

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК
вируса гепатита В методом ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест ВГВ ПЦР»

(вариант 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В методом ПЦР в режиме реального времени (РеалБест ВГВ ПЦР)» (вариант 2) предназначен для выявления ДНК вируса гепатита В (ВГВ) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на амплификации фрагмента ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов может быть применён как для высокочувствительного скринирования донорской крови (тестирование индивидуальных образцов и минипулов), так и в клинической практике для диагностики гепатита В.

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

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

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная дена-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором

электронная копия оформлена центром испытаний и регистрации медицинских изделий Т.И. Р.К. нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

турация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной ДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5'-конца, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством ДНК в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в слабом положительном контрольном образце, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок);
- слабый положительный контрольный образец (СПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон, 4 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа;
- завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с СПКО – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Специфичность выявления ДНК вируса гепатита В определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, СПП ОКС (рег. № 05-2-214), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

2. Чувствительность определяется по четырём образцам с концентрацией ДНК ВГВ 5 МЕ в объёме выделяемой пробы, приготовленным из стандартного образца предприятия,

СОП ДНК ВГВ (рег. № 05-2-211), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 206 положительных образцах сывороток и плазм крови от 181 больного гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

4. Диагностическая специфичность выявления ДНК вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 210 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 185 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты) показали 100 % специфичность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (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 дезинфи-

дирующими 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 классифицируются 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 с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:
«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, Россия)
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- 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 (60-90) °С (например, 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 проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА. Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из образцов сыворотки (плазмы) крови с помощью наборов для выделения нуклеиновых кислот (НК): «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «РеалБест экстракция 1000» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать СПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения НК.

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

6.2. Подготовка реагентов.

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

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет при температуре хранения (2-8) °C 3 месяца.

6.2.2. Вскрыть флакон с СПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятую крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1мл РВК, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при комнатной температуре 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

СПКО после разведения хранить при температуре (2-8) °C не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °C 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 (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы сорбента!

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК ВГВ и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать канал детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК ВГВ:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВГВ следует выбрать канал детекции «ROX».

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, СПКО и ОКО 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. В СПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВГВ (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ВГВ.

8.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать

нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

8.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО.

8.4. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

8.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВГВ, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.6. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

8.7. Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в 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, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

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 ВГВ ПЦР», 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

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.
Зав. лабораторией "СПИД" ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

"23" мая Кудрявцева Е.Н.
2016 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК
вируса гепатита В методом ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест ВГВ ПЦР»

(вариант 1/количественный)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В методом ПЦР в режиме реального времени (РеалБест ВГВ ПЦР)» (вариант 1/количественный) предназначен для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (ВГВ) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на амплификации фрагмента ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов может быть применён как для высокочувствительного скринирования донорской крови (тестирование индивидуальных образцов и минипулов), так и в клинической практике для диагностики гепатита В, определения вирусной нагрузки и оценки эффективности противовирусной терапии.

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

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

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной ДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5'-конца, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством ДНК в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в положительном контрольном и слабом положительном контрольном образцах, которые подвергаются процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок);
- слабый положительный контрольный образец (СПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 2 флакона;
- калибровочный образец 1 (КО1), лиофилизированный – 1 флакон;
- калибровочный образец 2 (КО2), лиофилизированный – 1 флакон;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 флакона по 4 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа;
- завинчивающиеся пластиковые крышки для флаконов с контрольными и калибровочными образцами – 5 шт.;
- вкладыш с информацией о концентрациях ДНК ВГВ в КО1, КО2 и ПК0 – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диапазон определяемых концентраций (область линейности): от 100 МЕ до 10^8 МЕ ДНК ВГВ в объёме выделяемой пробы.

1. Специфичность выявления ДНК вируса гепатита В определяется по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, СПП ОКС (рег. № 05-2-214), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

2. Чувствительность определяется по четырём образцам с концентрацией ДНК ВГВ 5 МЕ в объёме выделяемой пробы, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП ДНК ВГВ (рег. № 05-2-211), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3. Коэффициент вариации (К.В. в %) вычисляют для значений логарифма концентрации ДНК вируса гепатита В в образцах СОП. Коэффициент вариации не превышает 10%.

4. Тест на «линейность» – характеризует совпадение (в %) измеренного значения и предписанного значения (вычисленного с учётом фактора разведения) логарифма концентрации ДНК ВГВ в образце, приготовленном разведением из калибровочного образца КО1. Значение «линейности» находится в пределах 90-110%.

5. Диагностическая чувствительность выявления ДНК вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 206 положительных образцах сывороток и плазм крови от 181 больного гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

6. Диагностическая специфичность выявления ДНК вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 210 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 185 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты) показали 100 % специфичность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (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 классифицируются 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 с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «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, Россия»);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- 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);
- термощейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и при температуре (60-90) °С (например, 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 проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА. Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из образцов сыворотки (плазмы) крови с помощью наборов для выделения нуклеиновых кислот (НК): «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «РеалБест экстракция 1000» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО в трёх повторах, СПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения НК.

