

**ТЕСТ-СИСТЕМА
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ
С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ–
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
«БЕЛАР-ГЛПС–ПЦР/РВ»**

инструкция по применению

Минск, 2015 г.

Тест-система «Белар-ГЛПС–ПЦР/РВ» представляет собой набор реагентов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с целью выявления РНК вирусов: Пуумала, Добрава, Хантаан, вызывающих геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС).

Основой диагностической тест-системы являются специфические олигонуклеотиды (праймеры) и гибридизационные пробы, комплементарные нуклеотидным последовательностям генов, кодирующих нуклеокапсидные белки вирусов и фланкирующие фрагменты геномов вируса Пуумала размером 224 нуклеотидных основания (н.о.), вируса Добрава размером 137 н.о., вируса Хантаан размером 191 н.о.

Основным свойством диагностической тест-системы является ее способность выявлять РНК вирусов ГЛПС в клинических образцах пациентов с подозрением на ГЛПС (плазма крови), а также в органах (легкие) мышевидных грызунов, отловленных в природных очагах. 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 вирусов Добрава и Хантаан; по каналу FAM для регистрации продукта амплификации ДНК вируса Пуумала и ДНК ВКО.

Постановку реакции следует производить, как это принято 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

Диагностическая тест-система предназначена для одновременного выявления РНК-генама вирусов Пуумала, Добрава, Хантаан, вызывающих геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) в клинических образцах пациентов (плазма крови), а также в органах (легкие) мышевидных грызунов, отловленных в природных очагах, методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени по технологии TaqMan (с использованием гибридизационно–флуоресцентных проб).

Тест-система рассчитана на проведение исследования 50 образцов.

2. СОСТАВ НАБОРА

2.1	ПЦР-смесь-1/PUU/HANT	5 эп. (640 мкл)
2.2	ПЦР-смесь-2/DOV/ВКО	5 эп. (560 мкл)
2.3	TrueStart™ Taq ДНК полимеразы (5ед/мкл)	1 эп. (80 мкл)
2.4	ПКО/ PUU, ПКО/ HANT, ПКО/ DOV	3 эп. (50 мкл)
2.5	Положительная контрольная проба К ^{+PUU} ОТ-ПЦР	5 эп. (100 мкл)
2.6	Внутренний контрольный образец	5 эп. (120 мкл)
2.7	Отрицательный контрольный образец – ОКО	1 эп. (500 мкл)
2.8	К- ПЦР	1 эп. (500 мкл)

Набор реагентов рассчитан для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с целью выявления РНК вирусов: Пуумала, Добрава, Хантаан, вызывающих ГЛПС.

Внимание: Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения РНК и постановки реакции обратной транскрипции (ОТ).

Для экстракции РНК из плазмы крови, из органов (легкие) мышевидных грызунов рекомендуется использовать набор реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ, либо аналогичный.

Для постановки ОТ рекомендуется использовать коммерческий набор реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ в соответствии с прилагаемой инструкцией.

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 2 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 РНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, постановка реакции обратной транскрипции, 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 реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ либо аналогичный для экстракции РНК из плазмы крови и органов (легкие) мышевидных грызунов.

4.2 Набор реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ - для постановки реакции ОТ.

4.3 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например IQ 5 Bio-Rad, США; Rotor-Gene 3000/6000 Corbett Research, Австралия.

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

4.5 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100 °С (например, «Biosom» или любой другой марки).

4.6 Термоциклер (например, Терцик производства «ДНК-технология», Россия; CG1-96 производства «Corbett Reserch», Австралия, либо аналогичный).

4.7 Центрифуга-вортекс (любой марки).

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

4.9 Вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой (любой марки).

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

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

4.12 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.13 Пробирки RNAase- и DNAase-free типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл или на 0,2 мл (в соответствии с требованиями к используемому амплификатору с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»).

4.14 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.15 Холодильник на 2 – 8 °С и на минус 20 °С, морозильник на минус 20°С.

4.16 Ёмкость для сброса наконечников.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 Подготовка материала для исследования.

5.1.1 Получение плазмы крови.

Для получения плазмы забор крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Кровь из шприца аккуратно, без образования пены, переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или 3,8% раствор цитрата Na в соотношении 1:9). Гепарин в качестве коагулянта использовать нельзя (ингибирует ПЦР)! Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 – 1600g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в объеме не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

5.1.2 Подготовка суспензии ткани органов (легкие) мышевидных грызунов.

Для исследования используется ткань легкого мелких грызунов, поскольку эпителиальные клетки легочной ткани являются одним из мест интенсивной репликации хантавирусов.

