

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

11 апреля 2008 г.

Регистрационный № 057-0807

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК/РНК ВИРУСОВ  
ГЕПАТИТОВ В И С В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ  
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУО «Белорусская медицинская академия  
последипломного образования»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Г.Я. Хулуп, д-р мед. наук, проф. А.А.  
Ключарева, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. С.А. Костюк, мл. науч. сотр. Н.А.  
Бадыгина, канд. мед. наук Н.В. Голобородько, канд. мед. наук Н.Л. Сергейчик

Минск 2008

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Амплификатор (термоциклер).
2. Твердофазный термостат для пробирок типа «eppendorf».
3. Микроцентрифуги-вортексы.
4. Высокоскоростная микроцентрифуга.
5. Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой.
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 и 0,5 мл.
9. Штативы для микропробирок и наконечников.
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 и до 1000 мкл.
11. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл.
12. Холодильники с рабочей температурой +2–8°C с морозильной камерой.
13. Емкости с дезинфицирующим раствором.
14. Состав компонентов на проведение 48 выделений ДНК/РНК, включая контроли:
  - 14.1. Лизирующий раствор в объеме 23,2 мл.
  - 14.2. Раствор для отмывки — 32 мл.
  - 14.3. Этанол 70% — 60 мл.
  - 14.4. Ацетон — 32 мл.
  - 14.5. Сорбент — 1,6 мл.
  - 14.6. ТЕ буфер для элюции ДНК — 5 мл.
  - 14.7. РНК-элюент (DEPC-H<sub>2</sub>O) — 2,4 мл.
  - 14.8. Отрицательный контрольный образец (ОКО) — 2,0 мл.
  - 14.9. Положительный контрольный образец 1 и 2 (ПКО) — 0,04 мл.
  - 14.10. Внутренний контрольный образец (ВКО)— 0,52 мл.
15. Состав компонентов смеси ПЦР для выявления ДНК ВГВ:
  - 15.1. ПЦР-смесь-1-FRT (праймеры и нуклеотиды) раскапана под воск 0,005 мл.
  - 15.2. ПЦР-смесь-2-FRT (буфер и Tag-полимераза) — 0,8 мл.
  - 15.3. Полимераза (TagF) — 0,08 мл.
  - 15.4. ТЕ-буфер — 0,28 мл.
  - 15.5. Калибраторы положительного контрольного образца с известной концентрацией копий ДНК в мл по 0,025 мл.
  - 15.6. Калибраторы внутреннего контрольного образца с известной концентрацией копий ДНК в мл по 0,025 мл.
16. Состав компонентов смеси ОТ-ПЦР для реакции обратной транскрипции и амплификации для выявления ВГС:
  - 16.1. ДТТ лиофилизированный (хранить при –20°C).
  - 16.2. ОТ-ПЦР-1-FRT хранить при –20°C) — 1,2 мл.

16.3. ОТ-ПЦР-2-FRT (хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) — 0,8 мл.

16.4. Полимераза (TagF) (хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) — 0,08 мл.

16.5. ТМ-ревертаза (M-MLV) (хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) — 0,04 мл.

16.6. РНК-элюент.

16.7. Калибраторы положительного контрольного образца с известной концентрацией копий ДНК в мл по 0,025 мл.

16.8. Калибраторы внутреннего контрольного образца с известной концентрацией копий ДНК в мл по 0,025 мл.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Определение концентрации ДНК/РНК вирусов гепатитов В и С (ВГВ и ВГС) в плазме крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для установления показаний к противовирусной терапии и оценки ее эффективности.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Противопоказаний не имеется.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

**1. Лабораторное определение концентрации ДНК/РНК вирусов гепатитов В и С в плазме крови**

**1.1. Выделение ДНК/РНК – подготовка исследуемой пробы для амплификации**

1.1.1. В чистые 1,5 мл полипропиленовые пробирки внести по 450 мкл фенола, добавить в каждую пробирку по 130 мкл внутреннего контрольного образца.

1.1.2. Для каждой партии исследований ставить отрицательный контроль выделения ДНК/РНК и два положительных контрольных образца. Для отрицательного контроля в пробирку с фенолом добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца. Для положительных контролей в каждую пробирку добавить по 90 мкл ОКО и по 10 мкл соответствующего положительного контрольного образца (ПКО1 или ПКО2), перемешать на центрифуге-вортексе в течение 5 с и осадить капли жидкости с крышки.

1.1.3. В каждую пробирку соответствующей определенной биологической пробы добавить по 100 мкл исследуемой плазмы. Тщательно перемешать на центрифуге-вортексе в течение 10 с и инкубировать при комнатной температуре 10 мин. Центрифугировать пробирки на высокоскоростной микроцентрифуге при 12 тыс. об/мин в течение 15 с.

