



КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РНК ВИЧ В ПЛАЗМЕ КРОВИ»

Тип клинических рекомендаций:
Правила проведения клинических лабораторных исследований

Разработчики:

¹Богословская Е.В., ¹Творогова М.Г., ¹Киреев Д.Е., ¹Куевда Д.А., ¹Шипулин Г.А.,
¹Анисимова Н.С., ²Шемшура А.Б., ³Сандырева Т.П., ⁴Нешумаев Д.А. ¹Покровский В.В.

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

²ФГУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии" Роспотребнадзора (Южный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД)»

³ГУ «Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»

⁴ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбы со СПИДом и другими инфекционными заболеваниями»

Ключевые слова: молекулярно-биологические методы, полимеразная цепная реакция, РНК, ВИЧ-инфекция, стандартизованные технологии.

Настоящая стандартизованная аналитическая технология устанавливает единые требования к определению концентрации РНК ВИЧ в клинико-диагностических и микробиологических (бактериологических) лабораториях медицинских организаций.

Одобрены на XVII форуме «Национальные дни Лабораторной медицины России» Общероссийской научно-практической Конференции «Эффективная лабораторная медицина: методы и средства анализа, способы организации и стандарты практики» в г. Москве 02 октября 2013 года.

Утверждены Профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 21 февраля 2014 года. Представлены от Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины».

Оглавление

1. Цели назначения молекулярно-биологического исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови»	4
2. Требования к обеспечению выполнения молекулярно-биологического исследования	4
2.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу	4
2.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала	5
2.3. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения молекулярно-биологического исследования	6
2.3.1. Лабораторное оборудование	6
2.3.2. Реактивы	8
2.3.3. Прочий расходуемый материал	9
3. Характеристика методик выполнения молекулярно-биологического исследования	9
3.1. Взятие образцов крови	9
3.2. Идентификация образца	10
3.3. Приемлемость образца для исследования	10
3.4. Описание хода выполнения молекулярно-биологического исследования	11
3.5. Описание стандартных операционных процедур	12
3.5.1. Выделение и очистка РНК	12
3.5.2. Принцип метода Real-Time ПЦР	13
3.5.3. Принцип метода разветвленной ДНК (branched DNA)	13
3.5.4. Результаты исследования и их интерпретация	14
3.5.5. Операционные характеристики	15
4. Регистрация результатов молекулярно-биологического исследования	16
5. Обеспечение качества выполнения молекулярно-биологического исследования	17
5.1. Программы обеспечения качества	17
5.2. Ведение регистрации контрольных мероприятий	17
5.3. Внутрилабораторный контроль качества исследования	18
5.4. Внешняя оценка качества	19
5.5. Непрерывное образование специалистов	19
6. Примерные трудозатраты на выполнение молекулярно-биологического исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови»	20
ЛИТЕРАТУРА	20

1. Цели назначения молекулярно-биологического исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови»

Исследование «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови» выполняют:

- до начала лечения - для оценки тяжести течения заболевания и прогноза эффективности антиретровирусной терапии, для измерения стартового значения концентрации РНК ВИЧ непосредственно перед началом приема антиретровирусных препаратов;
- в процессе лечения – для оценки эффективности проводимой антиретровирусной терапии.

2. Требования к обеспечению выполнения молекулярно-биологического исследования

2.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

Исследование «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови» имеют право проводить врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи и биологи, прошедшие первичную специализацию по клинической лабораторной диагностике и периодическое повышение квалификации в установленном порядке. Врачи и биологи должны иметь удостоверение о краткосрочном повышении квалификации «ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний» на лицензированных курсах.

Врачи клинической лабораторной диагностики, врачи-бактериологи, врачи-вирусологи и биологи осуществляют контроль всего технологического процесса и непосредственно выполняют этапы молекулярно-биологического исследования по определению концентрации РНК ВИЧ, требующие высокой квалификации и специальной подготовки, принимают решение о необходимости дополнительных исследований (повторное проведение измерения, исследование с разведением исходного образца, исследование с предварительным ультрацентрифугированием образца и т.п.). Врачи клинической лабораторной диагностики консультируют врачей-инфекционистов и помогают в интерпретации результатов исследований.