Готовят 10% либо 20% суспензии ткани легкого (вес/объем) на фосфатно-солевом буфере (далее - ФСБ) или на физиологическом растворе. Количество ткани легкого, взятого для приготовления суспензии, должно быть не менее 0,1 г вещества.

Дезинтеграцию ткани органа допускается проводить двумя способами:

- разрушают ткань с использованием механического дезинтегратора любой марки, имеющего скорость вращения от 5000 до 30000 об/мин. В предварительно взвешенную пластиковую пробирку помещают кусочек ткани легкого, взвешивают и добавляют буферный раствор в количестве, необходимом для получения 10-20% суспензии (для получения 10% суспензии к 0,2 г ткани добавляют 2 мл раствора). Обработку дезинтегратором проводят в течение 30 сек на холоду, после чего полученную взвесь осветляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-30 минут при 4 ± 2 °С. Надосадочную жидкость осторожно отбирают в стерильные одноразовые пластиковые пробирки и используют для анализа, при необходимости полученную суспензию ткани легкого можно хранить в замороженном виде (-20 - 80°С) не более года. Допускается только однократное размораживание пробы;

- разрушают ткань вручную. Для этого предварительно охлажденные фарфоровый пестик и ступка помещаются на лед, в ступку вносятся стерильный кварцевый песок (либо мелко колотое стекло) кусочек ткани легкого, предварительно взвешенный, и необходимый объем буферного раствора. После растирания ткани взвесь переносят в центрифужные пробирки, осветляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-

30 мин при 4 ± 2 °С, надосадочную жидкость осторожно отбирают в стерильные одноразовые пластиковые пробирки и используют для анализа.

5.2. Выделение РНК проводится в Зоне 1 согласно инструкции производителя к используемым наборам для выделения РНК.

ВНИМАНИЕ: тест-система укомплектована внутренним контрольным образцом (ВКО), который вносится в количестве 10 мкл в каждый исследуемый образец, а также в ОКО до начала процедуры выделения РНК для контроля этапа выделения генетического материала. Для контроля стадии выделения одновременно с исследуемыми образцами проводится выделение РНК из 100 мкл контрольных образцов (ОКО, K^{+PUU} ОТ-ПЦР).

5.3 Постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) – проводится в Зоне 2 – осуществляется с использованием коммерческого набора реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Полученная в результате кДНК используется в дальнейшем для постановки ПЦР.

5.4. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени – проводится в Зонах 2 и 3.

Выбор микропробирок (плашек) для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб комплементарной ДНК (кДНК), полученной в результате постановки ОТ (п.5.3) и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакционной смеси составляет 50 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ: полученная кДНК каждой анализируемой пробы исследуется в двух пробирках: с ПЦР-смесью-1/PUU/HANT и ПЦР-смесью-2/DOV/ВКО.

5.4.1 Разморозить, тщательно перемешать на вортексе ПЦР-смесь-1/PUU/HANT, ПЦР-смесь-2/DOV/ВКО, ПКО/ PUU, ПКО/ HANT, ПКО/ DOB, К- ПЦР и осадить капли с крышек пробирок с использованием микроцентрифуги.

5.4.2 Фермент TrueStart™ Taq ДНК полимеразу достать из морозильника, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки и поместить на хладоэлемент либо на ледяную баню.

Смешать в чистых отдельных пробирках реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно таблице:

Количество реакций*	Объем ПЦР-смеси, мкл (ПЦР-смесь-1/ PUU/HANT, либо ПЦР-смесь-2/ DOB/ВКО)	Объем Taq ДНК полимеразы, мкл
1	39,5	0,5
5	197,5	2,5
10	395	5
13	513,5	6,5
15	592,5	7,5
24	948	12

* - следует учитывать, что при проведении исследования для каждой ПЦР-смеси должны быть поставлены в обязательном порядке соответствующие контроли:

**ПЦР-смесь-1/
PUU/HANT**

- ПКО/ PUU
- ПКО/ HANT
- К ПЦР
- ОКО (кДНК, п.5.3)
- K^{+PUU} ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)

**ПЦР-смесь-2/
DOV/ВКО**

- ПКО/ DOB
- К ПЦР
- ОКО (кДНК, п.5.3)

Общий объем реакционной смеси составляет 50 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

5.4.3 Внести приготовленные смеси в микропробирки по 40 мкл. Используя наконечник с фильтром, добавить по 10 мкл кДНК исследуемых проб и необходимых контролей в пробирки с каждой реакционной смесью в соответствии с приведенной выше таблицей. Для удаления пузырьков и осаждения капель со стенок пробирок осуществить их кратковременное центрифугирование на микроцентрифуге-вортексе в течение нескольких секунд.

