«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК) предназначен для выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор выявляет генетические варианты ВИЧ-1 группы М (включая субтипы А и В). Материалом для исследования являются образцы цельной крови человека.

Набор 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» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор быть применен в клинической практике для анализа образцов цельной крови.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы и проведении реакции амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект реагентов для выделения предназначен для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов цельной крови.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комлементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена HMBS человека с целью валидации качества образца.

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для обработки клинических проб и выделения ДНК

- раствор для гемолиза – 2 флакона по 14 мл;
- лизирующий раствор – 8 флаконов по 4 мл;
- осадитель НК – 4 флакона по 12 мл;
- раствор для отмывки №1 – 4 флакона по 8 мл;
- раствор для отмывки №2 – 4 флакона по 5 мл;
- элюирующий раствор – 4 флакона по 3 мл;
- сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 флакон, 1 мл.

Комплект контрольных образцов

- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон, 4 мл;
- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизированный − 1 флакон;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 флакона по 2 мл.

Комплект реагентов для проведения ПЦР

- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок.

Принадлежности:

- завинчивающаяся пластиковая крышка для флакона с ПКО – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК ВИЧ-1 набором «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК) определяется по четырем образцам с концентрацией ДНК ВИЧ 25 копий в объеме выделяемой пробы, приготовленным из образца №2 СОП ДНК ВИЧ-1 (ЦК) (рег. № 05-2-601), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК ВИЧ-1 набором «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК) определяется по стандартному образцу предприятия СОП ДНК ВИЧ (ЦК) (образец №1) (рег.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

№ 05-2-601), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные и составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1): клинические испытания, проведенные на 240 положительных образцах цельной крови и сухих пятен крови от 120 ВИЧ-инфицированных пациентов, показали 100 % чувствительность (интервал 97,5 % - 100 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1): клинические испытания, проведенные на 188 отрицательных образцах цельной крови и сухих пятен крови от 94 условно здоровых доноров, показали 100 % специфичность (интервал 96,9 % - 100 %).

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/ОТ-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»;*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 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;

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

–дозаторы механические одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, 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/ (например, фирма FinnTip, Финляндия);

– одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (например, фирма «SSI», США);

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (АО «Вектор-Бест»);

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

– отсасыватель медицинский (например, В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», республика Беларусь);

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

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Образцы цельной крови забираются в вакуумную пробирку с ЭДТА или с цитратом натрия. После забора крови содержимое вакутейнера тщательно перемешать переворачиванием.

Внимание. Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.

Транспортировать и хранить образцы следует:

при (18–25) °С не более 2 часов;
при (2–8) °С не более 1 недели;
при минус (18−60) °С не более 1 месяца.

Повторное замораживание-оттаивание цельной крови недопустимо!

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку (кроме упаковки с ГРС!) и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 минут.

6.2.2. Во флакон с ПКО добавить 1 мл РВК, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 100 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

6.2.3. ОКО готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

6.2.4. Перед началом работы прогреть лизирующий раствор при (50-60) °С до растворения осадка, перемешать. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл *(по количеству анализируемых образцов, включая контрольные образцы).* Установить их в штатив.

7.2. Для отрицательного контроля в пробирку (маркированную «ОКО») внести 100 мкл ОКО.

7.3. Для положительного контроля в пробирку (маркированную «ПКО») внести 70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

7.4. В каждую пробирку (кроме ПКО и ОКО) внести по **500 мкл раствора для гемолиза.**

Внимание! Раствор для гемолиза после первого вскрытия флаконов хранить при

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

температуре (2–8) °С не более 1 месяца.

7.5. Анализируемые образцы цельной крови перемешать до гомогенного состояния путём переворачивания вакуумных пробирок *(не вортексировать!).*

7.6. В каждую пробирку с раствором для гемолиза дозатором с отдельными наконечниками внести по **250 мкл анализируемых образцов цельной крови** в соответствии с маркировкой пробирок.

Внимание! В том случае, когда объём образца является недостаточным, возможно использовать объёмы 200, 150, 100 или 50 мкл.

7.7. Пробирки плотно закрыть крышками и перемешать содержимое пробирок переворачиванием *(не вортексировать!).*

7.8. Центрифугировать при 7000 об/мин в течение 3 минут.

7.9. Используя отдельный наконечник для каждого образца (кроме ПКО И ОКО), максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.10. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 300 мл лизирующего раствора с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Выдержать в термошейкере в течение 5 минут при 65°С с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.11. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 400 мкл осадителя НК.

7.12. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 минут при температуре (18-25)°С.

7.13. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.14. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 минут на микроцентрифуге.

7.15. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.16. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 минут на микроцентрифуге.

7.17. Используя отдельный наконечник для каждого образца, максимально полно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.18. Высушить осадки в открытых пробирках в течение 2-3 минут при температуре (18-25) °С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.19. В каждую пробирку к осадку добавить 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере в течение 5 минут при 65 °С с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Пробы готовы к постановке ПЦР

Внимание! Выделенная ДНК хранится при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

8.2. Вскрыть упаковку с ГРС и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. 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 при температуре хранения (2-8)°С составляет 3 месяца.

8.3. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! При использовании амплификатора «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» надписи следует располагать на крышке пробирок. При использовании амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирок.

8.4. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать осадок! Плотно закрыть пробирки крышками.

8.5. Поместить пробирки в амплификатор.

8.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 20 секунд);

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

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 40 секунд);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

8.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК HMBS и ДНК ВИЧ-1:

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»),

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Green». (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК HMBS;

«ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВИЧ-1.

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

8.9. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа и учёта результатов.

9.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS в канале «FAM/Green» и определять значение порогового цикла Ct HMBS.

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВИЧ-1 в канале «ROX/Orange» и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

9.1.2. В ОКО не должно фиксироваться нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX» («Orange»), а также нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека по каналу «FAM» («Green»).

Если для ОКО значение Ct по каналу «FAM» («Green») меньше или равно 25 или по каналу «ROX» («Orange») меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (п. 9.2.3.).

9.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS (канал «FAM/Green») и определять Ct HMBS.

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. Анализируемый образец считается положительным, то есть содержащим ДНК ВИЧ-1, если для этого образца значение Ct в канале «ROX/Orange» меньше или равно 40.

9.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным, то есть не содержащим ДНК ВИЧ-1, если для этого образца значение Ct в канале «ROX/Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct HMBS больше 25 или не определяется, то результат не подлежит учёту как отрицательный. Необходим повторный забор материала и повторный анализ данного образца.

9.2.3. В случае контаминации ДНК ВИЧ-1 (Ct_{ROX} ОКО ≤ 40) все положительные ре-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

В случае контаминации ДНК гена HMBS (Ct_{FAM} ОКО ≤ 25) все отрицательные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен отрицательный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал положительный результат, следует учитывать как положительные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1.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.

10.2. 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.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВИЧ» (ЦК), следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru