

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных
полиморфизмов гена интерлейкина 28В
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
с детекцией кривых плавления
«РеалБест-Генетика Интерлейкин 28В»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов гена интерлейкина 28В методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с детекцией кривых плавления (РеалБест-Генетика Интерлейкин 28В)» предназначен для дифференциального определения однонуклеотидных полиморфизмов rs12979860 C/T и rs8099917 T/G гена интерлейкина 28В (*IL28B*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с плавлением продуктов гибридизации с флуоресцентной меткой и анализом кривых плавления.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующим амплификатором «CFX96» (фирма Bio-Rad, США).

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип метода основан на амплификации выбранного участка ДНК человека и последующей детекции кривых плавления гибридных комплексов продуктов ПЦР и специфичных зондов. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

После реакции амплификации понижение температуры приводит к гибридизации специфичного ДНК-зонда с продуктом амплификации и к снижению уровня флуоресцентного сигнала в пробирке. В процессе температурного плавления образовавшихся дуплексов происходит высвобождение ДНК-зонда, несущего флуоресцентный краситель. В случае неполной комплементарности ДНК-зонда и выбранного участка ДНК, температура плавления дуплекса будет ниже, чем в случае полной комплементарности. Таким образом, для двух аллельных вариантов температуры плавления дуплексов зонда и продуктов амплификации отличаются, благодаря этому идентифицируется генотип по каждому из определяемых полиморфизмов.

Определение однонуклеотидных полиморфизмов rs12979860 C/T и rs8099917 T/G гена *IL28B* у пациентов, инфицированных 1 генотипом вируса гепатита С, имеет прогностическое значение при выборе тактики лечения и прогнозировании исхода заболевания.

Генотип rs12979860 C/C повышает вероятность положительного ответа при лечении «Интерфероном» и «Рибавирином», а также повышает вероятность спонтанной элиминации вируса.

Генотип rs8099917 T/T повышает вероятность спонтанной элиминации вируса, независимо от лечения. Генотип rs8099917 G/G повышает риск низкого ответа при лечении пегилированным «Интерфероном» и «Рибавирином».

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- контрольный образец «Нормальная гомозигота» (КО1) – 1 пробирка, 1 мл;
- контрольный образец «Мутантная гомозигота» (КО2) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- элюирующий раствор «Генетика» – 2 флакона по 12 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность определения однонуклеотидных полиморфизмов rs12979860 C/T и rs8099917 T/G гена *IL28B* человека определяется по стандартному образцу предприятия, СОП 05-2-565, как процентное содержание правильно определенных генотипов в образцах №1 и №2 СОП ДНК Интерлейкин 28В и составляет 100%.

3.2. Контрольный образец КО1 должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота» по полиморфизмам rs12979860 C/T и rs8099917 T/G.

3.3. Контрольный образец КО2 должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота» по полиморфизмам rs12979860 C/T и rs8099917 T/G.

3.4. Диагностическая специфичность определения однонуклеотидных полиморфизмов rs12979860 C/T и rs8099917 T/G гена интерлейкина 28В (*IL28B*): клинические испытания, проведенные на 211 образцах, показали 100% специфичность (интервал 98,6 % - 100 %, с достоверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые класси-

фицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- мини-шейкер PSU-2T (фирма «BioSan», Латвия);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и при температуре 65 оС (Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия)
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- отсасыватель медицинский В-40 (фирма «Висма-Планар», Беларусь);
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл (фирма «SSI», США, кат. № 2340);
- магнитный штатив для пробирок (фирма ЗАО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического мате-

риала с помощью наборов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Внимание! Выделение ДНК из образцов проводить без добавления внутреннего контрольного образца (ВКО).

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать КО1 и КО2, которые являются компонентами данного набора. КО1 и КО2 проходят процедуру выделения ДНК аналогично положительному контрольному образцу (см. инструкцию набора для выделения).