1.1.4. Добавить в пробирки по 100 мкл хлороформа. Перемешать на центрифуге-вортексе в течение 15 с. Центрифугировать пробирки на высокоскоростной микроцентрифуге при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин.

1.1.5. В чистые 1,5 мл полипропиленовые пробирки перенести 300 мкл верхней фазы, содержащие 700 мкл 100% изопропанола. Перемешать содержимое пробирок на центрифуге-вортексе в течение 5 с. Центрифугировать

с максимальной скоростью не менее 14.250 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Удалить супернатант.

1.1.6. Добавить в каждую пробирку по 1000 мкл 70% этанола. Центрифугировать пробирки на высокоскоростной микроцентрифуге при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин. Удалить супернатант из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

1.1.7. Полученный осадок подсушить в течение 20–30 мин при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми. В каждую пробирку добавить по 40 мкл РНК — элюента, пробирки закрыть, проинкубировать 10 мин при комнатной температуре, затем перемешать встряхиванием.

Полученный препарат очищенной ДНК/РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции амплификации.

При необходимости длительного сохранения раствор ДНК/РНК можно хранить только при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 2-х недель.

## **1.2. Реакция обратной транскрипции (ОТ) и амплификации**

### ***Синтез РНК ВГС***

1.2.1. Приготовить реакционную смесь в расчете на 12 реакций. Для этого в пробирку с лиофилизированной ДТТ последовательно добавить 300 мкл ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT, 200 мкл ОТ-ПЦР-смесь-2-FRT, 20 мкл полимеразы и 10 мкл ТМ-ревертазы, тщательно перемешивая на центрифуге-вортексе, и осадить капли с крышки пробирки.

1.2.2. В одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 мл внести по 25 мкл готовой реакционной смеси.

1.2.3. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавить 25 мкл РНК-пробы в пробирку с реакционной смесью, осторожно перемешать пипетированием, при этом избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ОТ-ПЦР.

1.2.4. Для каждой панели поставить 6 контрольных образцов-калибраторов (3 ДНК-калибратора ПКО и 3 ДНК-калибратора ВКО). Для этого в соответствующую пробирку внести по 25 мкл каждого калибратора. Для постановки отрицательного контроля ПЦР вместо РНК-проб внести 25 мкл РНК-элюента.

1.2.5. Поместить пробирки в карусель программируемого амплификатора. Программировать прибор по следующей программе:

Удержание	$-50^{\circ}\text{C}$ — 30 мин
Денатурация	$-95^{\circ}\text{C}$ — 15 мин
Циклирование	$-95^{\circ}\text{C}$ — 20 с
	$-60^{\circ}\text{C}$ — 40 с

Повтор цикла — 42 раза.

Флюоресценцию измерять при  $60^{\circ}\text{C}$  на каналах Fam и Joe.

### ***Синтез ДНК ВГВ***

1.2.6. Приготовить реакционную смесь в расчете на 12 реакций. Для этого в пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT добавить 200 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 20 мкл полимеразы (TagF), тщательно перемешав на центрифуге-вортексе в течение 15 с, осадить капли с крышки пробирок.

1.2.7. В одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 0,2 мл внести по 25 мкл готовой реакционной смеси.

1.2.8. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавить 25 мкл ДНК-пробы в пробирку с реакционной смесью, осторожно перемешав пипетированием, при этом избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

1.2.9. Для каждой панели поставить 6 контрольных образцов-калибраторов (3 ДНК-калибратора ПКО и 3 ДНК-калибратора ВКО). Для этого в соответствующую пробирку внести по 25 мкл каждого калибратора. Для постановки отрицательного контроля ПЦР вместо ДНК из биологических проб внести 25 мкл ТЕ-буфера.

1.2.10. Поместить пробирки в программируемый амплификатор.

Задать профиль реакции:

Денатурация	-95°C — 15 мин
Циклирование	-95°C — 20 с
	-60°C — 40 с

Повтор цикла — 42 раза.

Флюоресценцию измерять при 60°C на каналах Fam и Joe.

Выбрать способ калибровки.

### 1.3. Детекция результатов

Результаты амплификации участка ДНК ВГВ и кДНК ВГС детектировать по каналу JOE, результаты амплификации ВКО по каналу Fam.

1.3.1. Определить экспериментальные значения числа копий ДНК ВКО в каждой ПЦР-пробе, при этом значение коэффициента корреляции должно быть не менее 0,9.

1.3.2. Определить экспериментальные значения числа копий ДНК ВГВ и кДНК ВГС в каждой ПЦР-пробе, при этом значение коэффициента корреляции должно быть не менее 0,9.

