

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53				МИ-10-038
Квантитативна детекција ДНК Хепатитис Б вируса у хуманој плазми <i>Real-Time PCR</i> методом					
Страна 1 од 6	Издање:	Важи од:	Сагласан	Одобрио	Копија број
	2	2025-02-05	Проф. Никола Танић	др Санда Лазих руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

HBV Real-TM Quant је тест у реалном времену за квантитативно откривање вируса хепатитиса Б у људској плазми и истовремено откривање ХБВ - специфичне интерне контроле (IC), детекцијом двоструке боје.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

HBV Real-TM Quant је тест у реалном времену за квантитативно откривање вируса хепатитиса Б у људској плазми. ХБВ ДНК се екстрахује из плазме, амплифицира коришћењем амплификације у реалном времену и детектује помоћу флуоресцентних репортерских проба специфичне за ХБВ или ХБВ IC. Интерна контрола (IC) служи као контрола амплификације за сваки појединачно обрађени узорак и за идентификацију могуће инхибиције. IC се детектује у каналу који није ХБВ ДНК. Праћење интензитета флуоресценције у реалном времену омогућава детекцију акумулираног производа без потребе за поновним отварањем реакционе тубе након амплификације.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Аналитичка специфичност

Аналитичка специфичност *HBV Real-TM Quant PCR* комплета је обезбјеђена избором специфичних прајмера и проба и строгим реакционим условима. Прајмери и пробе су тестиране на могуће хомологије са свим секвенцама депонованим у банкама гена анализом поређења секвенци, као и са геномском ДНК/РНК следећих организама и вируса: вирус хепатитиса А; вирус хепатитиса Ц; вирус хепатитиса Д; вирус хумане имунодефицијенције; цитомегаловирус; Епштајн - бар вирус; вирус херпес симплекса типа 1 и 2; вирус варицела - зостер; хумани херпес вирус типова 6 и 8; парвовирус B19; вирус крпељног енцефалитиса; енцефалитис западног Нила; аденовирус типови 2, 3 и 7; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes*; *Sagalactiae*; и *Homo sapiens*. Унакрсне реакције за горе наведене организме и вирусе нису откривене.

Аналитичка осетљивост

HBV Real-TM Quant PCR комплет омогућава детекцију ХБВ ДНК у 100% тестова са осетљивошћу од 30 IU/ml (вриједност добијена коришћењем *Magno Virus - Sacace* комплета, REF K – 2 – 16/1000 почевши од 1ml узорка обим).

ВРСТА УЗОРКА

1. Пуна крв сакупљена у ЕДТА треба раздвојити на плазму и ћелијске компоненте центрифугирањем на 800 - 1600xg током 20 минута у року од шест сати. Изолована плазма се мора пренијети у стерилну полипропиленску епрувету. Плазма се може чувати на 2-8 °C још 3 дана.
2. Алтернативно, плазма се може чувати на -18 °C до мјесец дана или 1 годину када се чува на -70 °C.
3. Не замрзавајте пуну крв.

Болница Бијељина	Страна 2 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-038
		2	2025-02-05	

4. Узорци антикоагулирани хепарином нису погодни за овај тест.
5. Одмрзните смрзнуте узорке на собној температури пре употребе.
6. Пуна крв се мора транспортовати на 2-25 °C и обрађивати у року од 6 сати од узимања. Плазма се може транспортовати на 2-8 °C или замрзнути.
7. Транспорт клиничких узорака мора бити у складу са државним и локалним прописима за транспорт етиолошких агенаса.

4. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Припрема пацијената се обавља према упутству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 10.2.

5. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

ЕДТА епрувете се могу користити са *HBV Real-TM Quant*. Слиједите упутства произвођача епрувета за узорке.

6. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

- Комплет за изолацију ДНК (само реф. B5–100/2 FTR);
- Биолошки кабинет;
- Столна микроцентрифуга за епрувете типа “eppendorf” (RCF макс. 16.000 к г); “Eppendorf 5415D” или еквивалентан;
- 60 °C ± 2 °C суви топлотни блок;
- Вортекс;
- Пипетори (капацитета 5-40µl; 40-200µl; 200-1000µl) са аеросол баријером;
- 1,5ml полипропиленске стерилне епрувете (**Sarstedt**, *QSP*, *Eppendorf*);
- Рукавице за једнократну употребу, без пудера;
- Сталци за тубе;
- Контејнер за биолошки отпад;
- 70% етанол (свеже припремљена мешавина 96% етанола и дестиловане воде);
- Ацетон;
- Фрижидер;
- RT-PCR апарат;
- Замрзивач.

7. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу се одвија према: УП-10-023: *Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом*; УП-10-138: *Обезбјеђивање и праћење услова радне средине у процесу испитивања*; УП-10-156: *Биосигурност у PCR лабораторији*; УП-10-142: *Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом*.

8. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

9. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

При доспијећу узорака у лабораторију додијељује им се уникатни број протокола према упутству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 4.3. Након тога слиједи обрада узорка која подразумева:

Болница Бијељина	Страна 3 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-038
		2	2025-02-05	

1. ЕКСТАКЦИЈУ ГЕНЕТИЧКОГ МАТЕРИЈАЛА (ДНК МОЛЕКУЛА);
2. ПРИПРЕМУ И ПОКРЕТАЊЕ РЕАКЦИЈЕ ЛАНЧАНЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (*RT - PCR*);
3. ИНТЕРПРЕТАЦИЈУ РЕЗУЛТАТА.

ПОСТУПАК ЕКСТРАКЦИЈЕ ДНК

Екстракција се обавља у биосигурносном кабинету класе II у просторији за изолацију нуклеинских киселина.

Материјал и опрему намијењене за обраду и рад у просторији за екстракцију користити искључиво на том простору за описане процедуре и не преносити из једне радне просторије у другу.

При раду се обавезно користе дупле једнократне нитрилне рукавице без пудера, које се често дезинфикују или мењају, нарочито ако дође до просипања течности или када постоји сумња на контаминацију.

Обавезно је ношење мантила (скафандера) који је намијењен само за простор за изолацију нуклеинских киселина.

Зависно од врсте произвођача разликују се и протоколи екстракције. Сваки екстракциони протокол/упутство се чува у електронској форми у Регистратору протокола у оригиналном или преведеном издању. Скраћене верзије и изводи из наведених упутстава се по потреби чувају на видном мјесту у просторији за екстракцију.

- Непосредно прије екстракције узорке извадити из фрижидера и темперирати на собној температури, припремити пипете, наставке са дуплим филтером за пипете, контејнере за лабораторијски отпад, тубе.
- Након пресипања узорка у адекватно обиљежене тубе од 2ml, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- Узорак прије изолације мијешати на вортексу, пажљиво отворити, уз мјере личне заштите и у биосигурносном кабинету, те пипетирати око 1,5ml у тубу за чување узорка на -80 °C или -20 °C, а потом слиједити инструкције произвођача екстракционог кита. Овако складиштени узорци се могу чувати годину дана на -20 °C, а на температури од -80 °C и дуже .
- Након пресипања узорка у адекватно обиљежене тубе, приступа се поступку екстракције према протоколу.

Кораци у поступку екстракције су:

1. лиза ћелија и ослобађање ћелијских елемената,
2. преципитација ослобођених молекула нуклеинских киселина, најчешће алкохолом,
3. испирање и пречишћавање,
4. елуција ДНК.

Након последњег корака, тј. елуције ДНК, изолована ДНК се пребацује у тубе од 1,5ml и уколико се истог дана припрема *Real time PCR* реакција, чува се у фрижидеру до момента спајања узорка са мастер миксом, а у супротном се одлаже у замрзивач на -20 °C до постављања *PCR* реакције.

- После рада очистити биосигурносни кабинет и кориштену опрему 1% натријум хипохлоритом потом 70% алкохолом или дестилованом водом и укључити УВ лампу. Спремити реагенсе и прибор за сљедећу употребу.

Болница Бијељина	Страна 4 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-038
		2	2025-02-05	

Може се користити било који комерцијални комплет (кит) за изолацију РНК/ДНК, ако је *IVD* - *CE* валидиран за типове узорака који су одвије наведени у параграфу „СКУПЉАЊЕ, СКЛАДИШТЕЊЕ И ТРАНСПОРТ УЗОРАКА“.

Препоручују се сљедећи комплекти за изолацију:

- *DNK/RNK - Prep* (*Sacace, REF K-2-9*);
- *Ribo - Sorb* (*Sacace, REF K-2-1*);
- *Magno virus* (*Sacace, REF K-2-16/1000*);
- *Ribo Virus* - комплет за екстракцију спин колоне (*Sacace, REF K-2-C*);
- *SaMag* комплет за екстракцију вирусних нуклеинских киселина (*Sacace, REF SM003*).

Екстракција ДНК се изводи према упутствима произвођача.

Припрема и покретање реакције ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*)

Провјерити да ли су сви неопходни уређаји и опрема одговарајући, калибрисани и функционални прије почетка рада. Ради добијања што прецизнијег резултата (да би се избјегла контаминација и добијање лажно позитивних резултата или потенцијална инхибиција) пожељно је поступке припреме реакције радити у одвојеним просторијама и придржавати се одређених мјера опреза:

- Носити чист мантил и рукавице приликом припреме узорака за *PCR* амплификацију (који нису ношени током руковања амплификованим *PCR* производима или током припреме узорка);
- Сви наставци за пипете и тубе за центрифугу морају бити ослобођени ДНаза и РНаза;
- Мастер микс припремати искључиво у просторији са том намјеном;
- Све компоненте *PCR* реакције одмрзнути (осим уколико произвођач не нагласи другачије) и вортексовати благо ради обезбјеђивања равномјерне дистрибуције свих;
- Кратким центрифугирањем спустите течност на дно тубе;
- Израчунати број реакција за тестирање и налити реагенсе по упутству произвођача (обухвата негативну контролу, позитивну контролу и узорке који се тестирају). Препорука је да се припреми мастер микс за још 2 додатне реакције да би се компензовале грешке у пипетирању;
- Припремити стрипове за *PCR* од 8 тубица сходно броју реакција;
- Уколико се као негативна контрола користи dH₂O, она се додаје одмах по разливању мастер микса, прије него што се пренесе у просторију за додавање узорака и позитивних контрола. У случају да се негативна контрола екстрахује паралелно са узорцима, тада се и она додаје у просторији за спајање узорака са мастер миксом;
- Припремљени мастер микс се кроз прозор преноси у просторију за спајање са узорцима;
- Сва опрема и реагенси који се употребљавају у просторији за мастер микс треба да остану у њој и да се не премјештају или користе у другим просторијама. Након припреме треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Спајање узорака са мастермиксом

У просторији за спајање узорака са мастер миксом потребно је такође користити све мјере опреза већ раније поменуте. Неопходно је пажљиво отворати и затварати тубице са узорцима и избјегавати прскање. Узорци се све вријеме држе на апарату за мјешање на температури од 4 - 8 °C (*ThermoMixer C*).

Болница Бијељина	Страна 5 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-038
		2	2025-02-05	

Реагенси и све компоненте неопходне за рад треба што је могуће дуже држати затворенима/поклопљенима како би се спримијела контаминација или инхибиција.

Када се додају сви узорци потребно је провјерити да ли су сви стрипови добро затворени, обиљежени и још једном их ставити на центрифугу како би садржај равномерно пао на дно био и спреман за *PCR* апарат.

Такође, сва опрема која се употребљава у просторији за спајање узорака треба да остане у њој и да се не премјешта или користи у другим просторијама. Након завршеног рада треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Покретање *PCR* апарата:

- Укључити апарат за *PCR* и програмирати га унапријед (према препорукама произвођача кита и упутству за руковање апаратом *Quant Studio 5*);
- Након тога покренути *PCR* реакцију. Поставке реакције (термални профил, читавање флуоресценције) претходно извршити према упутствима произвођача датог кита;
- Никад не отварати амплификоване *PCR* продукте;
- По завршетку реакције, не отварати реакционе тубе (стрипове), да не би дошло до контаминације, и одбацити их у складу са локалним препорукама и прописима;
- За прецизније инструкције за поставку *PCR* реакције погледати оригинално упутство произвођача датог кита. Сва упутства се чувају у лабораторији у оригиналном и/или преведеном издању.

Податке о реакцији ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*) уносимо у образац ОБ-10-146: *Радна листа ти – си – ар дијагностике*.

10. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Дефинисана количина интерне контроле (*IC*) се уноси у сваки узорак и контроле квалитета на почетку поступка припреме узорка како би се контролисао процес екстракције сваког појединачног узорка и идентификовала могућа инхибиција реакције.

Негативна контрола екстракције (*NCE*), негативна контрола амплификације (*NCA*), позитивна контрола екстракције (*C+*), позитивна контрола амплификације (*QS1/QS2 HBV*) су потребне у свакој реакцији да би се потврдило да су припрема узорка, амплификација и кораци детекције изведени исправно.

Ако су контроле квалитета ван свог очекиваног опсега (из табеле Резултати за контроле), сви узорци и контроле из те реакције морају бити обрађени почевши од корака припреме узорка.

11. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Није примењиво.

12. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

На основу амплификације стандарда за квантификацију и узорака, примјењује се формула:

$$\frac{\text{ХБВ ДНК копија по } PCR \text{ узорку}}{\text{IC DNK по } PCR \text{ узорку}} \times \text{коэффициент А} \times \text{коэффициент Б} = IU/ml \text{ у плазми}$$

Болница Бијељина	Страна 6 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-038
		2	2025-02-05	

Коефицијент А= $\frac{100}{\text{Волумен екстракције, } \mu\text{l}}$

13. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Сваки позитиван резултат је клинички значајан, за рано постављање дијагнозе или праћење ефикасности терапије на основу концентрације вируса у крви.

14. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати се издају на 3 - 21 дан.

15. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Узорак се разблажује за ред величине (10x, 100x...) и понавља анализа, са тим што се крајњи резултат множи са разблажењем.

16. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

17. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Тумачити у складу са клиничком сликом.

18. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Није примјењиво.

19. РЕФЕРЕНЦЕ

Оригинално упутство произвођача *HBV Real-TM Quant, Sacace Biotechnologies*.

Оригинално упутство за руковање *Quant Studio 5 PCR* апарат.

Оригинални научни радови који се баве тематиком *Real Time PCR* - а (Bustin et al, Vandesample et al...).