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

Внимание! в случае необходимости валидации аналитической системы в исследование должны быть также включены КО1 и КО2, в трех повторах каждый (см. Приложение 2).

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС, ПКО, СПКО (при необходимости КО1, КО2), в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку с ГРС, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО, 1 СПКО, 3 ПКО; при необходимости дополнительно 3 КО1 и 3 КО2) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! 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 при температуре хранения (2-8) °С 3 месяца.

6.2.2. Вскрыть флаконы с ПКО, СПКО (КО1, КО2) удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятую крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1 мл РВК, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при комнатной температуре 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

ПКО, СПКО, КО1, КО2 после разведения 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 (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы сорбента!

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических

фрагментов ДНК ВКО, ДНК ВГВ и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

- 1 стадия: 50 °C – 2 минуты;
- 2 стадия: 94 °C – 1 минута;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК ВГВ:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВГВ следует выбрать канал детекции «ROX».

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

8.1.1. В ПКО и СПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВГВ (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ВГВ.

8.1.2. Результаты индивидуальной постановки ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение порогового цикла C_t ВГВ находится в диапазоне, указанном во вкладыше в наборы данной серии.

8.1.3. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

8.1.4. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

8.2. Учёт результатов

8.2.1. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО, СПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для остав-

шихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВГВ, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

8.2.4. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в 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, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

8.3. Количественный учёт результатов

Для количественного анализа рассчитать концентрацию ДНК ВГВ в исследуемых образцах в соответствии с Приложением 1.

Внимание: При условии выделения ДНК из образца объемом 1000 мкл, полученное значение соответствует концентрации ДНК ВГВ в МЕ/мл. Если выделение ДНК образца производилось из меньшего объема, полученное значение следует умножить на k , где $k=1000/\text{объем образца в мкл}$. Таким образом будет получена концентрация ДНК ВГВ, выраженная в МЕ/мл.

8.3.1. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГВ в образце находится в диапазоне от 100 МЕ до 10^8 МЕ ДНК ВГВ в объеме выделяемой пробы, результат определяется как положительный с указанием полученной концентрации ДНК ВГВ в образце (в МЕ/мл).

8.3.2. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГВ больше 10^8 МЕ в объеме выделяемой пробы, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГВ «больше 10^8 МЕ/ в объеме выделяемой пробы».

8.3.3. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГВ меньше 100 МЕ в объеме выделяемой пробы, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГВ «меньше 100 МЕ в объеме выделяемой пробы».

8.3.4. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ВГВ), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

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 ВГВ ПЦР», 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

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Расчёт концентрации ДНК ВГВ

Количественный анализ ДНК ВГВ следует производить по приведенным ниже формулам.

1. Для образцов ПКО, значение C_t которых находится в диапазоне значений, указанном во вкладыше в наборы данной серии, вычислить скорректированные значения C_t ВГВ с введением поправки на эффективность выделения, контролируруемую по C_t ВКО, по формуле:

$$Z_{пко} = C_t \text{ ПКО} + (C_t \text{ ВКО}_{ср} - C_t \text{ ВКО}),$$

где:

$Z_{пко}$ - скорректированное значение C_t ВГВ для образца ПКО;

$C_t \text{ ВКО}_{ср}$ – среднее значение C_t ВКО, вычисленное по всем образцам (см. инструкцию);

$C_t \text{ ПКО}$ и $C_t \text{ ВКО}$ – значения C_t данного образца ПКО по каналам ROX и FAM, соответственно.

2. Вычислить среднее значение скорректированного порогового цикла для ПКО ($Z_{пко,ср}$).

Отбраковке подлежат результаты анализа образцов ПКО, для которых $Z_{пко}$ отличается более чем на 2 от значения $Z_{пко,ср}$. После отбраковки вычислить $Z_{пко,ср}$ для оставшихся образцов.

3. Вычислить количество ДНК ВГВ в каждом исследуемом образце (Q_k) по формуле:

$$Q_k = 10^{X_k} [\text{МЕ}],$$

где:

$$X_k = A + B \times (Z_{пко,ср} - Z_k);$$

A – коэффициент, определяемый как логарифм количества ДНК ВГВ в ПКО, приведенного в паспорте серии: $A = \lg(Q_{пко})$;

k – номер образца;

$Z_{пко,ср}$ - среднее значение $Z_{пко}$ для образцов ПКО;

Z_k – скорректированное значение C_t данного образца, вычисляемое по формуле:

$$Z_k = C_t \text{ ВГВ}_k + (C_t \text{ ВКО}_{ср} - C_t \text{ ВКО}_k);$$

B – коэффициент, зависящий от эффективности амплификации и вычисляемый по формуле: $B = \lg(2 \times E_a/100)$, где E_a – эффективность амплификации в %. Для количественной оценки использовать значение $B = 0,3$.