Подготовительную работу (прием поступающих в лабораторию образцов и сопроводительных документов, регистрацию полученного биологического материала, проведение технических манипуляций, не требующих высокой квалификации: подготовка помещений, ламинарных боксов, расходных материалов, утилизация использованных расходных материалов и остатков использованных биологических образцов) выполняет

специалист со средним медицинским образованием и соответствующей квалификацией (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант), имеющий сертификат специалиста и прошедший периодическое повышение квалификации в установленном порядке.

Врачи клинической лабораторной диагностики (врачи-бактериологи, врачи-вирусологи и биологи) должны знать:

- показания к назначению исследования, критерии оценки результатов исследования;
- все этапы подготовительной работы и проведения исследования: правила взятия крови, правила техники безопасности при работе с потенциально инфицированным биологическим материалом, требования к доставке и хранению материала, правила центрифугирования цельной крови для получения плазмы крови, методики проведения исследования.

Должны уметь:

- провести исследование «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови», обработать результаты.

2.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала

Исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови» выполняются в организациях, имеющих лицензию на осуществление медицинской деятельности, в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения данных работ, выданное в установленном порядке.

Исследования материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы, методами амплификации нуклеиновых кислот, связано с необходимостью одновременного обеспечения и соблюдения персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и/или ампликонами исследуемых проб, помещений, оборудования. Лица, отвечающие за сбор, доставку и анализ образцов крови, должны руководствоваться правилами и техникой безопасности при работе с биологическими материалами. Все образцы биологического материала, поступающего на исследование, необходимо считать потенциально опасными, т.к. могут содержать патогенные микроорганизмы.

Противоэпидемический режим работы лаборатории, выполняющей исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ» должен быть обеспечен в соответствии с СП 1.3.1285-03 и (или) СП 1.3.2322-08, регламентирующими работу с микроорганизмами I-II и III-IV групп патогенности соответственно. Допускается проведение данных исследований в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности

проведения работ с возбудителями III-IV групп патогенности, только в тех случаях, для которых разработаны и утверждены нормативные документы, регламентирующие порядок проведения таких исследований в условиях данной лаборатории (МУ 1.3.2569-09).

Персонал, непосредственно участвующий в проведении анализа «Определение концентрации РНК ВИЧ», обязан соблюдать общие правила работы в молекулярно-биологических лабораториях (МУ 1.3.2569-09), строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с пробами пациентов, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей (ГОСТ Р 52905-2007).

Организация помещений, требования к оборудованию и правила работы в лаборатории, выполняющей исследования по определению концентрации РНК ВИЧ должны соответствовать требованиям, изложенным в МУ 1.3.2569-09.

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в технологии (амплификаторы, центрифуги, термостаты и др.); персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

Для предупреждения пожаров необходимо соблюдать правила пожарной безопасности в соответствии с действующими нормативными документами.

Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, загрязненных остатками биологического материала, образующихся в процессе выполнения исследования, должна проводиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами (СанПиН 2.1.7.2790-10).

2.3. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения молекулярно-биологического исследования

2.3.1 Лабораторное оборудование

Все электрические устройства и приборы должны быть зарегистрированы на территории РФ, иметь сертификат соответствия ГОСТ Р Госстандарта России и отвечать требованиям соответствующих нормативных документов, что позволяет предотвратить их взрыво- и пожароопасность.

Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала:

- Бокс биологической безопасности III класса защиты или бокса биологической безопасности II класса защиты

- Центрифуга лабораторная для получения плазмы крови, обеспечивающая не менее 1600 g, для пробирок объемом 5 - 100 мл.
- Набор автоматических пипеток переменного объема.
- Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл или 2,0 мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
- Штативы для наконечников и микропробирок объемом 1,5-2,0 мл.
- Комбинированный холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и не выше минус 16⁰С.
- Морозильная камера, поддерживающая температуру не выше минус 68⁰С (при необходимости, в случае длительного хранения биологического материала).
- Емкость с регламентируемым дезинфицирующим раствором.
- Емкость с 70 % этиловым спиртом.

Зона выделения РНК из образцов биологического материала:

Бокс биологической безопасности II или III класса биологической защиты.

- Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5-2 мл или 5 мл с диапазоном рабочих температур 25 - 100⁰С.
- Настольная центрифуга для микропробирок типа «Эпандорф» объемом 1,5 -2 мл, до 10000g.
- Микроцентрифуга / Вортекс.
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
- Набор автоматических пипеток переменного объема.
- Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5-2,0 мл.
- Штативы для микропробирок на 1,5-2,0 мл и наконечников.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 и 1000 мкл с фильтром.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл.
- Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и не выше минус 16⁰С (для хранения наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот).

- Морозильная камера, поддерживающая температуру ниже минус 68⁰С (для хранения препаратов нуклеиновых кислот). **Не допускается хранение препаратов нуклеиновых кислот в одном холодильнике с компонентами набора для выделения нуклеиновых кислот!**
- Емкость с дезинфицирующим раствором.

С целью автоматизации процедуры выделения нуклеиновых кислот допускается использование автоматизированного оборудования.

Зона проведения реакции обратной транскрипции и этапа амплификации:

- Программируемые термоциклеры (персональные, многомодульные, с функцией амплификации в режиме «реального времени») и автоматизированные станции.
- Бокс биологической безопасности II и III класса или настольный бокс с бактерицидной лампой (ПЦР-бокс; УФ-бокс).
- Микроцентрифуга/Вортекс.
- Набор автоматических пипеток переменного объема.
- Штативы для микропробирок на 0,5 (0,2) мл и наконечников.
- Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 (0,2) мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл, свободные от РНКаз.
- Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8⁰С и от минус 18⁰С до минус 25⁰С (для хранения наборов, предназначенных для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот).
- Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

С целью автоматизации процедуры приготовления реакционных смесей для амплификации допускается использование автоматизированного оборудования.

Приведенный список оборудования является минимально необходимым, но может быть расширен в зависимости от использованного набора реагентов в соответствии с инструкцией.

2.3.2. Реактивы

Для проведения исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови» могут быть использованы только наборы реагентов, зарегистрированные на территории РФ в установленном порядке. Наборы реагентов должны содержать инструкцию, изложенную на русском языке и описывающую все этапы исследования. Инструкция должна содержать информацию о линейном диапазоне теста.

Набор реагентов или комплект наборов реагентов должен содержать все реагенты, необходимые для проведения всех этапов исследования (за исключением реагентов, указанных в инструкции как необходимые, но не входящие в комплектацию, напр., этанол).

2.3.3. Прочий расходуемый материал

Перчатки для работы, дезинфицирующие средства

3. Характеристика методик выполнения молекулярно-биологического исследования

3.1. Взятие образцов крови

Взятие крови производят натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа "Vacuett" с антикоагулянтом. В качестве антикоагулянта рекомендуется использовать ЭДТА. Пробирку аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. Взятие материала следует проводить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики.

Кровь должна поступать свободным током непосредственно в пробирку. Взятие крови шприцом без антикоагулянта с последующим переливанием в пробирку запрещено из-за формирования микросгустков и гемолиза.

В качестве антикоагулянта возможно использовать цитрат натрия. В этом случае венозная кровь набирается в пробирки, содержащие 3,8%-ный раствор цитрата Na, в соотношении 1:9. Однако при этом происходит значительное разведение крови, что влияет на конечный результат.

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Необходимо строго соблюдать объем взятой крови, который должен соответствовать указанной отметке на пробирке. Несоблюдение этого условия, а также недостаточно тщательное перемешивание крови приведет к изменению конечной концентрации антикоагулянта во взятой крови, что может повлечь за собой появление микросгустков, что приведет к неправильному определению концентрации РНК вируса.

Не следует использовать пробирки с выпаренным раствором ЭДТА, приготовленные в условиях лаборатории. При испарении на дне пробирки образуются крупные кристаллы, которые очень медленно растворяются в крови. Это может приводить к образованию фибриновых нитей в верхней части пробы крови.

3.2. Идентификация образца

В направлении на исследование должна быть включена следующая информация: фамилия, имя и отчество (инициалы) пациента, возраст или дата рождения, пол, отделение медицинского учреждения и палата (в стационаре), номер медицинской карты (идентификационный номер), диагноз с указанием стадии заболевания, дата и время сбора образца крови, время доставки образца в лаборатории, фамилия и инициалы врача, назначившего исследование. Должны быть перечислены все показатели, которые требуется исследовать. Если пациент получает антиретровирусную терапию, должны быть указаны принимаемые пациентом противовирусные препараты и дата начала терапии.

Немаркированные или неправильно маркированные образцы не пригодны для исследования, о чем необходимо уведомить врача-инфекциониста, назначившего анализ.

