«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» ____05____ 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

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

«РеалБест РНК ВГА»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГА» предназначен для выявления РНК вируса гепатита А в сыворотке (плазме) крови, в образцах фекалий и пробах воды 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: «iQ iCycler», «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 специфического фрагмента кДНК (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВГА), 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’

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

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 А из проб 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 А 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 содержанием 50 копий РНК ВГА в пробе, приготовленным из СОП РНК ВГА (рег. № 05-2-504), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 48 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 40 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 93%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

<u>Внимание!</u> Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от

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

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 пипеток 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 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 «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:

«iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО

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

ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

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

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

– термошейкер, оснащенный термоблоком для пробирок вместимостью 2 мл и позволяющий проводить встряхивание 1300 об/мин и температуре 56 - 60 °С («Thermo Shaker TS-100», фирма BioSan, Латвия; или аналогичный);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» с регулируемой скоростью вращения («Bio-Vortex V-1 plus», фирма BioSan, Латвия; или аналогичный);

– медицинский отсасыватель (В40, фирма Висма-Планар, Беларусь; или аналогичный);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; 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);

– магнитный штатив для пробирок на 2 мл (АО Вектор-Бест, Россия; или аналогичный);

– штативы для пробирок вместимостью 1,5 – 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);

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

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Для анализа используются пробы выделенной РНК, полученные из клинического материала и из образцов окружающей среды с помощью набора: «РеалБест экстракция 100», «РеалБест экстракция 1000» согласно инструкции по применению к соответствующему набору.

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

Внимание! Выделенная РНК хранению не подлежит. Проводить выделение РНК в

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

день постановки 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 температуре (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, 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 от 2 до 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 пипеткой 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 обратной транскрипции с последующей амплификацией специфических фрагментов кДНК ВГА, 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;

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

2 стадия: 94°С – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

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 ВГА 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 положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

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

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

8.2. В ОКО должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента кДНК ВКО и определяться Ct ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации кДНК ВГА. Если для ОКО значение Ct ВГА меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.7.

8.3. В каждом исследуемом образце должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации фрагмента 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. 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. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий РНК ВГА), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

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

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ 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 ВГА, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.4. Если для ОКО значение Ct 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.

9.5. При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» возможно использование программы «РеалБест Диагностика», которая выполняет все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

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.

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

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест РНК ВГА», 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
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

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

«РеалБест РНК ВГА»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВГА» предназначен для выявления РНК вируса гепатита А в сыворотке (плазме) крови, в образцах фекалий и пробах воды 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: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) 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 ВГА), 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 ре-

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

акции 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 А из проб 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 – 1шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления РНК вируса гепатита А 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 содержанием 50 копий РНК ВГА в пробе, приготовленным из СОП РНК ВГА (рег. № 05-2-504), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 48 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 40 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 93%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

<u>Внимание!</u> Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к ис-

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

кажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (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 пипеток 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 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 «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-

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

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 II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

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

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

– термошейкер, оснащенный термоблоком для пробирок вместимостью 2 мл и позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и температуре 56 - 60 ° («Thermo Shaker TS-100», фирма BioSan, Латвия; или аналогичный);

– встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» с регулируемой скоростью вращения («Bio-Vortex V-1 plus», фирма BioSan, Латвия; или аналогичный);

– медицинский отсасыватель (В40, фирма Висма-Планар, Беларусь; или аналогичный);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; 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);

– магнитный штатив для пробирок на 2 мл (АО Вектор-Бест, Россия; или аналогичный);

– штативы для пробирок вместимостью 1,5 – 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);

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

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Для анализа используются пробы выделенной РНК, полученные из клинического материала и из образцов окружающей среды с помощью набора: «РеалБест экстракция 100», «РеалБест экстракция 1000» согласно инструкции по применению к соответствующему набору.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец

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

(ОКО), который является компонентом набора для выделения РНК.

Внимание! Выделенная РНК хранению не подлежит. Проводить выделение РНК в день постановки 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 мин. 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 реакционной смесью для ОТ-ПЦР (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 мин при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

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

Восстановленную РС хранить при (2-8) °С до 2 недель.

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.

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

7.2. Во все пробирки пипеткой 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 обратной транскрипции с последующей амплификацией специфических фрагментов кДНК ВГА, 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 «iQ iCycler», «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 ºС – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКО и кДНК ВГА:

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 ВГА 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»).

7.8. 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 положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

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

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

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

8.2. В отрицательном контрольном образце (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 ВГА по каналу «ROX»/«Orange». Если для ОКО значение Ct ВГА меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. Порядок действий в таком случае см. в п. 9.7.

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 считается отрицательным, 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 и снова повторить анализ.

9.3. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим РНК ВГА, 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.

9.5. При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» возможно использование программы «РеалБест Диагностика», которая выполняет все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. До-

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

пускается 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.

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