

	Јавна здравства установа Болница „Свети Брачеви“ Бијељина Српске војске 53				МИ-10-039
<i>Квантитативна детекција РНК Хепатитис Ц вируса у хуманој плазми Real - Time PCR методом</i>					
Страна 1 од 6	Издање:	Важи од:	Сагласан	Одобрио	Копија број
	2	2025-02-05	Проф. Никола Танић	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Директна молекуларна биолошка детекција ХЦВ РНК ланчаном реакцијом полимеразе реверзне транскриптазе (RT – PCR) сматра се златним стандардом за дијагнозу ХЦВ инфекције.

Комплет ***HCV Real - TM Quant*** је тест амплификације у реалном времену за квантитативно откривање вируса хепатитиса Ц у људској плазми и истовремено откривање интерне контроле (IC) специфичне за ХЦВ помоћу детекције двоструке боје.

Квантитативно тестирање ХЦВ РНК пружа прогностичке информације у вези са вјероватноћом одговора на терапију и игра важну улогу у праћењу антивирусног одговора на лијечење. Трајни виролошки одговор се дефинише као негативан тест на ХЦВ РНК, 6 мјесеци након престанка терапије. Недавне студије сугеришу да је стопа одговора на терапију такође важна. На примјер, конверзија на ХЦВ РНК негативан резултат теста након 4 недјеље терапије представља брз виролошки одговор и снажан је предиктор успјеха лијечења. Пацијенти који нису имали рани виролошки одговор, дефинисан као пад од најмање 2 - log ХЦВ РНК, после 12 недјеља терапије, мало је вјероватно да ће реаговати са додатних 36 недјеља терапије и требало би да прекину терапију.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Комплет ***HCV Real - TM Quant*** је тест у реалном времену за квантитативно откривање вируса хепатитиса Ц у људској плазми. ХЦВ РНК се екстрахује из плазме, амплификује коришћењем амплификације у реалном времену и детектује коришћењем флуоресцентно обилежених проба специфичне за ХЦВ или ХЦВ IC.

IC служи као контрола екстракције и амплификације за сваки појединачно обрађени узорак и за идентификацију могуће инхибиције. IC се детектује у каналу који није ХЦВ РНК. Праћење интензитета флуоресценције током реалног времена омогућава детекцију и квантификацију акумулираног производа без потребе за поновним отварањем реакционих туба након амплификације у реалном времену.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Аналитичка специфичност

Аналитичка специфичност ***HCV Real - TM Quant PCR*** комплекта је обезбјеђена избором специфичних прајмера и проба и строгим реакционим условима. Прајмери и пробе су тестиране на могуће хомологије са свим секвенцама депонованим у банкама гена анализом поређења секвенци, као и са геномском ДНК/РНК сљедећих организама и вируса: вирус хепатитиса А; вирус хепатитиса Б; вирус хепатитиса Д; вирус хумане имунодефицијенције; цитомегаловирус; Епштајн - Бар вирус; вирус херпес симплекса типа 1 и 2; вирус варицела - зостер; хумани херпес вирус типова 6 и 8; парвовирус B19; вирус крпељног енцефалитиса; енцефалитис западног Нила; аденовирус типови 2, 3 и 7; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *S.agalactiae*; и *Homo sapiens*. Унакрсне реакције за горе наведене организме и вирусе нису откривене.

Болница Бијељина	Страна 2 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-039
		2	2025-02-05	

Аналитичка осјетљивост

Комплет **HCV Real - TM Quant** омогућава детекцију ХЦВ ДНК у 100% тестова са осјетљивошћу од 60IU/ml (вриједност добијена коришћењем *Magno Virus - Sacace* комплета, REF K – 2 – 16/1000 почевши од 1ml узорка обим).