3.3. Приемлемость образца для исследования

После доставки образца крови или плазмы крови в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на анализ, маркировку пробирки (код или фамилия больного и другие данные должны быть идентичны данным, указанным в бланке-направлении) и зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме.

Так как точность результатов исследования во многом зависит от качества доставленного образца, необходимо неукоснительно следовать правилам сбора и транспортировки крови, четко контролировать время и условия хранения проб до выполнения анализа.

Требования к обработке и хранению образцов крови для определения концентрации РНК ВИЧ.

Кровь, собранная для определения концентрации РНК ВИЧ, может храниться температуре +2-8°C не более 6 часов. **Цельную кровь нельзя замораживать!**

Рекомендуется сразу после сбора доставлять образцы крови в лабораторию. Если такой возможности нет, образец крови должен быть центрифугирован не позднее 6 часов после взятия крови для получения плазмы крови.

Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600 g в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем отбирают плазму отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл (объем образца зависит от используемой методики).

Допускается не более чем трехкратное замораживание-оттаивание образца плазмы крови, поэтому образцы плазмы для длительного хранения желательно разлить небольшими

порциями (объем зависит от используемой методики) в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Образцы плазмы крови можно хранить:

- при температуре от 2 до 8⁰С – не более 3 суток;
- при температуре не выше минус 68⁰С – длительно (не менее 1 года).

Не рекомендуется хранить образцы плазмы крови при температуре минус 16-25⁰С.

Для определения концентрации РНК ВИЧ нельзя использовать кровь/плазму крови, если:

- наблюдаются признаки свертывания крови (присутствие микросгустков),
- наблюдаются признаки гемолиза,
- между временем сбора крови и получением плазмы крови прошло более 6 часов,
- кровь была заморожена.

Не следует использовать для анализа сыворотку крови ввиду значительного занижения количественных результатов.

3.4. Описание хода выполнения молекулярно-биологического исследования

Исследование «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови» должно проводиться с использованием наборов реагентов, зарегистрированных на территории РФ в установленном порядке. Набор реагентов или комплект наборов реагентов должен содержать все реагенты, необходимые для проведения всех этапов исследования (за исключением реагентов, указанных в инструкции как необходимые, но не входящие в комплектацию, напр., этанол).

При проведении исследования нельзя использовать реагенты из наборов реагентов разных производителей, если это не предусмотрено инструкцией!

Не рекомендуется использовать реагенты из разных лотов и разных комплектов одного производителя. В противном случае необходима самостоятельная валидация теста с использованием контрольных материалов (если это предусмотрено и детально описано в инструкции к набору реагентов).

При проведении мониторинга концентрации РНК ВИЧ в плазме крови у одного пациента рекомендуется пользоваться наборами реагентов одного формата и одного производителя.

Стандартизованная технология состоит из 4-х основных этапов:

1. первичная обработка биологического материала;
2. выделение и очистка РНК;
3. реакция амплификации (либо реакция разветвленной ДНК) с детекцией продуктов;
4. анализ и обработка результатов с помощью компьютерных программ.

Все этапы технологии должны выполняться в строгом соответствии с инструкцией к набору реагентов.

3.5. Описание стандартных операционных процедур

Для определения концентрации РНК ВИЧ используются молекулярно-биологические методы, основанные на двух принципах:

1. Полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real-Time ПЦР).
2. Метод разветвленной ДНК (branched DNA).

3.5.1. Выделение и очистка РНК

Первым этапом молекулярно-биологического исследования при использовании любого из названных методов является выделение и очистка РНК из образца плазмы крови. Для этого используют реагенты, входящие в состав набора. Стандартные этапы выделения и очистки РНК состоят из лизиса с использованием хаотропных солей (напр., гуанидинтиоционата), очистки РНК от белков, полисахаридов и воды, сорбции РНК на частицах или преципитации на дно пробирки, элюции РНК в буфере. Для этапа выделения и очистки РНК могут быть использованы автоматизированные станции.

Выделенную из плазмы РНК не рекомендуется хранить более 30 минут при температуре +2 - 8⁰С из-за крайней нестабильности молекул РНК. При необходимости образец РНК может быть заморожен при температуре не выше минус 68⁰С сроком до 1 года.

Для повышения чувствительности исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови» может быть использована методика предварительного ультрацентрифугирования плазмы крови. Для этого 0,5-1 мл плазмы крови пациента центрифугируют в течение 1 часа при температуре +2 - 8⁰С при 24.000g или более, супернатант удаляют, а полученный осадок вирусных частиц выделяют по описанной в инструкции к набору реагентов методике. Показано, что при таких условиях, практически все вирусные частицы, содержащиеся в образце, осаждаются на дно пробирки.

