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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса иммунодефицита человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВИЧ»

(форма 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВИЧ» предназначен для выделения и выявления РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 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.

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: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 4 независимых процедур выделения по 12 образцов в каждой, включая контроли.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Набор укомплектован всеми необходимыми компонентами для проведения всего комплекса процедур по концентрированию и выделению РНК вируса иммунодефицита человека из сыворотки (плазмы) крови и проведению ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

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

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

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 иммунодефицита человека из образцов сыворотки (плазмы) крови совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для выделения НК:

– концентрирующий раствор – 4 флакона (по 14 мл);

– лизирующий раствор №1 – 4 флакона (по 4 мл);

– лизирующий раствор №2 – 4 флакона (по 7 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);

– отрицательный контрольный образец (ОКО) – 1 флакон (12 мл);

– внутренний контрольный образец (ВКО) – 2 флакона.

Комплект реагентов для амплификации:

– положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон;

– раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 флакона (по 4 мл);

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

Набор дополнительно комплектуется:

– завинчивающимися крышками для флаконов с ПКО и ВКО – 3 шт.

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

3.2. Чувствительность определяется по пяти образцам с концентрацией РНК ВИЧ 20 МЕ/мл, приготовленным из СОП РНК ВИЧ (рег. № 05-2-213), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

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 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 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 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-287-113-00 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).*

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

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: «iQ iCycler», «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 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 FinnTip, Финляндия);

– одноразовые наконечники для пипеток (фирма FinnTip, Финляндия);

– одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (фирма SSI, США, кат. № 2340);

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (АО «Вектор-Бест», кат. № Е 9291);

– термошейкер (например, Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N, фирма BioSan, Латвия);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма BioSan, Латвия);

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

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

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

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов сыворотки (плазмы) крови

Внимание. Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать сыворотку (плазму) в отдельную пробирку.

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

Транспортировать и хранить образцы при температуре (18-25) °С до 2 ч; при температуре (2-8) °С не более суток; при температуре минус 20 °С до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Образцы сыворотки или плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин при температуре (18-25) °С.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ***положительный*** *и* ***отрицательный контрольные образцы****.*

6.2. Подготовка компонентов набора.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать компоненты набора при температуре (18-25) °С в течение 30 мин.

6.2.2. Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышки и пробки 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 разведения хранить при (2-8) °С не более 1 мес.

6.2.3. Вскрыть флакон с ВКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятые крышки и пробки поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), плотно закрыть флакон новой крышкой, аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при (2-8) °С не более 1 мес.

6.2.4. Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к применению. После вскрытия флакона хранить при (2-8) °С не более 1 мес.

6.2.5. Лизирующие растворы перед началом работы прогреть при (50-60) °С до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором №2 добавить 140 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

Внимание! Лизирующий раствор №2 после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение РНК из 1 мл сыворотки (плазмы) крови.

7.1.1. При выборе количества анализируемых образцов для выделения РНК необходимо предусмотреть, чтобы каждая группа выделяемых образцов и каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР содержала 1 ОКО и 1 ПКО.

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

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

7.1.3. В каждую пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО.

7.1.4. Для отрицательного контроля в пробирку (маркированную «ОКО») внести 1 мл ОКО.

7.1.5. Для положительного контроля в пробирку (маркированную «ПКО») внести 970 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

7.1.6. В остальные пробирки пипеткой с отдельными наконечниками внести по 1 мл анализируемых образцов сыворотки или плазмы крови в соответствии с маркировкой пробирок.

7.1.7. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 1 мл концентрирующего раствора.

7.1.8. Пробирки закрыть крышками, содержимое пробирок тщательно перемешать переворачиванием 5 раз и выдержать при температуре (18-25) °С в течение 10-15 мин. Затем центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин при температуре (18-25) °С*.

*Параметры центрифугирования зависят от модели используемой центрифуги:

Eppendorf MiniSpin – 3000 об/мин;

Eppendorf 5415D – 2000 об/мин;

Eppendorf 5417C – 2000 об/мин;

Heraeus BiofugePico – 2000 об/мин.

7.1.9. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником максимально полно удалить надосадочную жидкость.

7.1.10 . В каждую пробирку к полученному осадку добавить по 200 мкл лизирующего раствора №1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек, чтобы осадок отслоился от дна пробирки. Выдержать при температуре (18-25) °С в течение 5 мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирки.

7.1.11. В каждую пробирку (с лизирующим раствором №1) добавить по 500 мкл лизирующего раствора №2 с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере при 56 °С в течение 10 мин с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.1.12. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 750 мкл осадителя НК.

7.1.13. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Оставить при температуре (18-25) °С на 3-5 мин. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин.

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

7.1.14. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.1.15. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки №1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.16. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.1.17. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки №2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.18. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

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

7.1.20. В каждую пробирку к осадку добавить по 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе в течение 10-15 сек. Инкубировать в термошейкере при 56 °С в течение 10 мин с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин.

Пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенная РНК хранению не подлежит.

Готовить в день проведения ОТ-ПЦР.

7.2. Выделение РНК из 100 мкл сыворотки (плазмы) крови.

При малом объёме исследуемой сыворотки (плазмы) набор может быть применён для выявления РНК ВИЧ в 100 мкл образца. Необходимо учитывать, что в этом случае не гарантировано выявление РНК ВИЧ в концентрации менее 200 МЕ/мл.

