

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от \_\_\_\_\_ 201\_\_ г. № \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов  
сентября 2012 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для дифференциального выявления ДНК вируса гепатита В, РНК вируса гепатита С и РНК вирусов иммунодефицита человека 1 и 2 типов методом ПЦР/ОТ-ПЦР в режиме реального времени  
**«РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ ПЦР»**

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ ПЦР» предназначен для дифференциального выявления ДНК вируса гепатита В (ВГВ), РНК вируса гепатита С (ВГС) и РНК вирусов иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на амплификации фрагмента ДНК или кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК) в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Выделение нуклеиновых кислот из сыворотки (плазмы) крови проводится с помощью наборов: «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «РеалБест экстракция 1000», «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### 2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента ДНК или кДНК (полученной методом обратной транскрипции из

---

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

РНК), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Дифференциальное выявление вирусных инфекций обеспечено независимой детекцией фрагментов генома вирусов гепатита В и С (в ГРС-1) и фрагментов генома вирусов иммунодефицита человека, соответствующих типам 1 и 2 (в ГРС-2), за счёт флуорогенных специфичных зондов, детектируемых в разных каналах.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в положительном контрольном образце (ПКО), который подвергается процедуре выделения НК вместе с анализируемыми биопробами.

Учёт эффективности выделения НК из образцов обеспечивается выделением нуклеиновых кислот из клинических проб совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО).

## 2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО), содержащий ДНК ВГВ, РНК ВГС, РНК ВИЧ-1, РНК ВИЧ-2, лиофилизированный – 1 флакон;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон, 4 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР/ОТ-ПЦР №1 (ГРС-1), лиофилизированная, для дифференциального выявления ДНК ВГВ и РНК ВГС – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);
- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР №2 (ГРС-2), лиофилизированная, для дифференциального выявления РНК ВИЧ-1 и РНК ВИЧ-2 – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- завинчивающейся крышкой для флакона с ПКО – 1 шт;
- плёнкой оптической – 1,5 листа.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления ДНК ВГВ и РНК ВГС определяется по образцам, не содержащим ДНК ВГВ и РНК ВГС, но содержащим РНК ВИЧ-1 и РНК ВИЧ-2. Специфичность составляет 100 % при условии, что все приготовленные образцы выявляются как отрицательные.

3.2. Специфичность выявления РНК ВИЧ-1 и РНК ВИЧ-2 определяется по образцам, не содержащим РНК ВИЧ-1 и РНК ВИЧ-2, но содержащим ДНК ВГВ и РНК ВГС. Специфичность составляет 100 % при условии, что все приготовленные образцы выявляются как отрицательные.

3.3. Чувствительность выявления ДНК ВГВ и РНК ВГС определяется по пяти образцам, содержащим ДНК ВГВ (10 МЕ/мл) и РНК ВГС (15 МЕ/мл), приготовленным из соответствующих СОП ДНК ВГВ (рег. № 05-2-211) и СОП РНК ВГС (рег. № 05-2-212). Чувствительность составляет 100% при условии, что все приготовленные образцы определяются как положительные.

3.4. Чувствительность выявления РНК ВИЧ-1 и РНК ВИЧ-2 определяется по пяти образцам, содержащим РНК ВИЧ-1 (30 МЕ/мл) и РНК ВИЧ-2 (50 МЕ/мл), приготовленным из соответствующих СОП РНК ВИЧ (рег. № 05-2-213) и СОП РНК ВИЧ-2 (рег. № 05-2-465). Чувствительность составляет 100% при условии, что все приготовленные образцы определяются как положительные.

#### 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 ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих 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 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 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-287-113-00 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»);

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 неопре-  
новые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

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

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

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

магнитный штатив для пробирок (ЗАО «Вектор-Бест» или аналогичный);

нож канцелярский.

## 6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Для проведения анализа используются образцы сыворотки (плазмы) крови, из кото-  
рых предварительно выделяют НК с помощью одного из наборов: «РеалБест экстракция  
100», «РеалБест экстракция 1000», «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» согласно инструк-  
циям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения НК, должна содержать  
положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом данного набо-  
ра, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора  
для выделения НК.

### 6.2. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, выдержать ГРС и дру-  
гие компоненты набора в упаковке (не вскрывая) при температуре (18-25) °С в течение 30  
мин.

Вскрыть упаковку с готовыми реакционными смесями для ПЦР/ОТ-ПЦР (ГРС-1 и  
ГРС-2), аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по  
числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС-1 и столь-  
ко же с ГРС-2. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой. Оставшиеся

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

### 6.3. Подготовка ПКО к процедуре выделения НК.

Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышки и пробки поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать.