Основные требования при проведении этапа выделения и очистки РНК

На этапе выделения РНК обязательно должен быть использован внутренний контрольный образец (ВКО), содержащий искусственно созданную молекулу РНК. ВКО с известной концентрацией РНК добавляется в каждую пробу на этапе выделения РНК и в результате проходит через все этапы анализа одновременно с изучаемым образцом крови. ВКО служит контролем эффективности выделения, амплификации (гибридации) и детекции. В некоторых наборах реагентов ВКО дополнительно может служить количественным

стандартом, относительно которого проводится расчет концентрации РНК вируса в образце.

При тестировании любого числа образцов крови (даже единичного образца) необходимо параллельно тестировать как минимум два положительных контрольных образца (ПКО) с высокой и низкой концентрацией РНК и один отрицательный контрольный образец (ОКО). При тестировании более 10 клинических образцов рекомендуется параллельно тестировать не меньше двух ОКО.

3.5.2. Принцип метода Real-Time ПЦР

При проведении исследования с использованием метода полимеразной цепной реакции следующим этапом анализа является реакция обратной транскрипции с последующей амплификацией кДНК с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров.

Для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени (Real-Time ПЦР) используют один или несколько дополнительных олигонуклеотидных зондов, комплементарных области, расположенной между праймерами. Данные зонды мечены специальными красителями и тушителями флуоресценции, которые при накоплении специфического продукта амплификации флуоресцируют при заданной длине волны. Для амплификации и детекции флуоресцентного сигнала используют специальные приборы, которые позволяют регистрировать флуоресцентный сигнал на каждом цикле ПЦР-амплификации. С накоплением специфического продукта амплификации уровень сигнала пропорционально растёт.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной пороговой линией положительного образца и величины «порогового цикла», C_t — цикла, на котором график флуоресценции пересек линию порога. Для калибровки реакции и проведения количественных расчетов с помощью специализированного программного обеспечения строят график зависимости величины порогового цикла от логарифма исходной концентрации стандартов, который имеет линейный характер. Далее, исходя из полученных значений пороговых циклов для исследуемых образцов, рассчитывают их концентрации по полученному калибровочному графику. Все описанные расчеты проводятся автоматически с помощью специализированного программного обеспечения.

3.5.3. Принцип метода разветвленной ДНК (branched DNA)

При определении концентрации РНК методом разветвленной ДНК к исследуемой РНК добавляется улавливающий зонд, один конец которого комплементарен мишени, а другой — определенному концу усиливающего зонда, который называют разветвленной ДНК. Эта молекула напоминает расческу, у которой все «зубья» представлены идентичными

последовательностями нуклеотидов, а «ручка» комплементарна первому олигонуклеотидному зонду. В системе также существует второй зонд, комплементарный «зубьям» усиливающего зонда и меченный флуорофором. Таким образом многократно усиливается сигнал флуоресценции (амплификация сигнала), который обнаруживают в случае наличия РНК мишени.

3.5.4. Результаты исследования и их интерпретация

Количественное измерение РНК, независимо от используемого метода, возможно благодаря использованию в анализе калибровочных образцов (стандартов) с известной концентрацией нуклеиновых кислот.

В различных наборах реагентов реализованы различные способы построения калибровочных кривых:

1. внешние калибровочные стандарты, содержащие РНК, используют для однократной калибровки каждого лота набора реагентов или каждой серии (постановки);
2. ДНК-калибраторы используются для расчета концентрации кДНК мишени; для расчета концентрации РНК вируса необходимо использовать концентрацию РНК ВКО, добавляемую в образец, и специальную формулу расчета.

Во всех наборах построение калибровочных кривых и последующий расчет концентрации вирусных частиц в исследуемом образце должен проводиться с помощью специализированных компьютерных программ, которые должны поставляться вместе с набором реагентов или устанавливаться одновременно с термоциклером и другим оборудованием, предназначенным для определения концентрации РНК ВИЧ.