4. Вычислить концентрацию ДНК ВГВ (в МЕ/мл) в каждом исследуемом образце по формуле:

$$C_k = Q_k / V_k$$

где V_k – объем образца в мл.

Таким образом, будет получена концентрация ДНК ВГВ в данном образце, выраженная в МЕ/мл.

Валидация аналитической системы.

Определение концентрации ДНК ВГВ в ПКО по калибровочному графику.

Для более точного определения концентрации ДНК ВГВ в исследуемых образцах необходимо провести валидацию аналитической системы путем сравнения паспортного значения концентрации ДНК ВГВ в ПКО со значением, полученным по калибровочному графику.

Процедуру следует проводить в соответствии с приведенным ниже описанием:

1. Перед началом работы извлечь набор реагентов для выделения («РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», любой из комплектов) и набор «РеалБест ВГВ ПЦР» (вариант 1 / количественный) из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18-25)°C не менее 30 минут.

2. Приготовить компоненты наборов и образцы ОКО, ПКО, СПКО, КО1, КО2 в соответствии с инструкцией к используемым наборам для выделения НК и выявления ДНК ВГВ.

3. Подготовить 11 пробирок для выделения в соответствии с инструкцией к используемому набору и промаркировать их: 1 пробирка ОКО, 1 пробирка СПКО, по 3 пробирки ПКО, КО1 и КО2.

4. Внести контрольные образцы в промаркированные соответствующим образом пробирки согласно инструкции к используемому набору для выделения НК.

5. Провести выделение ДНК согласно инструкции.

6. Выделенную ДНК перенести в промаркированные пробирки для ПЦР в соответствии с инструкцией к набору «РеалБест ВГВ ПЦР», запрограммировать прибор, в соответствии с инструкцией к прибору задать значения концентраций КО1 и КО2, указанные в паспорте набора, и провести ПЦР.

7. Для каждого образца вычислить скорректированное значение C_t по формуле:

$$Z = C_t \text{ ВГВ} - (C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}} - C_t \text{ ВКО}).$$

8. Вычислить среднее значение Z для ПКО, КО1, КО2 ($Z_{\text{ПКО}_{\text{ср}}}$, $Z_{\text{КО1}_{\text{ср}}}$, $Z_{\text{КО2}_{\text{ср}}}$).

Отбраковке подлежат результаты анализа образцов, для которых Z отличается более чем на 2 от $Z_{\text{ср}}$. После отбраковки вычислить $Z_{\text{ср}}$ для оставшихся образцов.

9. Вычислить B – коэффициент для вычисления количества ДНК ВГВ по формуле:

$$B = (\lg(Q_{\text{KO1}}) - \lg(Q_{\text{KO2}})) / (Z_{\text{KO2ср}} - Z_{\text{KO1ср}});$$

где: Q_{KO1} и Q_{KO2} – количество ДНК ВГВ в калибровочном образце 1 и 2, соответственно (указаны в паспорте набора);

При эффективности амплификации 100% $B = \lg 2 = 0,3$.

10. По результатам анализа калибровочных образцов вычислить количество ДНК ВГВ в ПКО по аналитической формуле:

$$Q_{\text{пко}} = 10^{X_{\text{пко}}} [\text{МЕ}],$$

где:

$$X_{\text{пко}} = \lg(Q_{\text{KO1}}) + B \times (Z_{\text{KO1ср}} - Z_{\text{пкоср}});$$

$Z_{\text{KO1ср}}$ – среднее значение Z для образцов KO1;

$Z_{\text{пкоср}}$ – среднее значение Z для образцов ПКО;

При эффективности амплификации 100% $B = \lg 2 = 0,3$.

11. Использование ПКО в качестве образца сравнения при дальнейших вычислениях концентрации ДНК ВГВ в исследуемых образцах допускается, если вычисленное значение количества ДНК ВГВ в ПКО отличается не более чем в 3 раза от значения, указанного в паспорте набора.

12. При выполнении всех указанных условий можно проводить вычисление количества ДНК ВГВ (в МЕ) в исследуемых образцах по следующей формуле с использованием значения коэффициента B , вычисленного по калибровочному графику:

$$Q_k = 10^{X_k} [\text{МЕ}],$$

где:

$$X_k = \lg(Q_{\text{пко}}) + B \times (Z_{\text{пкоср}} - Z_k)$$

Концентрация ДНК ВГВ в образце в таком случае вычисляется по следующей формуле:

$$C_k = Q_k / V_k,$$

где V_k – объем образца в мл.

Таким образом, будет получена концентрация ДНК ВГВ в данном образце, выраженная в МЕ/мл.

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 14 листов.
Зав. лабораторией "СПИД" ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

23 мар Кудрявцева Е.Н.
2016 г.

