

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НОРОВИРУСОВ II
ГЕНОГРУППЫ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-
ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ
«НоВ II-ПЦР»
инструкция по применению**

«Тест-система для выявления норовирусов II геногруппы методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ II-ПЦР» представляет собой набор реагентов для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления кДНК норовирусов II геногруппы в клинических образцах пациентов (фекалии) и в объектах окружающей среды.

Основным свойством тест-системы является способность обнаруживать присутствие в исследуемом образце кДНК, комплиментарную РНК норовирусов II геногруппы методом ПЦР. Накопление специфического продукта ПЦР выявляется за счет нарастания интенсивности флюоресценции после освобождения флюоресцентной метки в результате разрушения Таq-полимеразой гибридационного зонда, связавшегося со специфическим участком кДНК, полученной с вирусной РНК.

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 кДНК норовирусов II геногруппы и кДНК 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

Тест-система предназначена для выявления кДНК, комплиментарной РНК норовирусов II геногруппы, в исследуемых образцах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Тест-система рассчитана на проведение 60 исследований, включая контроли.

2. СОСТАВ НАБОРА

1	ПЦР-смесь №1	1 x 0,455 мл
2	ПЦР-смесь №2 норо II	5 x 0,104 мл
3	Таq-полимераза (5ед/мкл)	1x0,033 мл
4	Положительный контрольный образец (ПКО)	1x0,3 мл
5	K ⁺ ПЦР норо II	1x0,3 мл
6	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	1x0,3 мл
7	Внутренний контрольный образец (ВКО)	1x0,7 мл
8	Инструкция по применению	1 шт.

Набор реагентов рассчитан для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с целью выявления кДНК комплиментарной РНК норовирусов II геногруппы.

Внимание: Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции.

Для проведения исследований с помощью тест-системы дополнительно используют следующие реактивы, не входящие в его состав:

- Набор для выделения вирусной РНК – любой марки;
- Набор для обратной транскрипции – 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 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 для выделения вирусной РНК («Рибопреп» АмплиСенс, или аналогичный любой марки).

4.2 Набор для обратной транскрипции («РЕВЕРТА», АмплиСенс, или аналогичный любой марки).

4.3 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, CFX96, IQ 5 Bio-Rad, США; Rotor-Gene 3000/6000 Corbett Research, Австралия.

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

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

4.12 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

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

4.14 Ёмкость для сброса наконечников.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 Выделение РНК и проведение обратной транскрипции.

Реактивы для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции НЕ ВХОДЯТ в состав настоящей тест-системы и должны приобретаться дополнительно.

Выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции осуществляют с использованием соответствующих коммерческих наборов, согласно прилагаемой инструкции.

Перед началом выделения РНК:

- 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 ПКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ПКО.

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

После выделения РНК проводят обратную транскрипцию в соответствии с инструкцией к используемому набору.

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

- Отобрать нужное количество пробирок с ПЦР-смесью №2 норо II (каждая пробирка предназначена для проведения 12 реакций);
- Разморозить ПЦР-смесь №1 и нужное количество пробирок с ПЦР-смесью №2;
- Отобрать и промаркировать нужное количество (из расчета N+3, где N – количество исследуемых образцов) пробирок объемом 0,2 мл с прозрачной плоской крышкой;
- В каждую пробирку с ПЦР-смесью №2 внести 85 мкл ПЦР-смеси №1 и 6 мкл Taq-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 кДНК исследуемых образцов.
- Внести по 10 мкл контрольных образцов ОКО и ПКО. **Для получения корректного результата реакции ОКО и ПКО должны проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения РНК.**
- Внести 10 мкл контрольного образца K⁺ ПЦР норо II. Данный контрольный образец используется для контроля только этапа ПЦР.
- Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.
- Запрограммировать термоциклер с оптическим модулем следующим образом:

	Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
1	Преденатурация	95 ⁰ С	5 минут	1
2	Денатурация	95 ⁰ С	15 сек	45
	Отжиг <i>Детекция флюоресцентного сигнала</i>	59 ⁰ С	45 сек	

Детекция флюоресцентного сигнала осуществляется:

Для ВКО - по каналу для флуорофора FAM

Для кДНК норовирусов II геногруппы - по каналу для флуорофора ROX

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флюоресцентного сигнала.

5.3 Анализ и интерпретация результатов.

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

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM (ВКО) и ROX (кДНК норовирусов II геногруппы).

Для проведения анализа на приборе (Rotor Gene, или аналогичный) 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

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы кДНК норовирусов II геногруппы. При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции.

Интерпретируют результаты следующим образом:

- кДНК норовирусов II геногруппы обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа, по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа.
- кДНК норовирусов II геногруппы не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа, по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла не определено, или $Ct \geq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \geq 40$ – для приборов планшетного типа.
- Результат реакции не валиден, если в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM значение порогового цикла не определено, или $Ct \geq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \geq 40$ – для приборов планшетного типа.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если:

- для пробы ОКО по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла не определено, или $Ct \geq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \geq 40$ – для приборов планшетного типа, по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа;
- для пробы ПКО по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа, по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа.
- Для пробы К⁺ ПЦР норо II по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла $Ct \leq 38$ - для приборов роторного типа, $Ct \leq 40$ – для приборов планшетного типа, по каналу для флуорофора FAM учет не производится.

6. ФОРМА ВЫПУСКА

«Тест-система для выявления норовирусов II геногруппы методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «НоВ II-ПЦР» выпускается в виде упакованного набора. Тест-система рассчитана на проведение 60 исследований, включая контроли.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

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

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