

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления, количественного определения РНК и дифференциации

генотипов 1/2/3 вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР

в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВГС-генотип»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГС-генотип» может быть применен в клинической практике для выявления, определения вирусной нагрузки 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).

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.

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

Каждый образец анализируется с помощью двух готовых реакционных смесей ГРС-1 и ГРС-2, входящих в состав набора. ГРС-1 предназначена для определения генотипа РНК ВГС, ГРС-2 для количественного определения РНК ВГС в исследуемом образце.

Определение генотипа РНК ВГС обеспечено независимой детекцией фрагментов генома ВГС, соответствующих различным генотипам, за счёт флуорогенных генотипспецифичных зондов, детектируемых в разных каналах. При определении генотипа учитываются данные количественного анализа. Для контроля работы ГРС-1 в каждой постановке применяется комплексный положительный контрольный образец (ПКО), содержащий РНК ВГС генотипов 1b, 2a, 3a.

ПКО охарактеризован в международных единицах (МЕ/мл) по стандарту ВОЗ (WHO international standard for Hepatitis C virus NIBSC Code: 96/798) и служит образцом сравнения для расчёта вирусной нагрузки.

Определение количества вирусной РНК в исходной пробе проводится путём сравнения количества циклов, необходимых для достижения пороговой флуоресценции для анализируемого образца и охарактеризованного положительного контроля (ПКО), выполняющего роль образца сравнения – Ct, с введением дополнительной поправки на эффективность выделения РНК и обратной транскрипции.

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

2.2. Состав набора:

- Комплексный положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР №1 (ГРС-1), лиофилизированная, для определения генотипов 1/2/3 РНК ВГС – 48 пробирок;
- Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР №2 (ГРС-2), лиофилизированная, для выявления и количественного определения РНК ВГС – 48 пробирок;
- Раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон (4,0 мл).

В случае использования стрипированных пробирок набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (12 стрипов по 8 штук) или плёнкой оптической – 3 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность.

Набор гарантированно (в 100% образцов) позволяет выявлять РНК ВГС в концентрации не менее 15 МЕ/мл при выделении РНК из 1 мл пробы.

Набор позволяет определять генотип ВГС при концентрациях РНК не менее 400 МЕ/мл при выделении РНК из 1 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, содержащих РНК ВГС (выше предела обнаружения) определяется концентрация РНК ВГС. В образцах, не содержащих РНК ВГС, результат анализа гарантированно (в 100% образцов) должен быть отрицательным.

3.3. Диапазон определяемых концентраций (область линейности): от 15 МЕ/мл до 10^8 МЕ/мл РНК ВГС при выделении РНК из 1 мл пробы.

Для определения вирусной нагрузки в копиях РНК ВГС на мл следует применять соотношение 1 МЕ = 2,5 копии РНК ВГС (по данным National Institute of Biological Standards and Control для WHO international standard for Hepatitis C virus NIBSC Code: 96/798).

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/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 режиме реального времени: «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, «ЦиклюТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

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

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– 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 3 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 3 повтора положительного контрольного образца (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 комплексным 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.

Комплексный 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-1 и ГРС-2 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 3 ПКО) пробирок с ГРС-1 и ГРС-2. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС-1 и ГРС-2 упаковать в дефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС-1и ГРС-2 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-1 и ГРС-2 пронумеровать и расположить в штативе.

7.3. В каждую пробирку с ГРС-1 и ГРС-2 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 ВКО и детекции флуоресцентных сигналов.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6.1. 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 с, 60°C – 20 с).

Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.6.2. Выбрать каналы детекции амплификации

ГРС-1:

Для регистрации сигнала при амплификации кДНК ВГС генотип 1 в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором HEX. Для детекции следует выбирать канал «HEX».

Для регистрации сигнала при амплификации кДНК ВГС генотип 2 в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал «FAM».

Для регистрации сигнала при амплификации кДНК ВГС генотип 3 в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал «ROX».

ГРС-2:

Для регистрации сигнала при амплификации кДНК ВКО в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для регистрации сигнала при амплификации кДНК ВГС в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

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

7.6.4. Запустить программу и провести ОТ-НЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора «РеалБест РНК ВГС-генотип» с амплификатором «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирмы «Bio-Rad», США) и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу и вычислениям результатов. Программа выдает результат анализа в виде двух таблиц: концентраций РНК ВГС в анализируемых образцах и генотипов. Дополнительно программа отмечает образцы, анализ которых признан недействительным.

При использовании других амплификаторов анализ и учет результатов, вычисление концентраций РНК ВГС, определение генотипов в образцах проводить в соответствии с данным разделом инструкции.

