

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения

ДНК ВК вируса (ВКV) методом полимеразной цепной реакции  
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса (ВКV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», представляет собой набор реагентов для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления и количественного определения ДНК ВК вируса в клинических образцах пациентов (сыворотка крови, моча).

Основным свойством тест-системы является способность обнаруживать присутствие в исследуемом образце ДНК ВК вирусов методом ПЦР. Накопление специфического продукта ПЦР выявляется за счет нарастания интенсивности флуоресценции после освобождения флуоресцентной метки в результате разрушения Таq-полимеразой гибридизационного зонда, связавшегося со специфическим участком ДНК.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу ROX для регистрации накопления продуктов амплификации фрагментов ДНК ВК вирусов и ДНК ВКО по каналу FAM.

Постановку реакции следует производить в соответствии с требованиями безопасности при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, маске, сменном халате. Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.14-20-2005.

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса человека (ВКV) путем амплификации специфического фрагмента ДНК вируса методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор выпускается в комплекте, достаточном для проведения 60 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

## 2. СОСТАВ НАБОРА

1	ПЦР-смесь №1	1x455 мкл
2	ПЦР-смесь №2	5x104 мкл
3	Таq-полимераза (5ед/мкл)	1x16 мкл
4	Внутренний контрольный образец (ВКО)	1x700 мкл
5	Положительный контрольный образец (К+ ПЦР)	1x700 мкл
6	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	1x700 мкл
7	К1 (1x10 <sup>7</sup> ГЭ/мл)	1x300 мкл
8	К2 (1x10 <sup>4</sup> ГЭ/мл)	1x300 мкл
9	Инструкция по применению	1 шт.

**Внимание:** Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения ДНК. Для проведения исследований с помощью тест-системы дополнительно используют следующие реактивы, не входящие в его состав:

- Набор для выделения вирусной ДНК – любой марки.

### 3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

#### 3.1 Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением «Правил противоэпидемического режима при работе с микроорганизмами 3-4 группы патогенности».

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5%-ным раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку ПЦР осуществляют в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – выделение ДНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами, постановка ПЦР. Зона 3 – проведение амплификации. Пробы из Зоны 3 запрещается переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечению срока годности.

### 4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор для выделения вирусной ДНК («ДНК-сорб-В» АмплиСенс, «АмплиПрайм РИБО-преп» АмплиСенс или аналогичный любой марки).

4.2 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (CFX96 Bio-Rad, США; Rotor-Gene 3000/6000 Corbett Research, Австралия, или аналогичный любой марки).

4.3 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biosom» или любой другой марки) либо стерильный ламинарный шкаф (например, Kojair KR-125 Safety или любой другой марки).

4.4 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100<sup>0</sup>С (например, «Biosom» или любой другой марки).

4.5 Центрифуга-вортекс (любой марки).

4.6 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин. (любой марки).

4.7 Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (любой марки).

4.8 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Gilson» либо любой другой марки).

4.9 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.10 Пробирки свободные от РНКаз и ДНКаз типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл и на 0,2 мл.

4.11 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.12 Холодильник на 2 – 8<sup>0</sup>С и на минус 20<sup>0</sup>С, морозильник на минус 20<sup>0</sup>С.

4.13 Ёмкость для сброса наконечников.

## 5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 5.1 Выделение ДНК.

Реактивы для выделения ДНК НЕ ВХОДЯТ в состав настоящего набора и должны приобретаться дополнительно.

Выделение ДНК осуществляют с использованием соответствующих коммерческих наборов, согласно прилагаемой инструкции.

Перед началом выделения ДНК:

- Маркируют необходимое количество пробирок из расчета N+2, где N – количество исследуемых образцов.
- Вносят в каждую пробирку по 90 мкл исследуемого образца и 10 мкл ВКО.
- В пробирку ОКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ВКО.
- В пробирку К+ПЦР вносят 80 мкл ОКО + 10 мкл К+ПЦР + 10 мкл ВКО.

После чего приступают к выделению ДНК в соответствии с инструкцией к используемому набору.

5.2 Проведение ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

- Отобрать и промаркировать нужное количество (из расчета N+4, где N – количество исследуемых образцов) пробирок объемом 0,2 мл с прозрачной плоской крышкой;
- Отобрать нужное количество пробирок с ПЦР-смесью №2 (каждая пробирка предназначена для проведения 12 реакций);
- Разморозить реактивы, входящие в состав тест-системы. **Внимание:** Таq-полимеразу размораживать не нужно;
- В каждую пробирку с ПЦР-смесью №2 внести 91 мкл ПЦР-смеси №1 и 3 мкл Таq-полимеразы, тщательно перемешать, осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с);
- Полученную реакционную смесь внести по 15 мкл в промаркированные пробирки.
- Внести в каждую пробирку по 10 мкл ДНК исследуемых образцов.
- Внести по 10 мкл контрольных образцов ОКО и К+ПЦР. Для получения корректного результата реакции ОКО и К+ПЦР должны проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения ДНК.
- Внести по 10 мкл ДНК-калибраторов К1 и К2 в соответствующие пробирки. **Внимание:** первым необходимо вносить ДНК-калибратор К2, затем К1, для предотвращения контаминации.
- Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.
- Запрограммировать амплификатор с оптическим модулем следующим образом:

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Преденатурация	95 <sup>0</sup> С	5 минут	1
2	Денатурация	95 <sup>0</sup> С	15 сек	40
	Отжиг Детекция флуоресцентного сигнала*	55 <sup>0</sup> С	45 сек	

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется:

Для ВКО - по каналу для флуорофора FAM

Для ДНК ВК вирусов - по каналу для флуорофора ROX

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Указать прибору, в каких ячейках находятся ДНК-калибраторы и их концентрацию.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора ROX и FAM. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы ДНК ВК вирусов.

**Внимание:** Для проведения анализа на приборе Rotor Gene (или аналогичном) должны быть установлены следующие настройки:

«Dynamic tube»/ «Динамический фон» - включить

«Slope correct»/ «Коррекция уклона» - включить

«Outlier Removal» / «Устранение выбросов» - значение NTC threshold/Порог фона – 10%

«CT Calculation» / «Вычисление СТ» - значение Threshold/ Порог = 0.05

При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции, а также концентрация вирусной ДНК в исследуемых пробах, которая автоматически высчитывается программным обеспечением амплификатора на основании Ct ДНК-калибраторов.

Интерпретируют результаты следующим образом:

- ДНК ВК вирусов обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла  $Ct \leq 37$ .
- Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если для пробы с ОКО получен отрицательный результат, для пробы К+ПЦР получено пороговое значение  $Ct \leq 37$ , для ВКО в каждой пробирке по каналу FAM пороговое значение  $Ct$  находится в пределах  $28 \pm 5$ .
- Если для положительных контролей значение порогового цикла отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, для которых отсутствует значение порогового цикла.
- Если для ВКО в пробе значение порогового цикла отсутствует или выходит за границы  $28 \pm 5$ , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, для которых отсутствует значение порогового цикла или значение  $Ct$  выходит за пределы  $28 \pm 5$ .
- Если для отрицательного контроля ОКО определено значение порогового цикла  $Ct \leq 37$ , необходимо повторить исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла.

## 6. ФОРМА ВЫПУСКА

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса (ВКВ) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией» выпускается в виде упакованного набора. Набор выпускается в комплекте, достаточном для проведения 60 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

## 7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Набор хранят при  $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Транспортирование набора должно производиться при температуре  $(+2,0 \pm 2)^\circ\text{C}$  в течение суток.

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.