Внимание! Элюцию ДНК проводить с использованием 200 мкл элюирующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Затем добавить 400 мкл элюирующего раствора «Генетика», который является компонентом данного набора. Тщательно перемешать с помощью встряхивателя для пробирок. Центрифугировать в микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 минуту.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 КО1 и 1 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

ГРС после первого вскрытия упаковки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

КО1 и КО2 после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Плотнo заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой

вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК человека и регистрации кривых плавления. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов

(94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

4 стадия: «кривая плавления» от 27 °C до 75 °C с шагом 1 °C в течение 5 секунд (измерение флуоресценции проводить на каждом шаге);

5 стадия: 10 °C – 1 минута.

7.6. Выбрать каналы детекции кривых плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидных полиморфизмов:

«ROX» – регистрация rs12979860 C/T;

«FAM» – регистрация rs8099917 T/G.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

Для КО1 в каналах детекции «ROX» и «FAM» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Нормальная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. КО1 должен определяться как генотип «Нормальная гомозигота» по полиморфизмам rs12979860 C/T и rs8099917 T/G.

Для КО2 в каналах детекции «ROX» и «FAM» должно фиксироваться наличие одного пика плавления, соответствующего генотипу «Мутантная гомозигота», и определяться значение температуры плавления. КО2 должен определяться как генотип «Мутантная гомозигота» по полиморфизмам rs12979860 C/T и rs8099917 T/G.

Внимание! Температуры плавления продуктов гибридизации могут отличаться не более чем на 2 °C от значений, полученных для КО1 и КО2.

8.2. Анализ результатов определения однонуклеотидных полиморфизмов гена *IL28B*.

8.2.1. Для каждого исследуемого образца в каналах детекции «ROX» и «FAM» должны

фиксироваться один (в случае гомозиготного носительства) или два (в случае гетерозиготного носительства) пика плавления и определяться их температуры.

По каналу «ROX» фиксируются кривые плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидного полиморфизма rs12979860 C/T.

По каналу «FAM» фиксируются кривые плавления дуплексов специфичного зонда и продукта амплификации для регистрации однонуклеотидного полиморфизма rs8099917 T/G.

8.2.2. Для каждого образца определить генотип по полиморфизмам rs12979860 C/T и rs8099917 T/G в соответствии с полученными температурами пиков плавления для КО1 и КО2.

8.3. Результат генотипирования считается сомнительным, если температура плавления продуктов гибридизации отличается более чем на 2 °С от значений, полученных для КО1 и КО2. Сомнительные результаты не подлежат анализу и учёту. В случае сомнительного результата необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК или забора материала.

8.4. Диагностическая значимость определения однонуклеотидных полиморфизмов rs12979860 C/T и rs8099917 T/G гена интерлейкина 28В описана в литературе:

Luo Y., Jin C., Ling Z. et al. Association study of IL28B: rs12979860 and rs8099917 polymorphisms with SVR in patients infected with chronic HCV genotype 1 to PEG-INF/RBV therapy using systematic meta-analysis // Gene. 2013. Vol. 513. P. 292–296.

O'Brien T.R., Everhart J.E., Morgan T.R. et al. An IL28B genotype-based clinical prediction model for treatment of chronic hepatitis C // PLoS One. 2011. Vol. 6. P. 1–9.

Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study // Gastroenterology. 2010. Vol. 138. P. 1338–1345.

Симанкова Т.В., Гармаш И.В., Аришева О.С. и др. Полиморфизм гена ИЛ-28В как предиктор ответа на противовирусную терапию хронического гепатита С // Клиническая фармакология и терапия. 2012. Т. 21. № 1. С. 1–6.

Мицура В.М., Воропаев Е.В., Осипкина О.В. и др. Полиморфизм генов интерлейкина-28b и клиническое значение его выявления у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. // Лабораторная диагностика. 2012. № 2. С. 86-97.

Акимов И.А., Прасолова М.А., Иванов М.К. Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов в гене IL28B, методом ПЦР с анализом кривых плавления // Поли-клиника. 2015. №2-1. С. 28-31.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика Интерлейкин 28В», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
ЗАО «Вектор-Бест»


А.В. Трухина

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»


В.К. Ткачев

Генеральный директор
ООО «Независимая лаборатория
ИНВИТРО»
м.п.


С.В. Амбросов



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров

ООО "Независимая лаборатория ИНВИТРО"

Годунов Р.С.

2016 г.