4. ВРСТА УЗОРКА

1. Пуна крв сакупљена у ЕДТА треба раздвојити на плазму и ћелијске компоненте центрифугирањем на 800 - 1600xg током 20 минута у року од шест сати. Изолована плазма се мора пренијети у стерилну полипропиленску епрувету. Плазма се може чувати на 2 – 8 °C још 3 дана.
2. Алтернативно, плазма се може чувати на – 8 °C до мјесец дана или 1 годину када се чува на – 70 °C.
3. Не замрзавајте пуну крв.
4. Узорци антикоагулирани хепарином нису погодни за овај тест.
5. Одмрзните смрзнуте узорке на собној температури прије употребе.
6. Пуна крв се мора транспортовати на 2 – 25 °C и обрађивати у року од 6 сати од узимања. Плазма се може транспортовати на 2 – 8 °C или замрзнути.
7. Транспорт клиничких узорака мора бити у складу са државним и локалним прописима за транспорт етиолошких агенаса.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Припрема пацијената се обавља према упутству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 10.2.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

ЕДТА епрувете се могу користити са *HCV Real - TM Quant*. Слиједите упутства произвођача епрувета за узорке.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

- Комплет за изолацију РНК (само реф. *V1 - 100/2FRT*);
- Биолошки кабинет;
- Микроцентрифуга за епрувете типа епендорф (RCF max. 16.000 xg); „*Eppendorf 5415D*“ или еквивалент;
- 60 °C ± 2 °C суви топлотни блок;
- Вортекс;
- Пипетори (капацитета 5 - 40µl; 40 - 200µl; 200 - 1000µl) са аеросол баријером;
- 1,5ml полипропиленске стерилне епрувете (*SARSTEDT, QSP, Eppendorf*);
- Рукавице за једнократну употребу, без пудера;
- Сталци за тубе;
- Контејнер за биолошки отпад;
- 70% етанол (свјеже припремљена мешавина 96% етанола и дестиловане воде);
- Ацетон;
- Фрижидер;
- Замрзивач;
- PCR апарат.

Болница Бијељина	Страна 3 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-039
		2	2025-02-05	

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу се одвија према: УП-10-023: *Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом*; УП-10-138: *Обезбјеђивање и праћење услова радне средине у процесу испитивања*; УП-10-156: *Биосигурност у PCR лабораторији*; УП-10-142: *Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом*.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

При доспјећу узорак у лабораторију додијељује им се уникатни број протокола према упутству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 4.3. Након тога слиједи обрада узорка која подразумијева:

1. ЕКСТАКЦИЈУ ГЕНЕТИЧКОГ МАТЕРИЈАЛА (РНК МОЛЕКУЛА);
2. ПРИПРЕМУ И ПОКРЕТАЊЕ РЕАКЦИЈЕ ЛАНЧАНЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (*RT - PCR*);
3. ИНТЕРПРЕТАЦИЈУ РЕЗУЛТАТА.

ПОСТУПАК ЕКСТРАКЦИЈЕ РНК

Екстракција се обавља у биосигурносном кабинету класе II у просторији за изолацију нуклеинских киселина.

Материјал и опрему намијењене за обраду и рад у просторији за екстракцију користити искључиво на том простору за описане процедуре и не преносити из једне радне просторије у другу.

При раду се обавезно користе дупле једнократне нитрилне рукавице без пудера, које се често дезинфикују или мијењају, нарочито ако дође до просипања течности или када постоји сумња на контаминацију.

Обавезно је ношење мантила (скафандера) који је намијењен само за простор за изолацију нуклеинских киселина.

Зависно од врсте произвођача и начина екстракције, разликују се и протоколи екстракције. Сваки екстракциони протокол/упутство се чува у електронској форми у Регистратору протокола у оригиналном и/или преведеном издању. Скраћене верзије и изводи из наведених упутстава се по потреби чувају на видном мјесту у просторији за екстракцију.

