

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «ИПО-Литех»

« 18 » февраля 2011 г.
А. Ю. Наумов
ИПО-ЛИТЕХ
Co. Ltd.
г. МОСКВА

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения РНК вируса гепатита С (HCV)
в сыворотке или плазме крови
методом полимеразной цепной реакции

(БИОТИТР-С)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов БИОТИТР-С предназначен для количественного определения РНК вируса гепатита С (HCV) в сыворотке или плазме крови человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах. Набор реагентов также может быть использован с целью качественного определения вируса гепатита С.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Набор реагентов БИОТИТР-С может быть использован в клинической медицине для выявления носительства вируса гепатита С и оценки эффективности проводимой терапии.

1.3. Набор выпускается в двух форматах и рассчитан на 100 тестов, включая контрольные образцы:

Формат «Количественный» предназначен для проведения анализа 75 клинических образцов, 5 проб отрицательного контрольного образца, 20 проб 4-х стандартных образцов (по 5 проб каждого).

Формат «Качественный» предназначен для проведения анализа 90 клинических образцов, 5 проб положительного контрольного образца и 5 проб отрицательного контрольного образца.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

2.1.1. Набор реагентов БИОТИТР-С основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков РНК путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

Геном вируса гепатита С представлен одноцепочечной молекулой РНК. Для проведения анализа необходимо получить с помощью реакции обратной транскрипции (ОТ) комплементарную ДНК-копию генома вируса гепатита С, которая далее служит матрицей для полимеразной цепной реакции.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение РНК).
2. Постановка реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации.
3. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации.

Флуоресцентная детекция продуктов амплификации позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации ДНК-фрагмента в процессе реакции. Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе за счет специфической гибридизации ампликонов с олигонуклеотидным зондом, несущим флуоресцентную метку. В ходе последующей полимеразной реакции происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию. Программное обеспечение, прилагаемое к амплификатору, позволяет проводить корректную обработку данных для выявления РНК вируса гепатита С.

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

Концентрацию РНК вируса гепатита С в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости уровня флуоресценции от содержания РНК вируса гепатита С в калибровочных пробах.

2.2. Состав набора

В состав набора реагентов входят два комплекта:

2.2.1. Комплект для пробоподготовки (выделение РНК).

Данные комплекты выпускаются в двух различных форматах - качественном и количественном (см табл. 1)

Таблица 1.

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Формат качественный	1. Реагент РНК-ЭКСПРЕСС 2. Положительный контрольный образец * 3. Отрицательный контрольный образец**	100 пробирок (по 200 мкл) 1 пробирка (1,1 мл) 5 пробирок (по 300 мкл)
Формат количественный	1. Реагент РНК-ЭКСПРЕСС 2. Отрицательный контрольный образец** 3. Набор стандартных контрольных образцов***	100 пробирок (по 200 мкл) 5 пробирок (по 300 мкл) 4 пробирки (по 1,1 мл)

РНК-ЭКСПРЕСС представляет собой готовый реагент для выделения РНК из биопроб, расфасованный по 200 мкл в пробирки типа Эппендорф.

Внутренний контрольный образец (ВКО), входящий в состав реагента РНК-ЭКСПРЕСС, позволяет компенсировать ингибирование и контролировать процессы пробоподготовки и амплификации, что обеспечивает более точное определение РНК HCV в каждом анализируемом образце. ВКО представляет собой неинфекционную защищенную РНК бактериофага MS2 (концентрация 10^5 копий РНК MS2/мл) в растворе реагента РНК-ЭКСПРЕСС.

*Положительный контрольный образец представляет собой пробу на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, несущую армированную РНК вируса гепатита С (HCV), упакованную в бактериофаг MS2, с известной концентрацией в диапазоне от 10^3 до 10^4 копий РНК HCV /мл.

**Отрицательный контрольный образец представляет собой пробу на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, не несущую фрагменты последовательности вируса гепатита С.

*** Набор стандартных контрольных образцов представляет собой 4 пробы на основе сыворотки крови крупного рогатого скота, несущие армированную РНК вируса гепатита С (HCV), упакованную в бактериофаг MS2, с концентрацией - 10^3 , 10^4 , 10^5 и 10^6 копий РНК MS2/мл, соответственно.

2.2.2. Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации.

