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl). Переконайтеся, що майстер-мікс і елюат змішані належним чином.
- Покрити витратні матеріали для ПЛР у реальному часі. Центрифугувати ПЛР-планшети протягом 1 хв при 1000 об/хв (rpm), щоб зібрати ПЛР-суміш на дні кожної лунки (не потрібно для пробірок Rotor-Gene®).
- Запрограмуйте застосовані платформи ПЛР у реальному часі, як зазначено в Таблицях 10-13, та запустіть програму.

#### ПРИМІТКА

Основна стандартна крива в процесі виконання забезпечує критерії перевірки запуску - нахил та значення R2 (див. Таблицю 16). Ніколи не використовуйте зовнішні стандартні криві для кількісної оцінки.

Таблиця 10: Програма ПЛР для qTOWER 2 і 3 і CFX96

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	47°C (°C)	15 хв	5 °C(°C)/сек
2	1	Активация Taq	95°C (°C)	2 хв	5 °C(°C)/сек
3	45	Денатурація	95°C (°C)	15 сек	2.5 °C(°C)/сек
		Відпал/Подовження*	57°C (°C)	1 хв	5 °C(°C)/сек

\*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; Cy5) для qTOWER 2 і 3, (FAM; VIC/JOE та/або Cy5) для CFX96 для qTOWER 2 і 3 рекомендовані наступні попередні налаштування пристрою: Відкрити новий проект > Сканувати > Підсилення: для FAM = 4; для VIC/JOE = 3; для Cy5 = 5.

Таблиця 11: Програма ПЛР для 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000/Q, RealLine Cyclers 48/96

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	47°C (°C)	15 хв	
2	1	Активация Taq	95°C (°C)	2 хв	Не регулюється
3	45	Денатурація	95°C (°C)	15 сек	
		Відпал/Подовження*	57°C (°C)	1 хв	

\*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; Cy5) для RealLine Cyclers 48 / 96 та для 7500 Fast та Rotor-Gene®3000/6000/Q (FAM; VIC/JOE та /або Cy5)

Таблиця 12: Програма ПЛР для QuantStudio 5

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	47°C (°C)	15 хв	3.16 °C(°C)/сек
2	1	Активация Taq	95°C (°C)	2 хв	3.16 °C(°C)/сек
3	45	Денатурація	95°C (°C)	15 сек	3.16 °C(°C)/сек
		Відпал/Подовження*	57°C (°C)	1 хв	2.45 °C(°C)/сек

\*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; VIC та / або Cy5)

Таблиця 13: Програма ПЛР для LightCycler®480

Крок	Цикл	Профіль	Температура	Час	Крок
1	1	Зворотна транскрипція	47°C (°C)	15 хв	4.4 °C(°C)/сек
2	1	Активация Taq	95°C (°C)	2 хв	4.4 °C(°C)/сек
3	45	Денатурація	95°C (°C)	15 сек	2.5 °C(°C)/сек
		Відпал/Подовження*	57°C (°C)	1 хв	2.2 °C(°C)/сек
4	1	Охолодження	40°C (°C)	30 сек	Макс.

\*Збір даних: виявлення флуоресценції (FAM; VIC та / або Cy5)

## 9 АНАЛІЗ ДАНИХ

Кожна ампліфікація РНК пов'язана з генерацією сигналу флуоресценції, що вимірюється в каналі FAM (для РНК HCV) і в каналі YY/VIC/JOE або Cy5 (для IC), що призводить до кривої сигмовидного 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 14).

Таблиця 14: Інтерпретація результатів

Канал FAM	Канал YY/VIC/JOE або Cy5	Інтерпретація
<b>Інтерпретація результатів виявлення</b>		
x	x	Зразок дійсний - виявлення зразка РНК HCV
x	-	Зразок недійсний – повторити зразок
-	x	Зразок дійсний - лише виявлення IC, РНК HCV не виявляється/ HCV негативний зразок

-	-	Зразок недійсний - немає ампліфікації/виявлення взагалі, повторити зразок
<b>Інтерпретація результатів кількісної оцінки</b>		
< LOD	x	Нижче нижньої межі виявлення аналізу (наприклад, 17 МО/мл (IU/ml) для qTOWER <sup>3</sup> ). Для підтвердження позитивного результату рекомендується три повторення аналізу.
> 4x10 <sup>10</sup>	x	Вище верхньої межі охопленого лінійного діапазону аналізу (4 x 10 <sup>10</sup> МО/мл (IU/ml)). Рекомендується розбавити вихідний зразок.
< 50 МО/мл (IU/ml)	x	Нижче нижньої межі охопленого лінійного діапазону аналізу (50 МО/мл (IU/ml)). Для підтвердження кількісної оцінки рекомендується три повторення аналізу.