7.2.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли – 1 ОКО и 1 ПКО).

7.2.2. В каждую пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО.

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

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

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

7.2.5. В остальные пробирки пипеткой с отдельными наконечниками внести по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки или плазмы крови в соответствии с маркировкой пробирок.

7.2.6. В каждую пробирку добавить по 500 мкл лизирующего раствора №2 с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере при 56 °С в течение 10 мин с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.2.7. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 600 мкл осадителя НК.

7.2.8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Оставить при температуре (18-25) °С на 3-5 мин. Центрифугировать при температуре (18-25) °С в течение 5 мин при 13000 об/мин.

7.2.9. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.2.10. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки №1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин.

7.2.11. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.2.12. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки №2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 5 мин при 13000 об/мин.

7.2.13. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

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

7.2.15. В каждую пробирку к осадку добавить по 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе. Инкубировать в термошейкере при 56 °С в течение 10 мин с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать 1 мин при 13000 об/мин.

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

Пробы готовы к постановке ОТ-ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенная РНК хранению не подлежит. Готовить в день проведения ОТ-ПЦР.

7.3. Проведение ОТ-ПЦР.

7.3.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

7.3.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) микропробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Для приборов «iQ/iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирки.

Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000, Q» надписи следует располагать на крышке пробирки.

7.3.3. В каждую микропробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы сорбента!

7.3.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.3.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента РНК ВИЧ и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов.

7.3.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

• для амплификаторов «iQ/iQ5 iCycler, «CFX96», «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);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

• для амплификаторов «Rotor-Gene 3000/6000, 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 проводить при 60 °С.

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

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

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

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

7.3.9. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).

При использовании других амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа результатов.

9.1.1. В ПКО должно фиксироваться:

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

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

9.1.2. Результаты индивидуальной постановки ОТ-ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение Ct ВИЧ находится в диапазоне, указанном во вкладыше в наборы данной серии.

9.1.3. В ОКО должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определяться Ct ВКО, при этом не должно быть достоверного нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВИЧ.

Если для ОКО значение Ct ВИЧ меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.2.4.

9.1.4. В каждом исследуемом образце должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определяться Ct ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение Ct ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40.

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. 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

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

значений.

9.2.2. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВИЧ), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения (Ct ВКО)ср более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и 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.

9.2.3. Анализируемый образец учитывается как положительный, т.е. содержащий РНК ВИЧ, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ОТ-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.

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. Замораживание наборов не допускается.

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

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест РНК ВИЧ» 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.

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

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест РНК ВИЧ», 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

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
_____05_____ 20 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса иммунодефицита человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВИЧ»
(форма 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВИЧ» предназначен для выявления РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 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», «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ».

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: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВИЧ), 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 хо-

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

де 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 иммунодефицита человека из образцов сыворотки (плазмы) крови совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон;

– раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон (4 мл);

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

Набор дополнительно комплектуется:

– завинчивающейся крышкой для флакона с ПКО – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

3.2. Чувствительность определяется по пяти образцам с концентрацией РНК ВИЧ 20 МЕ/мл, приготовленным из СОП РНК ВИЧ (рег. № 05-2-213), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

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 и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом,

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

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 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 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-287-113-00 «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: «iQ iCycler», «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 от 2 до 8 °С;

– 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 FinnTip, Финляндия);

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

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

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (АО «Вектор-Бест», кат. № Е 9291);

– 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 (плазмы) крови.

Для анализа используются пробы выделенной РНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест экстракция 100», «РеалБест экстракция 1000», «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО), являющийся 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 крышки и пробки 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.

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 мин.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Проведение ОТ-ПЦР.

7.1.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

7.1.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) микропробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Для приборов «iQ/iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирки.

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

Для приборов «Rotor-Gene 3000/6000,Q» надписи следует располагать на крышке пробирки.

7.1.3. В каждую микропробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы сорбента!

7.1.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.1.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента РНК ВИЧ и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов.

7.1.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ОТ-ПЦР:

• для амплификаторов «iQ/iQ5 iCycler, «CFX96», «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);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

• для амплификаторов «Rotor-Gene 3000/6000,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 проводить при 60 °С.

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

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

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

7.1.9. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).

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

При использовании других амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа результатов.

9.1.1. В ПКО должно фиксироваться:

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

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

9.1.2. Результаты индивидуальной постановки ОТ-ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение Ct ВИЧ находится в диапазоне, указанном во вкладыше в наборы данной серии.

9.1.3. В ОКО должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определяться Ct ВКО, при этом не должно быть достоверного нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВИЧ.

Если для ОКО значение Ct ВИЧ меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.2.4.

9.1.4. В каждом исследуемом образце должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определяться Ct ВКО. Анализ пробы считается действительным, если для этого образца значение Ct ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40.

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. 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.

9.2.2. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВИЧ), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения (Ct ВКО)ср более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и 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.

9.2.3. Анализируемый образец учитывается как положительный, т.е. содержащий РНК ВИЧ, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

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

9.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ОТ-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.

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. Замораживание наборов не допускается.

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

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест РНК ВИЧ» 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 «РеалБест РНК ВИЧ», 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