

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса гепатита G методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВГГ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГГ» предназначен для выявления РНК вируса гепатита G (ВГГ) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Выделение РНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест экстракция 100», «РеалБест экстракция 1000».

Комплект 1 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.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специ-

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

фического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВГГ), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК 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, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством кДНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК вируса гепатита G из образцов сыворотки (плазмы) крови совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон (4,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1 лист;
- пластиковой крышкой для флакона с ПКО – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления РНК вируса гепатита G по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия (СПП ОКС 05-2-214) - 100%.

3.2. Чувствительность выявления РНК вируса гепатита G по пяти образцам с концентрацией РНК ВГГ 50 копий/мл, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП РНК ВГГ 05-2-519) - 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления РНК вируса гепатита G: клиниче-

ские испытания, проведенные на 46 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гепатита G: клинические испытания, проведенные на 46 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 94%-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, 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 дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ОТ-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 назна-

чения»).

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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 планшетного типа: «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 (2-8) °С;
- дозаторы 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 дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 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 ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Для проведения анализа используются образцы сыворотки и плазмы крови (полученные с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта), из которых предварительно выделяют РНК с помощью одного из наборов: «РеалБест экстракция 1000» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

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

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

6.2. Подготовка ПКО к процедуре выделения РНК.

Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышку и пробку 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 (2-8) °С не более 1 мес или в аликвотах по 50 мкл при минус (18-24) °С до 3 месяцев.

6.3. Подготовка компонентов набора к анализу.

Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, выдержать пробирки с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР (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 контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью. 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 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) 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 соответствующего раствора выделенной РНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

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

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

–1 стадия: 45 °С – 30 мин;

–2 стадия: 94 °С – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВКО в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором «FAM». Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента кДНК ВГГ в системе применён гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором «ROX». Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В ПКО программа должна фиксировать:

–нарастание сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГГ (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла C_t ВГГ;

–нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла C_t ВКО.

8.2. В ОКО должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО и определяться C_t ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГГ. Если для ОКО значение C_t ВГГ меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.4.

8.3 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. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ 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 $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.2. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК

ВГГ), 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 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.

9.3. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим РНК ВГГ, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.4. 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.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности

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

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

11.3. 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.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

М.П.

Т.И. Поспелова





Пропиновано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров НИР ГБОУ ВПО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н. Захарова Л.Н.
"19" июня 2015 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса гепатита G методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВГГ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГГ» предназначен для выявления РНК вируса гепатита G (ВГГ) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Выделение РНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест экстракция 100», «РеалБест экстракция 1000».

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВГГ), заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с

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

комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной кДНК 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, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством кДНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов обеспечивается выделением РНК вируса гепатита G из образцов сыворотки (плазмы) крови совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный – 1 флакон;
- реакционная смесь для ОТ-ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок, каждая на 10 определений;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон (4,0 мл);
- раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2,0 мл)

Набор дополнительно комплектуется:

- пластиковой крышкой для флакона с ПКО – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления РНК вируса гепатита G по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия (СПП ОКС 05-2-214) - 100%.

3.2. Чувствительность выявления РНК вируса гепатита G по пяти образцам с концентрацией РНК ВГГ 50 копий/мл, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП РНК ВГГ 05-2-519) - 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления РНК вируса гепатита G: клинические испытания, проведенные на 46 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления РНК вируса гепатита G: клиниче-

ские испытания, проведенные на 46 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведенных 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, 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 дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ОТ-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. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к

обращению с медицинскими отходами» и 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 роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «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 (2-8) °С;
- дозаторы 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 дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 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 ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Для проведения анализа используются образцы сыворотки и плазмы крови, (полученные с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта), из которых предварительно выделяют РНК с помощью одного из наборов: «РеалБест экстракция 100», «РеалБест экстракция 1000» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

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

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

6.2. Подготовка ПКО к процедуре выделения РНК.

Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышку и пробку 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 (2-8) °С не более 1 месяца или в аликвотах по 50 мкл при минус (18-24) °С до 3 месяцев.

6.3. Подготовка компонентов набора к анализу.

Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 минут. Отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с реакционной смесью для ОТ-ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

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

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

В пробирку с РС добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

РВ после вскрытия флакона хранить при температуре от (2-8) °С не более 3 месяцев.

Восстановленную РС хранить при (2-8) °С не более суток.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Во все пробирки дозатором с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ОТ-ПЦР (РС).

7.3. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной РНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотно закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов кДНК ВГГ, кДНК ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

– для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

– 1 стадия: 45 °С – 30 мин;

– 2 стадия: 94 °С – 1 мин;

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

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

– 1 стадия: 45 °С – 30 мин;

– 2 стадия: 94 °С – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать канал детекции результатов амплификации кДНК ВКО и кДНК ВГГ:

Для регистрации процесса амплификации кДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации кДНК ВГГ следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВГГ (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

8.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГГ по каналу «ROX»/«Orange». Если для ОКО значение Ct ВГГ меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.4.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

9.2. Результат анализа образца учитывается как отрицательный, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение $Ct\ ВКО$ превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит учету 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.

9.3. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим РНК ВГГ, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

9.4. Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» 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.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности.

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

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.3. 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 РНК ВГГ», следует обращаться в **ЗАО «Вектор-Бест»** по адресу:

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

А.В. Трухина

В.К. Ткачев

Т.И. Поспелова





Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров НИР ГБОУ ВПО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.
"19" июня 2015 г.