Концентрацію РНК HCV у клінічних зразках визначають на основі стандартної кривої, отриманої в результаті аналізу стандартної смужки кількісного визначення та Ct значень відповідних зразків. Концентрація РНК HCV виражається в МО/мл (IU/ml). У таблиці 15 наведено концентрації стандартів кількісної оцінки РНК HCV у разі використання Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX.

Таблиця 15: Стандартні концентрації кількісної оцінки РНК HCV

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

#### ПРИМІТКА

Встановлення порогу може суттєво вплинути на значення Ct. Нижче наведені рекомендації щодо встановлення порогових значень.

- qTOWER 2 & 3: FAM: 3.0 – 5.5; YY: 2.5 – 6.0; Cy5: 3.0 -5.5
- CFX96: FAM: 500 - 750; YY: 100 - 200; Cy5: 50 - 200
- LightCycler<sup>®</sup> 480:

Канал	Діапазон шуму	Поріг	Точки підгонки
FAM	~1.1 - 8.0	~3.5 - 15.5	~ 4
YY	~0.7 - 2.0	~1.5 - 3.5	~ 3 - 4
Cy5	~ 0.5 - 1.4	~1.0 - 3.5	~ 4 - 5

- 7500 Fast: FAM: 0.15 - 0.23; YY: 0.03 - 0.05; Cy5: 0.03 - 0.07
- Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000/6000/Q: FAM: 0.02 - 0.04; YY: 0.01 - 0.04; Cy5: 0.02 - 0.05
- RealLine Cyclus 48/96: FAM: ~500; Cy5: ~700
- QuantStudio 5: FAM: ~250.000; YY: ~70.000; Cy5: ~110.000

Критеріями для перевірки прогону є нахил і значення R<sup>2</sup> стандартної кривої (див. Таблицю 16). Діапазони очікуваних значень Ct стандартів відносяться до власних валідаційних даних і повинні використовуватися як рекомендації для встановлення порогових значень (див. Таблиці 17-19).

Якщо нахил та/або R<sup>2</sup> 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 виведено жодне право на гарантію на весь продукт.

Таблиця 16: Критерії перевірки запуску

Параметр	qTOWER 2 & 3, CFX96, LightCycler <sup>®</sup> 480, 7500 Fast, Rotor-Gene <sup>®</sup> 3000/6000/Q, RealLine Cyclus 48 / 96, QuantStudio 5
Діапазон нахилу	-3.10 до -3.60
Коефіцієнт лінійної регресії (R <sup>2</sup> ) референсної кривої має становити від 0.98 до 1.00 (не застосовується до аналізу LightCycler <sup>®</sup> 480).	
Очікувані значення Ct для IC стандартів кількісної оцінки (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)	
YY/VIC/JOE	≤ 40
Cy5	≤ 38
Очікувані значення Ct для IC у HCV-негативних зразках пацієнтів та HCV-позитивних зразках (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)	
YY/VIC/JOE	≤ 40
Cy5	≤ 38

Таблиця 17: Керівні значення Ct стандартів кількісної оцінки на qTOWER 2 і 3, LightCycler® 480 і CFX 96

HCV/IC STD 1 - 4	Очікуване збільшення між значеннями Ct	qTOWER 2 & 3		LightCycler® 480		CFX96	
		Середнє	Від - до	Середнє	Від - до	Середнє	Від - до
1		16.9	16.1- 17.6	17.7	16.6- 18.8	17.0	16.3- 17.8
2	1 до 2 + ~ 6.64	23.3	22.5- 24.1	24.4	23.2- 25.6	23.7	22.9- 24.4
3	2 до 3 + ~ 6.64	29.7	28.7- 30.6	31.1	29.9- 32.3	30.3	29.5- 31.2
4	3 до 4 + ~ 3.32	33.3	31.8- 34.7	34.6	33.0- 36.2	33.7	32.6- 34.8

Таблиця 18: Керівні значення Ct стандарту кількісної оцінки на 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000/Q

HCV/IC STD 1 - 4	Очікуване збільшення між значеннями Ct	7500 Fast		Rotor-Gene® 3000/6000/Q	
		Середнє	Від - до	Середнє	Від - до
1		16.9	16.2 - 17.6	15.4	14.3 – 16.4
2	1 до 2 + ~ 6.64	23.6	22.9 - 24.4	21.9	20.8 – 23.0
3	2 до 3 + ~ 6.64	30.3	29.5 - 31.2	28.8	26.9 – 30.8
4	3 до 4 + ~ 3.32	33.7	32.5 - 34.9	32.1	30.3 – 34.0

Таблиця 19: Керівні значення Ct для стандартів кількісної оцінки на RealLine Cycler 48/96 і Quant Studio 5