Данный комплект универсален для всех форматов набора.

Состав комплекта представлен в таблице 2.

Таблица 2

Состав	Комплектация
1. Реакционная смесь*.....	1 пробирка (1300 мкл)
2. Taq-полимераза.....	1 пробирка (90 мкл)
3. Обратная транскриптаза (200 ед/мкл).....	1 пробирка (25 мкл)
4. Разбавитель.....	3 пробирки (по 2 мл)
5. Дитиотрейтол (ДТТ).....	1 пробирка (30 мкл)
6. Ингибитор рибонуклеаз (20 ед/мкл).....	1 пробирка (70 мкл)
7. Положительный контроль ПЦР.....	1 пробирка (110 мкл)

Комплект для проведения амплификации включает готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор ROX или FAM, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;
- праймеры для выявления внутреннего контроля; внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию, и качество выделения РНК.

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую к применению расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь (маркировка OneStep).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность анализа

С помощью набора БИОТИТР-С можно обнаружить 10^3 и более копий РНК вируса гепатита С в мл сыворотки или плазмы крови.

3.2. Специфичность анализа

100% специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к наиболее консервативным участкам генома (5'-нетранслируемая область) среди разных генотипов вируса гепатита С (HCV), а также специфичными

флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарным участком ампликона (специфического продукта амплификации). Использование набора БИОТИТР-С позволяет выявлять только вирус гепатита С (HCV) и исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.3. Точность анализа

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации РНК HCV предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов разбавителя и калибровочной пробы с концентрацией 10^6 копий РНК HCV/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.4. Линейность

Зависимость концентрации РНК HCV в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей РНК HCV, имеет линейный характер в диапазоне концентраций $10^3 - 10^6$ копий РНК HCV на мл и составляет $\pm 10\%$.

3.5. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации РНК HCV в одном и том же образце сыворотки крови не превышает 8 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение “Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР” (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение РНК из биопробы

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до $+ 99^{\circ}\text{C}$;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации.

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;
- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;

- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

6. ПРОБОПОДГОТОВКА

6.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Для получения сыворотки венозную кровь в количестве 500 мкл собрать в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл и дать крови свернуться. Пробирку центрифугировать, полученную сыворотку перенести в стерильную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Сыворотку крови можно хранить при температуре -20°C не более 1 месяца.

Для получения плазмы венозную кровь в количестве 500 мкл собрать в стерильную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл с 50 мкл 0,5 М раствора ЭДТА. Тщательно перемешать, пробирку центрифугировать, полученную плазму перенести в стерильную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Плазму крови можно хранить при температуре -20°C не более 1 месяца.

6.2. Выделение РНК.

6.2.1. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови перемешать и осадить капли с крышек центрифугированием в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) на микроцентрифуге-вортексе.

6.2.2. Промаркировать пробирки с реагентом РНК-ЭКСПРЕСС и расположить их соответствующим образом в штативе, включая пробирки для образцов из комплекта для пробоподготовки:

- отрицательного контрольного образца (для всех форматов),
- стандартных контрольных образцов (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) в случае использования формата «количественный»,
- положительного контрольного образца в случае использования формата «качественный».

6.2.3. Внести по 200 мкл исследуемых образцов сыворотки или плазмы крови в соответствующие пробирки.

6.2.4. Внести по 200 мкл отрицательного, положительного или стандартных контрольных образцов (в зависимости от используемого формата набора) из комплекта для пробоподготовки в соответствующие пробирки.

Во избежание контаминации образцов сыворотку или плазму крови следует переносить в пробирку с раствором, используя наконечники с фильтрами.

6.2.5. Пробирки закрыть и **тщательно** перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 10 секунд.

6.2.6. Осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе.

6.2.7. Поместить пробирки в твердотельный термостат, предварительно прогретый до температуры $+90^{\circ}\text{C}$, на 10 минут.

Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру не менее $+90^{\circ}\text{C}$.

6.2.8. Центрифугировать при комнатной температуре в течение 1 минуты при 12 000 об/мин.

6.2.9. Супернатант рекомендуется сразу использовать для постановки реакции амплификации.

Полученный раствор РНК хранению не подлежит! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК!

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение ПЦР-амплификации.