8.1. Общие условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В комплексном положительном контрольном образце программа должна фиксировать:

– для ГРС-1: нарастание специфического сигнала амплификации кДНК ВГС в каналах «HEX» (генотип 1), «FAM» (генотип 2), «ROX» (генотип 3) и определять значе-

ние порогового цикла C_t ВГС.

– для ГРС-2: нарастание специфического сигнала амплификации кДНК ВГС в канале «ROX» (все генотипы) и определять значение порогового цикла C_t ВГС, нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

8.1.2. Результаты индивидуальной постановки ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение C_t в каналах «FAM», «HEX», «ROX» (ГРС-1) и в канале «ROX» (ГРС-2) находится в диапазоне, указанном во вкладыше к наборам данной серии.

8.1.3. В отрицательном контрольном образце для ГРС-1 программа не должна фиксировать достоверное нарастание специфического сигнала амплификации кДНК ВГС в каналах «FAM», «ROX», «HEX». Для ГРС-2: программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определять C_t ВКО, при этом не должно быть достоверного нарастания специфического сигнала амплификации кДНК ВГС.

Если для ОКО значение C_t в каналах «FAM», «HEX», «ROX» (ГРС-1) и «ROX» (ГРС-2) меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 8.2.4.

8.1.4. Для ГРС-2 в каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение C_t ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40.

8.2. Учет результатов

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

8.2.2. Анализируемый образец учитывается как **отрицательный** (не содержащий РНК ВГС), если для этого образца в ГРС-2 значение C_t в канале «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 анализа данного образца не подлежит 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.

8.2.3. Анализируемый образец учитывается как **положительный**, т.е. содержащий РНК ВГС, если для этого образца в ГРС-2 значение C_t в канале «ROX» меньше или рав-

но 40. Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct \text{ ВКО})_{cp}$ более чем на 2, то такой образец учитывается как **положительный** без указания концентрации РНК. Для количественного анализа необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты данной индивидуальной постановки ОТ-ПЦР следует считать недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получены значения Ct менее 40 в каналах «FAM», «HEX», «ROX» (ГРС-1) или «ROX» (ГРС-2). Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

8.3. Определение генотипа ВГС.

8.3.1. Генотип ВГС в анализируемой пробе устанавливается путём сопоставления результатов амплификации в двух пробирках (ГРС-1 и ГРС-2).

8.3.2. Анализируемый образец содержит ВГС генотипа 1, если для канала «HEX» (ГРС-1) и «ROX» (ГРС-2) получено значение Ct менее 40.

8.3.3. Анализируемый образец содержит ВГС генотипа 2, если для канала «FAM» (ГРС-1) и «ROX» (ГРС-2) получено значение Ct менее 40.

8.3.4. Анализируемый образец содержит ВГС генотипа 3, если для канала «ROX» (ГРС-1) и «ROX» (ГРС-2) получено значение Ct менее 40.

8.3.5. Если концентрация РНК ВГС в анализируемом образце менее 400 МЕ/мл, чувствительность набора может оказаться недостаточной для установления генотипа ВГС.

8.3.6. Если концентрация РНК ВГС в анализируемом образце больше 400 МЕ/мл (ГРС-2), а в ГРС-1 не регистрируется значение Ct менее 40 в каналах «FAM», «HEX» или «ROX», это означает, что данный образец содержит РНК ВГС генотипа отличного от 1 (1a, 1b), 2 (2a, 2b, 2c, 2i), 3 (3a, 3b).

	ГРС-1			ГРС-2	
Каналы	HEX	FAM	ROX	ROX	FAM
Регистрируемая матрица	ВГС генотип 1	ВГС генотип 2	ВГС генотип 3	ВГС (все генотипы)	ВКО

8.4. Количественный анализ результатов.

Количественный анализ проводится по результатам постановки ГРС-2. Для количественного анализа рассчитать концентрацию РНК ВГС в исследуемых образцах в соответствии с Приложением или с применением сервисной компьютерной программы «РеалБест диагностика» (которая проводит все операции по учету и анализу образцов и

приводит результаты в виде таблицы с концентрациями РНК ВГС в анализируемых пробах).

8.4.1. Если вычисленное значение концентрации РНК ВГС в образце находится в диапазоне от 15 МЕ/мл до 10^8 МЕ/мл, результат определяется как положительный с указанием полученной концентрации РНК ВГС в образце (в МЕ/мл).

8.4.2. Если вычисленное значение концентрации РНК ВГС больше 10^8 МЕ/мл, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией РНК ВГС «больше 10^8 МЕ/мл».

8.4.3. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВГС), если для этого образца в ГРС-2 значение C_t в канале «ROX» больше 40 или не определяется.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. 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.

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

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

9.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

10. 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

И.О. Маринкин

