

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

«Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК боррелий комплекса
Borrelia burgdorferi sensu lato методом полимеразной цепной реакции в режиме
реального времени
«РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*»
(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*» предназначен для выявления ДНК патогенных для человека видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 2 предназначен для применения с региструющими амплификаторами как роторного («Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия)), так и планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора и суспензии клещей.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК (заключающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная де-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и м.н.с. Лаборатории ПЦР Бондаренко Е.И.

натурация, гибридизация праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка ДНК из искусственно сконструированной ДНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии подготовки проб к выделению.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка 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 ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Taq-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 ДНК возбудителя в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов и её детекции обеспечивается выделением ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 2):

- Реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок (на 10 определений каждая);
- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора – выявление 100 копий ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* в пробе.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100% .

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

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 и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-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 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 предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов 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»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия); «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, оборудованный УФ-лампой (например, «Циклотемп», СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8)°C;

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

– миницентрифуга/вортекс типа Комбиспин FVL-2400N (фирма Биосан, Латвия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Леипипет, Россия; фирма Biohit, Фин-

ляндия);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неонудренные латексные или неопреновые (фирмы NeoTouch, Ansell HealthCare, Германия);

- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром/аэрозольным барьером (фирма FinnTir, Финляндия);

- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);

- емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, синовиальной жидкости и суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенную ДНК хранить в течение 2 суток при температуре от 2 до 8 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО, 1 ПКО) пробирок с лиофилизированной реакционной смесью для ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС сразу 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 от 2 до 8 °С.

7.2. В пробирку с РС внести 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения допускается хранить РС при температуре от 2 до 8 °С не более 7 дней.

7.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом

0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.4. Во все пробирки внести пипеткой, используя наконечник с фильтром, по 25 мкл разведенной реакционной смеси для ПЦР.

7.5. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК (не захватывая осадок!), используя для каждого образца индивидуальный наконечник. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 25 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. В пробирку, маркированную «ПКО», внести 25 мкл положительного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. Плотнo закрыть крышки пробирок.

7.6. Проведение анализа с помощью амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

Далее по тексту каналы детекции и термины, соответствующие модели амплификатора «Rotor-Gene 6000» указаны в скобках.

7.6.1. Поместить пробирки в амплификатор.

Внимание! Лунка №1 ротора обязательно должна содержать какой-либо исследуемый образец.

7.6.2. Программирование прибора:

- 1) Нажать кнопку «New» в основном меню программы.
- 2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента «Advanced» и выделить «Dual Labeled Probe». Нажать кнопку «New».
- 3) Выбрать ротор на 36 лунок «36-Well Rotor», и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками. Нажать кнопку «Next».
- 4) В открывшемся окне выбрать объем реакционной смеси 50 мкл. Нажать кнопку «Next».
- 5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку «Edit Profile» и задать следующие параметры:

1. Hold 94°C – 1 мин

2. Cycling 94 °C – 10 сек

60 °C* – 40 сек

Cycle repeats (количество циклов) – 50 times.

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C в каналах FAM и ROX (для прибора Rotor-Gene 6000 – в каналах Green и Orange).

6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку «OK».

7) В окне «New Run Wizard» нажать кнопку «Calibrate» («Gain Optimisation»). В открывшемся окне в строке «Channel Settings» выбрать каналы «ROX» («Orange») и «FAM» («Green»). Установить «Tube Position» 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10. Отметить галочкой «Perform Calibration Before 1st Acquisition». Нажать кнопку «Close».

8) Нажать кнопку «Next», запустить амплификацию кнопкой «Start run».

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием РеалБест с расширением *.ret. Тогда при дальнейшей работе программа РеалБест будет представлена в списке «New» в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Start run» в файл с расширением *.tex.

7.7. Проведение анализа с помощью амплификатора планшетного типа.

7.7.1. Поместить пробирки в амплификатор.

7.7.2. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7.3. Задать протокол проведения амплификации:

1 стадия: 94 °C – 1 мин

2 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C* – 20 сек)

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7.4. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l. и ВКО:

для регистрации результатов амплификации ДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l. – канал детекции «ROX».

7.7.5. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положи-

тельным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору. Задать объем реакционной смеси - 50 мкл.

7.7.6. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Анализ результатов ПЦР в случае использования амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

8.1.1. Анализ результатов амплификации ВКО:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. FAM» («Cycling A. Green»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 5%.
- 6) В меню «CT Calculation» (в правой части окна) выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.1.2. Анализ результатов амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. ROX» («Cycling A. Orange»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 15%.
- 6) В меню «CT Calculation» выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.2. Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) проводится программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов). При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов проводится в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* в канале «ROX» («Orange»).

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* в канале «ROX» («Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО и определять Ct ВКО.

9.4. 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.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» («Orange») больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения (Ct ВКО)_{ср} более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКО значение C_t в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные ре-

зультаты, 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.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l.» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

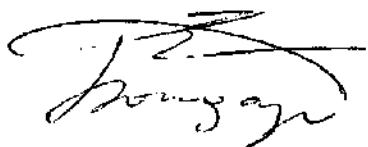
Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

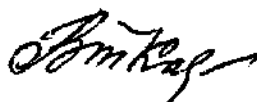
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52

М.н.с. Лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»



Е.И. Бондаренко

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского
Клинического Института им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)



В.И. Шумский



Принято,
принято,
и сержено нежно
девать меню
WJ