

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

_____ 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* и РНК вируса
клещевого энцефалита методом ПЦР/ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l./РНК ВКЭ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l./РНК ВКЭ» предназначен для выявления ДНК патогенных для человека видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*) и РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенных из клинических проб с помощью набора «РеалБест экстракция 100» методом ПЦР/ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l./РНК ВКЭ» может быть применён в клинической практике для анализа клинического материала (*образцов сыворотки (плазмы) крови, цельной крови, мочи, биоптатов, ликвора*), а также для исследования клещей.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного спе-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

10

цифического фрагмента ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* и кДНК ВКЭ (полученной методом обратной транскрипции из РНК ВКЭ), 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/кДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК/кДНК, 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 ДНК-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/РНК в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК/РНК вместе с анализируемыми биопробами.

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец (ПКО) – на основе вирусного фага со встройкой фрагментов РНК вируса клещевого энцефалита, и плазмидной ДНК со встройкой фрагмента ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* – 1 пробирка (1,0 мл);

– готовая реакционная смесь для ПЦР/ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);

– раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 флакона (по 4,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

– оптической плёнкой – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* и РНК ВКЭ в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* и РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия образцов контрольных сывороток крови (СПП ОКС)) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (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/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 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 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-287-113-00 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);
- термошейкер, оснащенный термоблоком для пробирок вместимостью 2 мл и позволяющий проводить встряхивание при 600-1300 об/мин и температуре 60-90 °С («Thermo Shaker TS-100», фирма BioSan, Латвия; или аналогичный);
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» с регулируемой скоростью вращения («Bio-Vortex V-1 plus», фирма BioSan, Латвия; или аналогичный);
- медицинский отсасыватель (B40, фирма Висма-Планар, Беларусь; или аналогичный);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);
- магнитный штатив для пробирок на 2 мл (ЗАО Вектор-Бест, Россия; или аналогичный);
- штативы для пробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ; или аналогичный).
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл (фирма SSI, США, кат. № 2340; или аналогичные).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК/РНК, полученные из клинического материала с помощью набора: «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению к соответствующему набору.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК/РНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК/РНК.

Внимание! Выделенная ДНК/РНК хранению не подлежит! Проводить выделение ДНК/РНК в день постановки ПЦР/ОТ-ПЦР.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с готовой реакционной смесью для ПЦР/ОТ-ПЦР (ГРС) в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью. 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 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

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

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК/РНК. Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции РНК ВКЭ и последующей амплификации специфических фрагментов кДНК ВКЭ, ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*, ДНК ВКО и детекции флуоресцентных сигналов в соответствии с инструкцией к используемому прибору. Протокол проведения реакции ОТ-ПЦР (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»):

1 стадия: 45°С – 30 мин;

2 стадия: 94°С – 1 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°С – 10 сек, 60°С – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

Примечание: для амплификации фрагмента ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* подходит протокол, содержащий предварительную стадию обратной транскрипции.

7.6. Выбрать канал детекции результатов амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*, к ДНК ВКЭ и ДНК ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* следует выбрать канал детекции «HEX».

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

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору. Задать объем реакционной смеси – 50 мкл.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест Диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

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

9.2. В отрицательном контрольном образце (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/кДНК по каналам «HEX» и «ROX».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сиг-

нала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

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

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим РНК ВКЭ, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналам «HEX» и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ 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.

9.8. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» или «HEX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ОТ-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 должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание компонентов 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 компонентов 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.

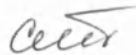
По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l./PHK ВКЭ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

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.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru.

Начальник отделения
ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе
ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В.Склифосовского ДЗМ»
профессор, д.м.н.