7.1.1. Приготовить и, по возможности, пронумеровать **бесцветные** пробирки, соответствующие типу прибора (согласно инструкции к прибору).

7.1.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирки с Taq-полимеразой, обратной транскриптазой и ингибитором рибонуклеаз в ледяную баню). Пробирки с полностью размороженным содержимым тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

7.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу (табл. 3).

Таблица 3

Компонент набора	Объем в мкл
Разбавитель	43
Реакционная смесь	12
Дитиотрейтол (DTT)	0,15
Ингибитор рибонуклеаз	0,5
Обратная транскриптаза	0,2
Taq-полимераза	0,8

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

7.1.4. После добавления ферментов, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием и осадить капли с крышки пробирки.

7.1.5. Внести в микропробирки по **55 мкл** готовой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

7.1.6. Добавить в пробирки с реакционной смесью по **20 мкл**:

- в пробирку отрицательного контроля ПЦР – разбавитель;
- в пробирку отрицательного контрольного образца – отрицательный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы РНК;
- в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец, прошедший процедуру выделения;
- в пробирку положительного контроля ПЦР – положительный контроль ПЦР из комплекта для амплификации;
- в пробирки стандартных контрольных образцов (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6) для количественного определения – соответствующие образцы, прошедшие процедуру выделения;

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

Внимание!! ПЦР анализ должен быть проведен в течение 20-30 минут после выделения РНК! Раствор не хранится!

7.1.7. Пробирки центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C) на микроцентрифуге-вортексе для осаждения капель со стенок пробирок.

7.1.8. Поместить пробирки в амплификатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени», прогретый до температуры + 42°C.

7.1.9. Амплификацию следует проводить по следующей программе:

1	+42°C	40 минут	
2	+93°C	2 минуты	
3	+93°C	20 секунд	45 циклов
	+64°C	20 секунд*	

* измерение флуоресценции

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на примере прибора Bio-Rad iQ5. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов БИОТИТР-С.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Детекция продуктов амплификации

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов для формата «качественный».

9.1.1. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа, а также циклы выравнивания выбираются согласно таблице 4.

Таблица 4

	Канал	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)	Выравнивание по циклам
Внутренний контроль	F2	HEX	250	30	5-15
HCV	F1	ROX (FAM)	75	45	5-20

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления фонового сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.1.2. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

	Ct ROX(FAM)	Ct HEX	Результат
К+ выделения	<45	<30	Выделение и специфическая реакция прошли.
К+ ПЦР	<45	любой	Специфическая реакция прошла.
К- ПЦР	НЗ	НЗ	Специфическая контаминация и контаминация внутренним контролем отсутствует.
	<45	НЗ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ	<30	Контаминация внутренним контролем. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К- выделения	НЗ	<30	Специфическая контаминация отсутствует.
	НЗ	>30	Ингибирование или недостаточное выделение РНК
	<45	<30	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
Анализируемый образец	<45	<30	ПРИСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	НЗ	<30	ОТСУТСТВИЕ РНК возбудителя.
	<НЗ или НЗ	НЗ или >30	Ингибирование или недостаточное выделение РНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct ROX/FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор ROX или FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

НЗ – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано.

Примечание. Приведенные характеристики конечного цикла и пороговые значения представлены на примере прибора Bio-Rad iQ5. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов БИОТИТР-С.

9.2. Анализ результатов для формата «количественный».

9.2.1. При проведении анализа с использованием наборов формата «количественный» необходимо ввести значения стандартных контрольных образцов (калибровочных проб) в программе, предназначенной для анализа результатов. С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически определит циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией и рассчитает концентрации анализируемых образцов и контролей (см рис.1). Концентрация РНК HCV выражается в копиях/мл. Фактор пересчета между копиями РНК HCV и Международными единицами HCV составляет 2,7, в соответствии со вторым Международным стандартом WHO РНК HCV для тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот (NIBSC 96/798).