Прежде чем анализировать результаты, полученные для образцов крови пациентов, необходимо оценить качество прохождения всего исследования. Только при соблюдении всех трех нижеперечисленных требований можно переходить к анализу результатов для биологических образцов:

1. ОКО должен давать валидный отрицательный результат.
2. Значения ПКО должны укладываться в заданный диапазон концентраций (для каждого лота данный диапазон может отличаться).
3. ВКО для анализируемых образцов должен соответствовать требованиям, указанным в инструкции к набору реагентов.

Для каждого набора реагентов важно знать линейный диапазон теста, который должен быть указан в инструкции к набору. Важно помнить, что при использовании предварительного ультрацентрифугирования образца плазмы крови линейный диапазон

исследования меняется. Условия ультрацентрифугирования и соответствующий линейный диапазон также должны быть указаны в инструкции.

В тех случаях, когда концентрация РНК, определенная в процессе исследования находится в пределах линейного диапазона используемого набора реагентов, исследование может считаться выполненным, и результат может быть выдан по установленной форме.

В тех случаях, когда концентрация РНК оказалась меньше нижнего порога линейного диапазона, существует три варианта решения:

1. Результат может быть выдан в виде значения меньше нижнего порога (напр., менее 50 копий/мл).
2. Если первое исследование было проведено без предварительного ультрацентрифугирования, то можно провести повторное исследование образца с предварительным ультрацентрифугированием (в соответствии с инструкцией).
3. Если инструкцией предусмотрено исследование из разного объема клинического материала, то можно провести повторное исследование образца из максимально большого объема.

В тех случаях, когда концентрация РНК оказалась выше верхнего порога линейного диапазона, исследование необходимо повторить, предварительно подвергнув образец плазмы крови разведению с помощью негативной плазмы крови (не содержащей РНК и антигенов ВИЧ и антител к нему). Если результат такого определения концентрации РНК находится в пределах линейного диапазона, его значение следует умножить на коэффициент разведения. Рекомендуется проводить разведение в 10 раз.

3.5.5. Операционные характеристики

Основные характеристики тестов для определения концентрации РНК ВИЧ — аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, линейный диапазон, воспроизводимость измерений. Поскольку РНК ВИЧ не входят в число аналитов, определяющих состав крови и мочи, изменения которых проявляются при разных формах патологии и определяемых в диагностических целях, ряд требований ГОСТ, определяющих качество таких методик, к ним применены быть не могут.

Аналитическая чувствительность отражает минимальное количество аналита (РНК) в мл образца, которое может быть обнаружено тестом в 100% случаев. Аналитическая чувствительность тестов, предназначенных для определения концентрации РНК ВИЧ, должна составлять 50 копий/мл и менее (такая чувствительность может быть достигнута при использовании ультрацентрифугирования большого объема образца). Требования к

такой чувствительности основываются на клинических рекомендациях, согласно которым антиретровирусная терапия может считаться эффективной только в том случае, если вирусная нагрузка составляет менее 50 копий/мл.

Аналитическая специфичность - способность теста определять данный конкретный анализ (РНК ВИЧ) в образцах, содержащих другие похожие анализы (например, РНК других вирусов, человека и др.). Учитывая значимость ложноположительных результатов, аналитическая специфичность тестов, предназначенных для определения концентрации РНК ВИЧ, должна приближаться к 100% (не менее 99%).

Линейный диапазон измерений - интервал, в пределах которого тест точно измеряет концентрацию РНК. Более важной в оценке тестов для определения вирусной нагрузки признана нижняя граница (порог) линейного диапазона (линейности), поскольку эта величина имеет большое значение для эффективного мониторинга терапии и должна быть ≤ 50 копий/мл или ≤ 50 МЕ/мл (порог эффективной супрессии вируса).

Воспроизводимость тестов, предназначенных для определения концентрации РНК ВИЧ, оценивают по значению коэффициента вариации. Для молекулярно-биологических тестов, основанных на методах амплификации мишени (сигнала), коэффициент вариации в среднем колеблется в пределах 30-35% (для значений концентрации РНК, представленных в абсолютных величинах, в копиях/мл или МЕ/мл).

4. Регистрация результатов молекулярно-биологического исследования

Результаты исследования регистрируют в лаборатории в рабочем журнале (в бумажной или электронной форме) и в унифицированной форме бланка выдачи результатов. Бланк должен содержать название лаборатории и медицинской организации; информацию о пациенте, достаточную для его идентификации; название биологического материала и всех исследуемых показателей; дату получения пробы и, если это необходимо, время получения; результаты исследования; название использованного набора реагентов, линейный диапазон измерения; фамилию подпись сотрудника, выполнившего исследование. Учитывая значимость исследования, с целью обеспечения дополнительного контроля, содержимое бланка должно быть заверено подписью заведующего лабораторией или другого уполномоченного сотрудника. Порядок выдачи результатов должен быть определен инструкцией, утвержденной руководителем медицинской организации. Все отказы от выполнения исследования крови необходимо регистрировать в рабочем журнале (в бумажной или электронной форме) с указанием их причин.