- Непосредно пре екстракције узорке извадити из фрижидера и темперирати на собној температури, припремити пипете, наставке са дуплим филтером за пипете, контејнере за лабораторијски отпад, тубе.
- Након пресицања узорка у адекватно обележене тубе од 2ml, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- Узорак прије изолације мијешати на вортексу, пажљиво отворити, уз мјере личне заштите и у биосигурносном кабинету, те пипетирати око 1,5ml у тубу за чување узорка на -80 °C или -20 °C, а потом слиједити инструкције произвођача екстракционог кита. Овако складиштени узорци се могу чувати годину дана на -20 °C, а на температури од -80 °C и дуже.
- Након пресицања узорка у адекватно обележене тубе, приступа се поступку екстракције према протоколу.

Болница Бијељина	Страна 4 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-039
		2	2025-02-05	

• **Кораци у поступку екстракције су:**

1. лиза ћелија и ослобађање ћелијских елемената,
2. преципитација ослобођених молекула нуклеинских киселина, најчешће алкохолом,
3. испирање и пречишћавање,
4. елуција РНК.

Након последњег корака, тј. елуције РНК, изолована РНК се пребацује у тубе од 1,5ml и уколико се истога дана припрема *Real time PCR* реакција, чува се у фрижидеру до момента спајања узорка са мастер миксом, а у супротном се одлаже у замрзивач на -20 °C до постављања *PCR* реакције.

- После рада очистити биосигурносни кабинет и кориштену опрему 1% натријум хипохлоритом потом 70% алкохолом или дестилованом водом и укључити УВ лампу. Спремити реагенсе и прибор за следећу употребу.

Може се користити било који комерцијални комплет (кит) за екстракцију РНК/ДНК, ако је *IVD - CE* валидиран за типове узорака који су одвије наведени у параграфу „СКУПЉАЊЕ, СКЛАДИШТЕЊЕ И ТРАНСПОРТ УЗОРАКА“.

Препоручују се следећи комплекти за екстракцију:

- *DNK/RNK - Prep* (Sacace, REF K-2-9);
- *Ribo - Sorb* (Sacace, REF K-2-1);
- *Magno virus* (Sacace, REF K-2-16/1000);
- *Ribo Virus* - комплет за екстракцију спин колоне (Sacace, REF K-2 - C);
- *SaMag* комплет за екстракцију вирусних нуклеинских киселина (Sacace, REF SM003).

Екстракција РНК се изводи према упутствима произвођача.

Припрема и покретање реакције ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*)

Провјерити да ли су сви неопходни уређаји и опрема одговарајући, калибрисани и функционални прије почетка рада. Ради добијања што прецизнијег резултата (да би се избјегла контаминација и добијање лажно позитивних резултата или потенцијална инхибиција) пожељно је поступке припреме реакције радити у одвојеним просторијама и придржавати се одређених мјера опреза:

- Носити чист мантил и рукавице приликом припреме узорака за *PCR* амплификацију (који нису ношени током руковања амплификованим *PCR* производима или током припреме узорка).
- Сви наставци за пипете и тубе за центрифугу морају бити ослобођени ДНаза и РНаза.
- Мастер микс припремати искључиво у просторији са том намјеном.
- Све компоненте *PCR* реакције одмрзнути (осим уколико произвођач не нагласи другачије) и вортексовати благо ради обезбјеђивања равномјерне дистрибуције свих.
- Кратким центрифугирањем спустите течност на дно тубе.
- Израчунати број реакција за тестирање и налити реагенсе по упутству произвођача (обухвата негативну контролу, позитивну контролу и узорке који се тестирају). Препорука је да се припреми мастер микс за још 2 додатне реакције да би се компензовале грешке у пипетирању.
- Припремити стрипове за *PCR* од 8 тубица сходно броју реакција.
- Уколико се као негативна контрола користи dH₂O, она се додаје одмах по разливању мастер микса, прије него што се пренесе у просторију за додавање узорака и

Болница Бијељина	Страна 5 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-039
		2	2025-02-05	

позитивних контрола. У случају да се негативна контрола екстрахује паралелно са узорцима, тада се и она додаје у просторији за спајање узорака са мастер миксом.