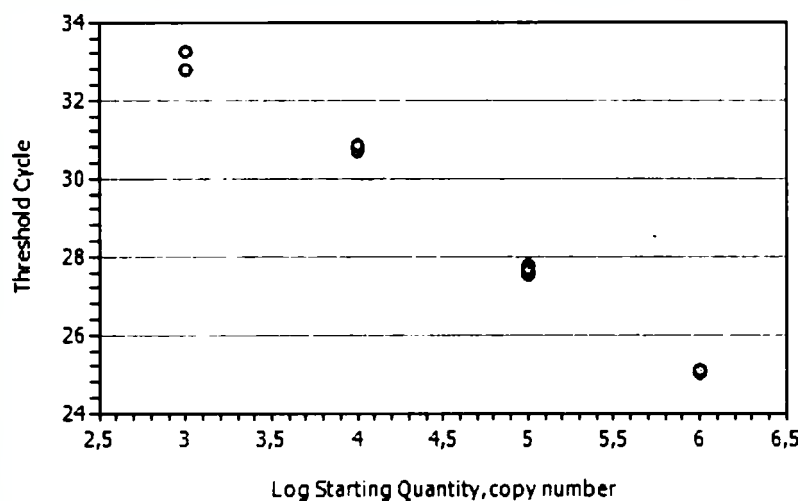
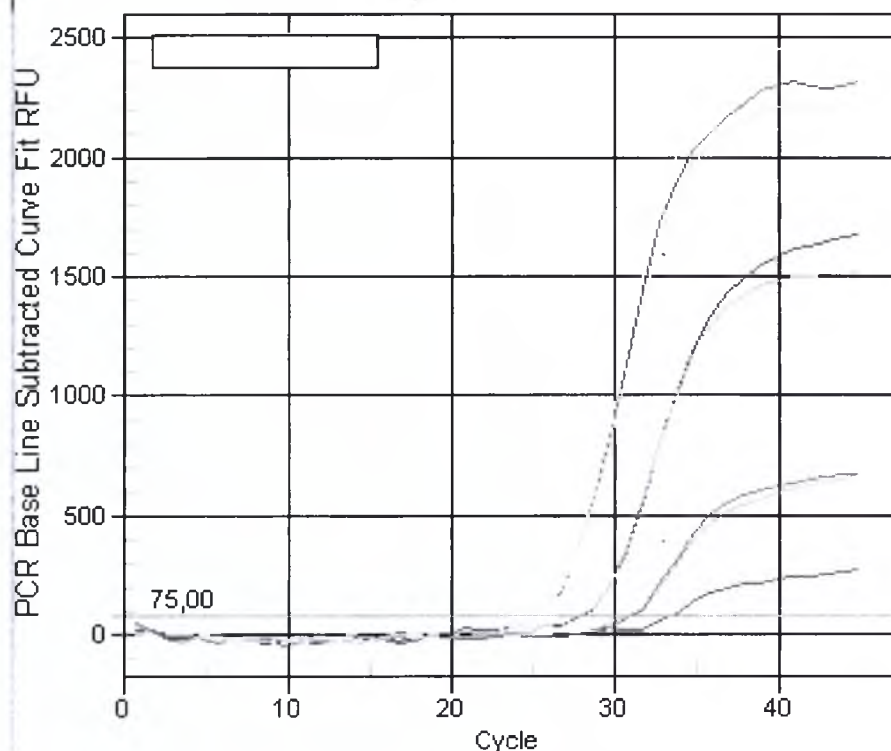


Рис 1. Кривые накопления флуоресцентного сигнала для калибровочных проб и построенный по ним калибровочный график.

Численное выражение концентрации показывает, что рассчитанное значение результата укладывается в линейный диапазон определения, составляющий $10^3 - 10^6$ копий /мл. Результаты, не укладывающиеся в данный диапазон, обладают высокой вариабельностью и не могут рассматриваться как точные.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Комплект для пробоподготовки (выделение РНК) должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплекта при температуре до 25°C не более 1 суток.

10.2. Комплекты для проведения амплификации всех форматов должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 суток.

10.3. Срок годности набора – 6 месяцев.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)589-14-03, или e-mail: info@lytech.ru.

Исполнительный директор

ООО НПФ «Литех»

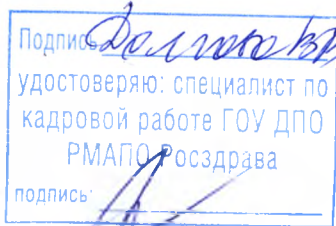


Байцур С.Г.

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой
клинической лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»



д.м.н. Долгов В.В.



прошито, проверено, скреплено печатью.
Количество листов 10 шт.
Директор Наумов А.Ю.