Концентрация РНК ВИЧ в плазме крови может быть представлена в копиях/мл и/или в МЕ/мл. Однако в большинстве российских и зарубежных рекомендаций по клинической интерпретации результатов вирусной нагрузки ВИЧ данный показатель представлен в копиях/мл. Поэтому целесообразнее представлять результаты в копиях/мл.

Следует учитывать, что если в ходе измерения величина вирусной нагрузки оказывается ниже границ линейного диапазона, результат должен быть выдан как «менее чем нижний порог линейного диапазона». Если величина вирусной нагрузки выше границ диапазона, рекомендуют разведение образца на один порядок и повторное тестирование с последующим увеличением полученного результата в 10 раз.

5. Обеспечение качества выполнения молекулярно-биологического исследования

5.1. Программы обеспечения качества

Программы обеспечения качества включают последовательный мониторинг каждого аспекта процедуры для обеспечения гарантии достаточно высоких возможностей диагностики и наблюдения состояния пациента. Программы обеспечения качества должны включать все этапы работы и устанавливать связи между всеми составляющими процесса (пациент, лаборатория, врач-инфекционист). Проведение контроля качества лабораторных исследований, заключающегося в тестировании контрольных материалов (внутрилабораторный контроль качества и участие во внешней оценке качества) является только одним из аспектов обеспечения качества. Контроль необходим и на этапах сбора образца, хранения, доставки, ручной обработки, ведения регистрации, выдачи документов. Нуждается в контроле также и техническая компетентность персонала, непрерывное продолжение образования. Для успешного осуществления всех контрольных мероприятий необходимо следовать правилам, изложенным в национальных стандартах ГОСТ Р 53133.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований» и ГОСТ Р ИСО 15189 —2009 «Лаборатории медицинские – частные требования к качеству и компетентности».

5.2. Ведение регистрации контрольных мероприятий

Регистрация проведения контроля должна осуществляться на всех уровнях: преаналитическом, аналитическом и постаналитическом, для каждого этапа должны быть разработаны и документированы правила проведения всех процедур.

Для врачей-инфекционистов должна быть разработана форма направления на исследование, включающая дату назначения и взятия пробы, информацию для идентификации пациента, диагноз, сведения о приеме лекарств.

Для персонала, осуществляющего взятие материала, должна быть разработана инструкция, содержащая условия подготовки пациента и процедуру взятия биоматериала. В инструкцию по доставке пробы должны быть включены условия и сроки хранения проб и правила безопасной транспортировки.

Для персонала лаборатории должны быть определены критерии для приема и отказа в приеме проб, требования по регистрации пробы в рабочем журнале с использованием непрерывной нумерации (например, в течение года), обработке, маркировке и хранению пробы до анализа.

Аналитический этап проводится в соответствии с инструкциями к наборам реагентов.

На постаналитическом этапе необходимо разработать правила оценки приемлемости результатов анализа, которые должны включать аналитическую достоверность по данным внутрилабораторного контроля качества, проверку правильности регистрации. Форма выдачи результатов должна быть утверждена в учреждении и согласована с лечебными отделениями.

Регистрация должна также охватывать контрольные материалы и оценку приборов.

В каждой лаборатории необходимо разработать алгоритм для обнаружения и коррекции ошибок, результатов, выходящих за контрольные пределы. Текст документа необходимо довести до сведения сотрудников, выполняющих исследования по определению вирусной нагрузки, документ должен быть доступен для использования.

Используемые наборы реагентов также должны регистрироваться в рабочем журнале, информация должна включать:

- номер лота и срок годности;
- дату использования;
- все результаты пациентов и контроля качества с использованием конкретного лота;
- идентификационные данные сотрудника, который выполняет исследование.

5.3. Внутрилабораторный контроль качества исследования

Внутрилабораторный контроль представляет собой систему повседневного слежения за точностью получаемых в лаборатории результатов. Для этого в каждой серии (постановке) должны тестироваться два ПКО с низкой и высокой концентрацией РНК. Результаты измерения ПКО должны укладываться в указанный производителем диапазон.