HCV/IC STD 1 - 4	Очікуване збільшення між значеннями Ct	RealLine Cycler 48		RealLine Cycler 96		Quant Studio 5	
		Середнє	Від - до	Середнє	Від - до	Середнє	Від - до
1		15.1	14.4- 15.5	15.4	14.2- 16.2	15.5	14.3- 16.9
2	1 до 2 + ~ 6.64	21.8	21.1- 23.5	22.3	21.0- 22.9	22.4	21.3- 23.9
3	2 до 3 + ~ 6.64	28.3	27.4- 29.0	29.0	27.9- 29.8	29.2	28.1- 30.7
4	3 до 4 + ~ 3.32	31.8	31.4- 32.5	32.4	31.2- 33.4	32.5	31.1- 34.0

## 10 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Проблема/ймовірна причина	Коментарі та пропозиції
<b>Зовсім немає сигналу</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Вимірювання флуоресценції не ввімкнено</li> </ul>	Прочитати посібник користувача пристрою ПЛР у реальному часі.
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Вибрано помилкові канали</li> </ul>	Вибрати канал FAM для РНК HCV і канал YY/VIC/JOE або Cy5 для IC.
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Неправильна програма циклу</li> </ul>	Перевірити налаштування приладу, повторити запуск.
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Неправильне застосування набору</li> </ul>	Почитати інструкцію з використання.
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Умови зберігання не відповідають інструкції, термін придатності набору для виявлення перевищено</li> </ul>	Перевірити умови зберігання та термін придатності.



**Низький сигнал флуоресценції, зафіксований як для цілі, так і для ІС, кількість цільових копій занижена**

- |   |   |
|---|---|
| ▪ Цільова РНК деградована                               | Використовувати витратні матеріали та реагенти без РНКаз, зберігати РНК на льоду. Ознайомитися з інструкцією із застосування набору для екстракції.   |
| ▪ Забруднені оптичні лінзи (Rotor-Gene®)                | Дивитися розділ «Технічне обслуговування» відповідної інструкції для приладу, або чистити лінзи раз на місяць за допомогою абсолютного ізопропанолу та ватних тампонів.                     |
| ▪ Термоблок та/або оптика (96-лунковий блоковий формат) | Дивитися розділ «Технічне обслуговування» інструкції для приладу, альтернативно заповнити кожну лунку ізопропанолом, інкубувати 10 хв при 50 °С (°C), видалити ізопропанол і промити водою. |

**Відсутній або слабкий сигнал для ІС у HCV-негативному зразку РНК**

- |   |  |
|---|--|
| ▪ Неправильна програма циклічності  | Перевірити налаштування приладу, повторити запуск.   |
| ▪ Надлишок інгібіторів у зразку/втрата РНК під час екстракції                                     | Використовувати рекомендований набір для екстракції та чітко дотримуватися інструкцій виробника. |
| ▪ Неправильний матеріал зразка (наприклад, гепаринізована плазма)                                 | Запит на свіжу ЕДТА- або цитратну плазму або сироватку.  |
| ▪ Умови зберігання не відповідають інструкції, термін придатності набору для виявлення перевищено | Перевірити умови зберігання та термін придатності.   |

**Несподівано низькі значення Ct для ІС, особливо з високими стандартами або зразками високого вірусного навантаження**

- |  |   |
|--|---|
| ▪ Перехресні розмови між цільовими та ІС каналами запису (особливо YY/VIC/JOE) | Відкалібрувати прилад за допомогою чистих флуоресцентних барвників або повторити запуск із використанням каналу Су5 для виявлення ІС. |
|--|---|

**Несигмоїдні криві зростання кількісних стандартів, неприпустимо високе відхилення Ct від очікуваних значень**

- |   |   |
|---|---|
| ▪ Часте заморожування/розморожування або неправильне зберігання розчиненої суміші реагентів       | Прочитати інструкцію з використання, перевірити умови зберігання, приготувати нову суміш реагентів. |
| ▪ Умови зберігання не відповідають інструкції, термін придатності набору для виявлення перевищено | Перевірити умови зберігання та термін придатності.  |

**Різна поведінка ампліфікації зразка РНК HCV і стандартів, непаралельні криві росту в експоненційній фазі реакції**











- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ▪ Надлишок інгібіторів у зразку | Використовувати рекомендований набір для екстракції, чітко дотримуватися інструкцій виробника; проконсультуватися з лікуючим лікарем щодо лікування пацієнта. |
| ▪ Неправильний матеріал зразка  | Використовуйте рекомендований тип зразка.   |

**Сигнал FAM для HCV-негативних зразків/записаний NTC**

- |   |  |
|---|--|
| ▪ Зараження РНК HCV або РНК ампліконами | 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](mailto:info@labua.com.ua)



UA.TR.116