- Припремљени мастер микс се кроз прозор преноси у просторију за спајање са узорцима.
- Сва опрема и реагенси који се употребљавају у просторији за мастер микс треба да остану у њој и да се не премјештају или користе у другим просторијама. Након припреме треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Спајање узорака са мастермиксом

У просторији за спајање узорака са мастер миксом потребно је такође користити све мјере опреза већ раније поменуте. Неопходно је пажљиво отворати и затварати тубице са узорцима и избјегавати прскање. Узорци се све вријеме држе на апарату за мјешање на температури од 4 - 8 °C (*ThermoMixer C*).

Реагенси и све компоненте неопходне за рад треба што је могуће дуже држати затворенима/поклопљенима како би се спријечила контаминација или инхибиција.

Када се додају сви узорци потребно је провјерити да ли су сви стрипови добро затворени, обиљежени и још једном их ставити на центрифугу како би садржај равномерно пао на дно био и спреман за *PCR* апарат.

Такође, сва опрема која се употребљава у просторији за спајање узорака треба да остане у њој и да се не премјешта или користи у другим просторијама. Након завршеног рада треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Покретање *PCR* апарата:

- Укључити апарат за *PCR* и програмирати га унапријед (према препорукама произвођача кита и упутству за руковање апаратом *Quant Studio 5*).
- Након тога покренути *PCR* реакцију. Поставке реакције (термални профил, читавање флуоресценције) претходно извршити према упутствима произвођача датог кита.
- Никад не отворати амплификоване *PCR* продукте.
- По завршетку реакције, не отворати реакционе тубе стрипове), да не би дошло до контаминације, и одбацити их у складу са локалним препорукама и прописима.
- За прецизније инструкције за поставку *PCR* реакције погледати оригинално упутство произвођача датог кита. Сва упутства се чувају у лабораторији у оригиналном и/или преведеном издању.

Податке о реакцији ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*) уносимо у образац ОБ-10-146: *Радна листа пи - си - ар дијагностике*.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Дефинисана количина интерне контроле (*IC*) се уноси у сваки узорак и контроле квалитета на почетку поступка припреме узорка како би се контролисао процес екстракције сваког појединачног узорка и идентификовала могућа инхибиција реакције.

Негативна контрола екстракције (*NCE*), негативна контрола амплификације (*NCA*), позитивна контрола екстракције (*C+*), позитивна контрола амплификације (*QS1/QS2 HCV*) су потребне за сваку радњу да би се потврдило да су припрема узорка, амплификација и кораци детекције изведени исправно.

Ако су контроле квалитета ван свог очекиваног опсега (из табеле Резултати за контроле), сви узорци и контроле из те реакције морају бити обрађени почевши од корака припреме узорка.

Болница Бијељина	Страна 6 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-039
		2	2025-02-05	

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Није примјењиво.

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

На основу амплификације стандарда за квантификацију и узорака, примјењује се формула:

$$\frac{\text{ХЦВ ДНК копија по PCR узорку}}{\text{IC cDNK по PCR узорку}} \times \text{коэффициент А} \times \text{коэффициент Б} = \text{IU/ml у плазми}$$

$$\text{Коефицијент А} = \frac{100}{\text{Волумен екстракције, } \mu\text{l}}$$

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Сваки позитиван резултат је клинички значајан, за постављање дијагнозе или праћење ефикасности терапије.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати се издају на 3 - 21 дан.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорак се разблажује за ред величине (10x, 100x...) и понавља анализа, са тим што се крајњи резултат множи са разблажењем.

17. АЛАРМАНТНЕ / КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Сваки позитиван резултат је клинички значајан.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Није примјењиво.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Оригинално упутство произвођача *HCV Real-TM Quant, Sacace Biotechnologies*.

Оригинално упутство за руковање *Quant Studio 5 PCR* апарат.

Оригинални научни радови који се баве тематиком *Real Time PCR* - а (Bustin et al, Vondesample et al...).