1.3.3. Произвести расчет концентрации ДНК ВГВ и кДНК ВГС в исследуемых и контрольных образцах по следующим формулам:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГВ в ПЦР - пробе}}{\text{число копий ДНК ВКО в ПЦР - пробе}} \times \text{коэффициент} = \text{копий ДНК ВГВ/мл плазмы}$$
$$\frac{\text{число копий кДНК ВГС в ПЦР - пробе}}{\text{число копий ДНК ВКО в ПЦР - пробе}} \times \text{коэффициент} = \text{МЕ РНК ВГС/ мл плазмы}$$

Перерасчет значения концентрации кДНК ВГС в исследуемых образцах из МЕ/мл в копии/мл следует производить путем умножения полученного значения МЕ/мл на коэффициент пересчета, приводимый производителями в инструкциях к тест-системам.

## 2. Клиническая интерпретация результатов определения концентрации ДНК/РНК вирусов гепатитов В и С в плазме крови

Высокой концентрацией ДНК при хроническом гепатите В (ХГВ) следует считать  $1,0 \times 10^5$  копий/мл и выше.

Высокой концентрацией РНК при хроническом гепатите С (ХГС) следует

считать  $2,1 \times 10^6$  копий/мл и выше.

### **2.1. Значение определения концентрации ДНК ВГВ и РНК ВГС в формулировке показаний к противовирусной терапии ХГВ и ХГС**

Противовирусному лечению подлежат пациенты с концентрацией вирусов в крови выше порога определения. ДНК ВГВ-негативным или РНК ВГС-негативным пациентам противовирусное лечение рутинно не показано.

При ХГВ показания к противовирусному лечению формулируются исходя из оценки комплекса критериев, свидетельствующих о прогрессировании процесса в печени. При этом важное значение имеют признаки активности гепатита: гистологические (описываемые морфологом при пункционной биопсии печени) и лабораторные (наличие HBeAg, высокая концентрация ДНК ВГВ в плазме — выше  $1,0 \times 10^5$  копий/мл и повышение активности АЛТ).

### **2.2. Значение определения концентрации ДНК ВГВ и РНК ВГС в оценке эффективности противовирусной терапии ХГВ и ХГС**

Ответ на противовирусную терапию ХГС и ХГВ оценивается комплексно: выделяют биохимический, вирусологический, гистологический и полный ответ. Вирусологический ответ на лечение определяется как снижение концентрации ДНК/РНК в процессе терапии и в период после ее отмены.

При ХГВ вирусологическим ответом следует считать снижение концентрации ДНК ВГВ в плазме (менее  $1,0 \times 10^5$  копий/мл и вплоть до неопределяемых значений), а также потеря HBeAg у первично HBeAg-позитивных пациентов. Вирусологический ответ следует оценивать через 12 недель от начала лечения (ответ во время лечения) и через 6–12 месяцев после его завершения (продолжительный ответ).

При назначении противовирусной терапии препаратами интерферона- $\alpha$  пациентам с ХГС, имеющим 1 генотип ВГС, концентрацию РНК ВГС в плазме следует определять до лечения и через 12 недель после его начала. При снижении концентрации РНК ВГС на 2 lg (т.е. в 100 раз) и более от первоначальной, вплоть до концентраций ниже порога определения, констатируется ранний вирусологический ответ (РВО). При достижении РВО терапия должна быть продолжена до 48 недель, при его отсутствии лечение отменяется (т.к. в этом случае низка вероятность достижения устойчивого вирусологического ответа).

При назначении противовирусной терапии ХГС пациентам, имеющим 2 и 3 генотипы ВГС, определение РВО необязательно (с учетом высокой частоты устойчивого вирусологического ответа в данной группе). При ко-инфекции ВГС и ВИЧ срок оценки РВО — 24 недели от начала лечения.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. На преданалитическом этапе при получении плазмы в качестве антикоагулянта следует использовать 3,8% цитрат натрия или 3% ЭДТА. Кровь нельзя замораживать. Хранить плазму не больше 3 дней при температуре от 2 до 8°C и длительно при температуре –70°C.

2. Появление любого значения СТ в таблице результатов для отрицательного контрольного образца свидетельствует о наличии контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

3. Результаты положительных контрольных образцов должны укладываться в указанный в инструкции к тест-системе диапазон. Если полученные значения не укладываются в заданный диапазон, то это свидетельствует о неэффективном выделении ДНК, неверно приготовленной верхней ПЦР-смеси, а также других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.

4. При значении коэффициента корреляции R в окне «Standard Curve» менее 0,9 необходима перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа. Данный результат может свидетельствовать об ошибках пипетирования или других ошибках при постановке ПЦР.