

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК и дифференциации генотипов 1/2/3 вируса гепатита С

методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВГС – 1/2/3»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГС – 1/2/3» предназначен для выявления РНК и дифференциации генотипов 1,2,3 вируса гепатита С (ВГС) в сыворотке или плазме крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГС – 1/2/3» может быть применен в клинической практике для выявления РНК и определения генотипа вируса гепатита С.

Набор предназначен для применения с приборами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия); «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия) или их аналогами.

Выделение РНК из клинического материала проводится с помощью наборов: «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» или «РеалБест экстракция 1000».

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного фрагмента РНК и последующей амплификации кДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Анализ каждого образца проводится в отдельной пробирке, в которой содержится лиофилизованная готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС).

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

Определение генотипа РНК ВГС обеспечено независимой детекцией фрагментов генома ВГС, соответствующих различным генотипам, за счёт флуорогенных генотипспецифичных зондов, детектируемых в разных каналах (см. таблицу). Для подтверждения наличия РНК ВГС в анализируемой пробе в достаточном для генотипирования количестве амплификация кДНК ВГС дополнительно регистрируется в этой же пробирке за счёт расщепления флуорогенного зонда, соответствующего любому варианту ВГС (независимо от генотипа), и регистрируемого в канале CY5. Для контроля работы ГРС в каждой постановке применяется комплексный положительный контрольный образец (ПКО), содержащий РНК ВГС генотипов 1b, 2a, 3a.

2. Состав набора:

- Комплексный положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная, для определения генотипов 1/2/3 РНК ВГС – 48 пробирок.
- Раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон (4,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность.

Набор позволяет определять генотип ВГС при концентрациях РНК не менее 400 МЕ/мл при выделении РНК из 1,0 мл пробы.

3.2. Специфичность.

Набор выявляет вирус гепатита С генотипов 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6 независимо от субтипа, и определяет генотипы 1 (1a, 1b), 2 (2a, 2b, 2c, 2i), 3 (3a, 3b). В образцах, не содержащих РНК ВГС, результат анализа гарантированно (в 100% образцов) должен быть отрицательным.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (ГОСТ Р 51609-2000).

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 РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

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

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток 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 пипеток.

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

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов 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»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия); «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов

Подготовить образцы для исследования и контрольные образцы (1 ОКО и 1 ПКО) с помощью наборов для выделения НК «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом набора для постановки ОТ-ПЦР и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения НК.

6.2. Подготовка компонентов набора

6.2.1. Перед началом подготовки проб во флакон с положительным контрольным образцом (ПКО) добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

6.2.2. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут.

6.2.3. Вскрыть упаковку, подготовить необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

7.3. В каждую пробирку с ГРС пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК.

7.4. Закрыть пробирки.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента РНК ВГС и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:
для амплификаторов «iQ/iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ96»:

1 стадия: 45°C – 30 мин;

2 стадия: 94°C – 1 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°C – 10 сек, 60°C – 20 сек);

для амплификаторов Rotor-Gene 3000/6000:

1 стадия: 45°C – 30 мин;

2 стадия: 94°C – 1 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°C – 10 сек, 60°C – 40 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.8. Для всех образцов задать измерение флуоресценции по 4 каналам в соответствии с таблицей в зависимости от используемого амплификатора.

Таблица.

	«iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96»	«Rotor-Gene 3000(6000)»
генотип 1	HEX	JOE(Yellow)
генотип 2	FAM	FAM(Green)
генотип 3	ROX	ROX(Orange)
Все генотипы	Cy5	Cy5(Red)

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительными и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому амплификатору.

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика», программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов выполняется в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Общие условия анализа и учёта результатов.

9.1.1. В положительном контрольном образце программа должна фиксировать нарастание специфического сигнала амплификации кДНК ВГС во всех каналах: «HEX» (генотип 1), «FAM» (генотип 2), «ROX» (генотип 3), «Cy5» (все генотипы ВГС) и определять значение порогового цикла Ct ВГС.

9.1.2. Результаты индивидуальной постановки ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение C_t в каналах «FAM», «HEX», «ROX» и «Cy5» не превышает значений, указанных во вкладыше в наборы данной серии.

9.1.3. В отрицательном контрольном образце программа не должна фиксировать нарастания специфического сигнала амплификации кДНК ВГС в каналах «FAM», «HEX», «ROX» и «Cy5».

9.1.4. Если для ОКО значение C_t в любом из каналов «FAM», «ROX», «HEX» или «Cy5» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации. В этом случае все положительные результаты данной индивидуальной постановки ОТ-ПЦР по этому каналу следует считать недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получены значения C_t менее 40 по соответствующему каналу. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.2. Определение генотипа ВГС.

9.2.1. Анализируемый образец содержит ВГС генотипа 1, если значения C_t в каналах «HEX» и «Cy5» меньше или равны 40.

9.2.2. Анализируемый образец содержит ВГС генотипа 2, если значения C_t в каналах «FAM» и «Cy5» меньше или равны 40.

9.2.3. Анализируемый образец содержит ВГС генотипа 3, если значения C_t в каналах «ROX» и «Cy5» меньше или равны 40.

9.2.4. Анализируемый образец содержит РНК ВГС генотипа, отличного от 1 (*1a*, *1b*), 2 (*2a*, *2b*, *2c*, *2i*), 3 (*3a*, *3b*), если получен положительный результат амплификации в канале «Cy5» и не регистрируется значение C_t менее или равное 40 в каком-либо из каналов: «FAM», «ROX» или «HEX».

9.2.5. Если концентрация РНК ВГС в анализируемом образце менее 400 МЕ/мл, чувствительность набора может оказаться недостаточной для установления генотипа ВГС. Концентрацию РНК в образце можно определить с помощью наборов реагентов «РеалБест РНК ВГС» и «РеалБест ВГС ПЦР».

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

Начальник отделения
ЗАО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Ректор ГОУ ВПО
НГМУ Росздрава