5.4.4 Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции продуктов реакции в режиме реального времени) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (находится в Зоне 3):

Цикл	Температура °С	Время	Количество циклов
1	95	3 мин	1
2	94	15 с	45
	54	30 с	
	72	45 с Детекция флуоресцентного сигнала по каналам FAM/ROX	

5.4.5 Установить микропробирки в ячейки реакционного модуля прибора и запустить выполнение программы.

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 вирусов Добрава и Хантаан и по каналу FAM для регистрации продуктов амплификации фрагментов ДНК вируса Пуумала и ВКО. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или, соответственно, отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ст».

Настройки для приборов роторного типа (Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и др.)

В меню основного окна Quantitation analysis/Количественный анализ должны быть активированы кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и «Slope Correct»/«Коррек. уклона». Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку Linear scale/Линейная шкала, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Лог.шкала). В меню окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) - 10%. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.03.

Настройки для приборов планшетного типа (iCycler iQ, iQ5 и др.)

Уровень пороговых линий устанавливается вручную в окне анализа результатов на минимальной высоте, обеспечивающей отсутствие пересечения с кривыми флуоресценции отрицательных образцов

Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения «Ст»), сомнительным во всех других случаях.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Образец считается положительным на наличие РНК вируса Пуумала, если при использовании ПЦР-смеси-1/PUU/HANT по каналу FAM получено значение порогового цикла «Ct».

Образец считается положительным на наличие РНК вируса Хантаан, если при использовании ПЦР-смеси-1/PUU/HANT по каналу ROX получено значение порогового цикла «Ct».

Образец считается положительным на наличие РНК вируса Добрава, если при использовании ПЦР-смеси-2/DOV/BKO по каналу ROX получено значение порогового цикла «Ct», а по каналу FAM определено значение порогового цикла «Ct», не превышающее граничное.

При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, а **значение порогового цикла «Ct» не должно превышать граничное значение – 40 цикл амплификаций, для ВКО – 35 цикл амплификации.**

Образец считается отрицательным на наличие РНК вируса Пуумала, если при использовании ПЦР-смеси-1/PUU/HANT по каналу FAM не определено значение порогового цикла «Ct».

Образец считается отрицательным на наличие РНК вируса Хантаан, если при использовании ПЦР-смеси-1/PUU/HANT по каналу ROX не определено значение порогового цикла «Ct».

Образец считается отрицательным на наличие РНК вируса Добрава, если при использовании ПЦР-смеси-2/DOV/BKO по каналу ROX не определено значение порогового цикла «Ct», а по каналу FAM определено значение порогового цикла «Ct», не превышающее граничное.

Образец считается сомнительным в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуются повторное ПЦР-исследование соответствующего образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных (ПКО/ PUU, ПКО/ HANT, ПКО/ DOV) и отрицательного (К-ПЦР) контролей амплификации, положительного (К^{+PUU} ОТ-ПЦР) и отрицательного (ОКО) контролей экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2 Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct (по всем каналам)
ПЦР-смесь-1/ PUU/HANT	ПКО/ PUU	ПЦР	По каналу FAM определено значение меньше граничного, по каналу ROX значение отсутствует
	ПКО/ HANT	ПЦР	По каналу ROX определено значение меньше граничного, по каналу FAM значение отсутствует
	К ^{+PUU} ОТ-ПЦР	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	По каналу FAM определено значение меньше граничного, по каналу ROX значение отсутствует,
	ОКО	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	По всем каналам значение отсутствует
	К ⁻ ПЦР	ПЦР	По всем каналам значение отсутствует

ПЦР-смесь-2/ DOV/ВКО	ПКО/ DOB	ПЦР	По каналу ROX определено значение меньше граничного, по каналу FAM значение отсутствует
	ОКО	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	По каналу ROX значение отсутствует, по каналу FAM определено значение меньше граничного
	К ПЦР	ПЦР	По всем каналам значение отсутствует

6. ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система «БЕЛАР-ГЛПС–ПЦР/РВ» выпускается в виде упакованного набора. Тест-система рассчитана на проведение исследования 50 образцов.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при (-20 ± 2) °С. Транспортирование осуществляют при температуре $(+2,0\pm 2)$ °С в течение суток.

Срок годности тест-системы – 6 месяцев с даты изготовления.