

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для определения ДНК вируса Эпштейна-Барр методом

полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВЭБ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВЭБ» предназначен для определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), выделенной из клинических проб, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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.

Набор реагентов может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала (слюна, мазки со слизистой носоглотки, соскобы из цервикального канала).

Выделение ДНК вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) из клинического материала проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

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

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР.

Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК ВЭБ 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 интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-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 бактериальной ДНК в образце.

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

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК ВЭБ из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- Положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК возбудителей инфекций – 1 флакон (1 мл);
- Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 стрипированных пробирок (12 стрипов по 8 пробирок);

Набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (12 стрипов по 8 штук) или плёнкой оптической – 3 листа.

Внимание! ПКО должен пройти процедуру выделения ДНК с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции к соответствующему набору.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность - определение 100 копий ДНК ВЭБ в пробе - 100 %.

3.2. Специфичность определения ДНК ВЭБ (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) - 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/РНК 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 планшетного типа: «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);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (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 Biohit, Финляндия);
- штативы для микропробирок 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).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью набора для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

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

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

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать не менее 30 минут при температуре от 18 до 25 °С.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

7.1.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать 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. Оставшиеся неиспользованными стрипы с ГРС упаковать в целфеновый 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.

7.1.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе.



Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК.

7.3. Закрыть пробирки крышками или оптической пленкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК ВЭБ и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ПЦР:

1 стадия: 94°C – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94°C – 10 с, 60°C – 20 с).

Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.7. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ВКО в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ВЭБ в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролем согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВЭБ (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКВ;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВЭБ.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО.

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

9.5. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ВЭБ), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

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

9.6. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим ДНК ВЭБ, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Если для ПКО значение Ct ВЭБ больше 40 или не определяется, то все отрицательные результаты считаются недостоверными и требуют перестановки.

9.8. Если для ОКО значение Ct ВЭБ меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В случае контаминации все положительные результаты по 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 данной постановки, 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 наборов 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 наборов 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.

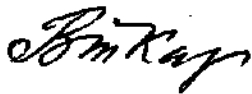
Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

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





Тренировано, проучено
и скреплено печатью
своих мест

Вруч