

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«26»

105

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения

ДНК вируса гепатита В методом ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест ВГВ ПЦР»

(вариант 1/количественный)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В методом ПЦР в режиме реального времени (РеалБест ВГВ ПЦР)» (вариант 1/количественный) предназначен для выявления и количественного определения ДНК вируса гепатита В (ВГВ) в сыворотке (плазме) крови методом, основанным на амплификации фрагмента ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор реагентов может быть применён как для высокочувствительного скринирования донорской крови (тестирование индивидуальных образцов и минипулов), так и в клинической практике для диагностики гепатита В, определения вирусной нагрузки и оценки эффективности противовирусной терапии.

Выделение ДНК ВГВ из сыворотки (плазмы) крови проводится с помощью наборов: «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «РеалБест экстракция 1000» или «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного специфического фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности,

достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq-полимеразой.

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

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в положительном контрольном и слабом положительном контрольном образцах, которые подвергаются процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок);
- слабый положительный контрольный образец (СПКО), лиофилизованный – 1 флакон;
- положительный контрольный образец (ПКО), лиофилизованный – 2 флакона;
- калибровочный образец 1 (КО1), лиофилизованный – 1 флакон;
- калибровочный образец 2 (КО2), лиофилизованный – 1 флакон;
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 2 флакона по 4 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа;
- завинчивающиеся пластиковые крышки для флаконов с контрольными и калибровочными образцами – 5 шт.;
- вкладыш с информацией о концентрациях ДНК ВГВ в КО1, КО2 и ПК0 – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диапазон определяемых концентраций (область линейности): от 100 МЕ до 10^8 МЕ ДНК ВГВ в объёме выделяемой пробы.

3.1. Специфичность выявления ДНК вируса гепатита В 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 четырём образцам с концентрацией ДНК ВГВ 5 МЕ в объёме выделяемой пробы, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП ДНК ВГВ (рег. № 05-2-211), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.3. Коэффициент вариации (К.В. в %) вычисляют для значений логарифма концентрации ДНК вируса гепатита В в образцах СОП. Коэффициент вариации не превышает 10%.

3.4. Тест на «линейность» – характеризует совпадение (в %) измеренного значения и предписанного значения (вычисленного с учётом фактора разведения) логарифма концентрации ДНК ВГВ в образце, приготовленном разведением из калибровочного образца КО1. Значение «линейности» находится в пределах 90-110%.

3.5. Диагностическая чувствительность выявления ДНК вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 206 положительных образцах сывороток и плазм крови от 181 больного гепатитом В в острой и хронической формах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК вируса гепатита В: клинические испытания, проведенные на 210 отрицательных образцах сывороток и плазм крови от 185 условно здоровых доноров крови, больных с другими инфекционными заболеваниями (больные гепатитом С, гепатитом А, ВИЧ-инфицированные пациенты) показали 100 % специфичность (интервал 98,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, 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»; 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:
«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, Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма «Eppendorf», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Biohit», Финляндия);
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- термощейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и при температуре (60-90) °С (например, Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N, фирма «BioSan», Латвия)
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTir», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- отсасыватель медицинский В-40 (фирма «Висма-Планар», Беларусь);
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл (фирма «SSI», США, кат. № 2340);
- магнитный штатив для пробирок (фирма АО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для проведения анализа использовать образцы сыворотки или плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА. Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из образцов сыворотки (плазмы) крови с помощью наборов для выделения нуклеиновых кислот (НК): «РеалБест ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ», «РеалБест экстракция 1000» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО в трёх повторах, СПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения НК.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

Внимание! в случае необходимости валидации аналитической системы в исследование должны быть также включены КО1 и КО2, в трех повторах каждый (см. Приложение 2).

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС, ПКО, СПКО (при необходимости КО1, КО2), в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку с ГРС, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО, 1 СПКО, 3 ПКО; при необходимости дополнительно 3 КО1 и 3 КО2) пробирок с ГРС. 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 при температуре хранения (2-8) °С 3 месяца.

6.2.2. Вскрыть флаконы с ПКО, СПКО (КО1, КО2) удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Снятую крышку и пробку поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Добавить 1 мл РВК, плотно закрыть флакон новой пластиковой крышкой, входящей в состав набора. Аккуратно перемешать, выдержать при комнатной температуре 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

ПКО, СПКО, КО1, КО2 после разведения хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы сорбента!

Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических

фрагментов ДНК ВКО, ДНК ВГВ и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

- 1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
- 2 стадия: 94 °С – 1 минута;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК ВГВ:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВГВ следует выбрать канал детекции «ROX».

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов

8.1.1. В ПКО и СПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВГВ (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ВГВ.

8.1.2. Результаты индивидуальной постановки ПЦР подлежат анализу и учёту, если для ПКО значение порогового цикла C_t ВГВ находится в диапазоне, указанном во вкладыше в наборы данной серии.

8.1.3. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

8.1.4. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

8.2. Учёт результатов

8.2.1. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО, СПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t$

$ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВГВ, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

8.2.4. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат.

Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

8.3. Количественный учёт результатов

Для количественного анализа рассчитать концентрацию ДНК ВГВ в исследуемых образцах в соответствии с Приложением 1.

Внимание: При условии выделения ДНК из образца объемом 1000 мкл, полученное значение соответствует концентрации ДНК ВГВ в МЕ/мл. Если выделение ДНК образца производилось из меньшего объема, полученное значение следует умножить на k , где $k=1000/\text{объем образца в мкл}$. Таким образом будет получена концентрация ДНК ВГВ, выраженная в МЕ/мл.

8.3.1. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГВ в образце находится в диапазоне от 100 МЕ до 10^8 МЕ ДНК ВГВ в объеме выделяемой пробы, результат определяется как положительный с указанием полученной концентрации ДНК ВГВ в образце (в МЕ/мл).

8.3.2. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГВ больше 10^8 МЕ в объеме выделяемой пробы, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГВ «больше 10^8 МЕ/ в объеме выделяемой пробы».

8.3.3. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГВ меньше 100 МЕ в объеме выделяемой пробы, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГВ «меньше 100 МЕ в объеме выделяемой пробы».

8.3.4. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК

ВГВ), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. 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.

9.2. 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.

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

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ВГВ ПЦР», 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