Также согласно Приказу МЗ РФ № 45 от 7.02.2000 г «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения

Российской Федерации» и Приказу МЗ РФ № 220 от 26.05.2003 г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» для проведения внутрилабораторного контроля качества исследований должны тестироваться аттестованные образцы, зарегистрированные и разрешенные к использованию в установленном порядке на территории РФ. Оценку погрешности количественных измерений, а также порядок проведения внутрилабораторного контроля следует выполнять в соответствии с названными приказами и ГОСТом 53133.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

Для контроля за контаминацией лаборатории продуктами амплификации необходимо проводить тестирование смывов не реже 1 раза в неделю (в соответствии с МУ 1.3.2569-09).

5.4. Внешняя оценка качества

Внешняя оценка качества необходима для подтверждения правильности результатов лабораторных исследований и сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях. Каждая лаборатория обязана участвовать в программах внешней оценки качества. Специальными организациями, имеющими лицензию на проведение межлабораторной оценки качества выполнения лабораторных исследований, в том числе молекулярно-биологических исследований, между лабораториями периодически (несколько раз в год) распределяются контрольные образцы с установленным содержанием РНК вирусов для контроля правильности проводимых исследований. Полученные лабораториями результаты регистрируются, и заключения рассылаются участвующим лабораториям для сравнительной оценки правильности выполнения исследования. В случае неудовлетворительной оценки результатов лаборатория должна принимать соответствующие меры для исправления своих ошибок.

5.5. Непрерывное образование специалистов

Для обеспечения качества анализа квалификация персонала должна соответствовать сложности выполняемого исследования. Весь персонал лаборатории должен периодически (раз в пять лет) проходить обучение на циклах усовершенствования, которые проводятся медицинскими образовательными учреждениями, имеющими соответствующую лицензию. Каждый специалист должен заниматься самообразованием. Лаборатория должна иметь доступную для пользования современную литературу,

включая периодические издания по лабораторной диагностике. Специалистам лаборатории необходимо участвовать в конференциях и семинарах.

Все этапы молекулярно-биологических исследований должен выполнять только специально обученный персонал.

6. Примерные трудозатраты на выполнение молекулярно-биологического исследования «Определение концентрации РНК ВИЧ в плазме крови»

Вид исследования	Трудозатраты в минутах*	
	Специалиста со средним образованием	Врача клинической лабораторной диагностики, биолога
Регистрация поступившего материала	5	
Получение плазмы крови, подготовка образца к исследованию	10	
Этапы молекулярно-биологического исследования		
Выделение и очистка НК		40** - 60
Проведение реакции обратной транскрипции и амплификации		30
Регистрация, оценка, расчет, интерпретация результатов		20

* Реальный расход времени зависит от использования конкретной методики и требует подтверждения с помощью хронометража в каждом лечебном учреждении:

** При использовании автоматизированных станций

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 4 мая 2011 г. N 99-ФЗ "О лицензировании отдельных видов деятельности".
2. Приказ Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ № 8 от 19 января 1995 г «О развитии и совершенствовании деятельности лабораторий клинической микробиологии (бактериологии) лечебно-профилактических учреждений».
3. Приказ Минздрава РФ № 380 25.12.1997 г. «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

4. Приказ МЗ РФ № 45 от 7.02.2000 г «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
5. Приказ МЗ РФ № 220 от 26.05.2003 г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».
6. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 23 июля 2010 г. N 541н "Об утверждении Единого квалификационного справочника должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел "Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения".
7. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 25 июля 2011 г. N 801н "Об утверждении Номенклатуры должностей медицинского и фармацевтического персонала и специалистов с высшим и средним профессиональным образованием учреждений здравоохранения".
8. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.12.2012 № 1183н «Об утверждении номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников»
9. ГОСТ Р 52905-2007 «Требования безопасности».
10. ГОСТ Р 53022.2-2008. «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)».
11. ГОСТ Р 53079.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования».
12. ГОСТ 53133.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».
13. ГОСТ Р ИСО 15189-2009 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности».
14. СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

15. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных заболеваний».
16. СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
17. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».
18. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство / под ред. акад. РАМН В.В. Покровского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 608 с.
19. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services (DHHS). - 2013. – 267 p. URL: <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>