После восстановления хранить при температуре (2-8) °С не более 1 мес.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Проведение анализа

Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

7.1.1. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли)* пробирок с ГРС-1 пронумеровать и расположить в штативе.

7.1.2. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли)* пробирок с ГРС-2 пронумеровать и расположить в штативе.

**Внимание!** Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.1.3. В каждую пробирку с ГРС-1 и ГРС-2 пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной НК *(из пробирок, установленных в магнитный штатив)*. Не захватывать частицы сорбента!

7.1.4. Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.1.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.1.6. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции с последующей амплификацией специфических фрагментов ДНК ВГВ, кДНК ВГС, кДНК ВИЧ-1, кДНК ВИЧ-2 и кДНК ВКО и детекции флуоресцентных сигналов.

При проведении анализа с помощью амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» («BioRad», США) и программы «РеалБест Диагностика» (ЗАО «Вектор-Бест», поставляется по запросу) запустить реакцию амплификации в соответствии с инструкцией (Справка/Инструкция по работе с программой). При проведении анализа с помощью других приборов программирование амплификатора проводить в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией и п. 7.1.7. – 7.1.9.

7.1.7. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

1 стадия: 45°C – 30 мин;

2 стадия: 94°C – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

Примечание: для амплификации фрагмента ДНК ВГВ подходит протокол, содержащий предварительную стадию обратной транскрипции.

7.1.8. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВКО и в ГРС-1, и в ГРС-2 применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ВГВ в ГРС-1 и фрагмента кДНК ВИЧ-1 в ГРС-2 применены гибридизационные ДНК-зонды, меченные флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВГС в ГРС-1 и фрагмента кДНК ВИЧ-2 в ГРС-2 применены гибридизационные ДНК-зонды, меченные флуорофором HEX. Для детекции следует выбирать канал детекции «HEX».

7.1.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

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

## **8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

При применении набора «РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ ПЦР» с амплификатором «iQ5 iCycler» и «CFX96» («Bio-Rad», США) с программой «РеалБест Диагностика» программа проводит все операции по анализу результатов. Также программа отмечает образцы, анализ которых признан недействительным.

При использовании других приборов-амплификаторов анализ и учёт результатов проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

## **9. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

9.1. Условия анализа результатов.

9.1.1. В ПКО должно фиксироваться:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВГВ (ГРС-1, канал «ROX») и определяться значение порогового цикла Ct ВГВ;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГС (ГРС-1, канал «HEX») и определяться значение порогового цикла Ct ВГС;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВИЧ-1 (ГРС-2, канал «ROX») и определяться значение порогового цикла Ct ВИЧ-1;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВИЧ-2 (ГРС-2, канал «HEX») и определяться значение порогового цикла Ct ВИЧ-2;

– нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (ГРС-1, ГРС-2, канал «FAM») и определяться значение порогового цикла  $C_t$  ВКО.

9.1.2. В ОКО должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО и определяться  $C_t$  ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфических продуктов амплификации ДНК ВГВ, кДНК ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2. Если для ОКО значение  $C_t$  хотя бы для одного из возбудителей инфекции меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.2.7.

9.1.3. В каждом исследуемом образце должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО (канал «FAM») и определяться  $C_t$  ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение  $C_t$  ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40.

## 9.2. Учёт результатов.

9.2.1. Вычислить для каждой ГРС ( $C_t$  ВКО)<sub>ср</sub> как среднее значение  $C_t$  ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения  $C_t$  ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения ( $C_t$  ВКО)<sub>ср</sub>.

9.2.2. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ВГВ, РНК ВГС, ВИЧ-1, ВИЧ-2), если для этого образца значение  $C_t$  в ГРС-1 и в ГРС-2 по каналам «ROX» и «HEX» больше 40 или не определяется. Если для такого образца значение  $C_t$  ВКО отличается от значения ( $C_t$  ВКО)<sub>ср</sub> более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. В случае повторения результата следует провести повторный забор образца крови и снова повторить анализ.

9.2.3. Анализируемый образец считается положительным по ВГВ (содержащим ДНК ВГВ), если для этого образца значение  $C_t$  в ГРС-1 по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.2.4. Анализируемый образец считается положительным по ВГС (содержащим РНК ВГС), если для этого образца значение  $C_t$  в ГРС-1 по каналу «HEX» меньше или равно 40.

9.2.5. Анализируемый образец считается положительным по ВИЧ-1 (содержащим РНК ВИЧ-1), если для этого образца значение  $C_t$  в ГРС-2 по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.2.6. Анализируемый образец считается положительным по ВИЧ-2 (содержащим ДНК ВГВ), если для этого образца значение  $C_t$  в ГРС-2 по каналу «HEX» меньше или равно 40.

9.2.7. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

