

**ТЕСТ-СИСТЕМА
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК-ГЕНОМА ВИРУСА
ЛИМФОЦИТАРНОГО ХОРИОМЕНИНГИТА (ЛХМ) МЕТОДОМ ПЦР
С ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
«Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ»**

инструкция по применению

Минск, 2015 г.

Диагностическая тест-система предназначена для проведения ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени с целью выявления РНК вируса ЛХМ в клинических образцах пациентов с подозрением на «вирусный лимфоцитарный хориоменингит» (плазма крови, сыворотка крови, ликвор), а также в органах мышевидных грызунов, отловленных в природных очагах.

Основой диагностической тест-системы являются специфические олигонуклеотиды (праймеры) и гибридизационная проба, комплементарные нуклеотидной последовательности генома вируса ЛХМ в 3'-нетранслируемой области S-сегмента и фланкирующие фрагмент генома размером 156 нуклеотидных оснований.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для выявления РНК-генома вируса ЛХМ в клиническом материале методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени по технологии TaqMan (с использованием гибридизационно-флуоресцентной пробы).

Тест-система рассчитана на 50 постановок, включая контрольные образцы.

2 СОСТАВ НАБОРА

Тест-система выпускается в виде набора, содержащего следующие компоненты:

1	ОТ – смесь №1 (на 5 постановок из 10 проб) (100 мкл)	5 пробирок
2	ОТ – смесь №2 (25 мкл)	1 пробирка
3	Обратная транскриптаза (200 ед/мкл) (25 мкл)	1 пробирка
4	ПЦР – смесь (на 5 постановок из 10 проб) (210 мкл)	5 пробирок
5	Taq - полимеразы (5 ед/мкл) (12,5 мкл)	1 пробирка
6	Положительная контрольная проба ОТ – К ⁺ ОТ (500 мкл)	1 пробирка
7	Положительная контрольная проба ПЦР – К ⁺ ПЦР (25 мкл)	1 пробирка
8	Внутренний контроль образца – ВКО (500 мкл)	1 пробирка
9	Отрицательный контрольный образец – ОКО (500 мкл)	1 пробирка
10	Вода (1500 мкл)	2 пробирки

Комплект рассчитан на проведение 50 реакций, включая контрольные образцы. Комплект хранится при минус 20°С.

Внимание: Тест-система **не укомплектована** набором реагентов для выделения генетического (РНК) материала. Экстракция РНК из биологического материала проводится с использованием наборов реагентов «РИБО-преп»; «РИБО-сорб» производства «Амплиценс», Россия; для выделения РНК из органов мышевидных грызунов рекомендуется использовать коммерческий препарат TRI-реагент BD (Sigma, США).

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 плазмы крови, сыворотки крови. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, постановка реакции обратной транскрипции, внесение проб в пробирки 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»; «РИБО-сорб» производства Амплисенс, Россия для выделения РНК из биологического материала (кровь, сыворотка, плазма, ликвор); коммерческий препарат TRI-реагент BD (Sigma, США) для выделения РНК из органов мышевидных грызунов.

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

4.3 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°C (например, «Biosom» или любой другой марки).

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

4.6 Вортекс (любой марки).

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

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

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

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

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

4.12 Пробирки РНК- и ДНК-free типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл или на 0,2 мл.

4.13 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.14 Холодильник на 2 – 8°C и на минус 20°C, морозильник на минус 20°C.

4.15 Ёмкость для сброса наконечников.

5 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Внимание:

1 Тест-система укомплектована внутренним контролем образца (**ВКО**), который вносится в каждый исследуемый образец (10 мкл) до начала процедуры выделения РНК, для контроля этапа выделения генетического материала.

2 В состав тест-системы входит положительный контроль процесса обратной транскрипции (**К⁺ОТ**) для контроля работы специфических праймеров и смеси реагентов. 100 мкл **К⁺ОТ** вносят в отдельную пробирку, вместо биологической жидкости, и продолжают процедуру выделения РНК.

Внимание! Для предотвращения контаминации **К⁺ОТ** рекомендуется вносить в пробирку в последнюю очередь, после помещения всех исследуемых образцов, включая **ОКО**, в пробирки для выделения РНК.

3 В отдельную пробирку вносят 100 мкл **ОКО** (отрицательный контроль образца).

Таким образом: на этапе выделения РНК дополнительно к биологическим образцам параллельно выделяют РНК из **двух** проб: **К⁺ОТ** и **ОКО**.

ВКО добавляют во все исследуемые образцы.

5.2 Постановка реакции обратной транскрипции - проводится в Зоне 2.

5.2.1 Готовят 0,5 мл (либо 0,2 мл) пробирки, пронумеровав и расположив их соответствующим образом в штативе. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора

5.2.2 Достают из морозильника **ОТ** – смесь и воду размораживают, пипетируют и осаждают на вортексе, оставляя в ледяной бане +4°С.

5.2.3 Для приготовления смеси необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать: **ОТ**–смесь №1, **ОТ**–смесь №2, обратную транскриптазу (достают из морозильника непосредственно перед приготовлением смеси) в количестве, указанном в таблице 1, в соответствии с количеством исследуемых проб (с учётом контрольных образцов).

5.2.4 Поставить контрольные реакции обратной транскрипции:

Положительный контроль – внести в пробирки с реакционной смесью 10 мкл РНК, выделенной из **К⁺ОТ**.

Отрицательный контроль – внести в пробирки с реакционной смесью 10 мкл РНК, выделенной из **ОКО**.

Таблица 1

Объём реагентов на одну реакцию (мкл)	10	0,5	0,5
Количество реакций	Объём «ОТ-смесь № 1»	Объём «ОТ-смесь № 2»	Объём «Обратной транскриптазы»
4	40	2	2
6	60	3	3
8	80	4	4
10	100	5	5
15	150	7,5	7,5
25	250	12,5	12,5

5.2.5 В каждую пробирку вносят по 10 мкл смеси и, используя наконечник с аэрозольным барьером, добавляют по 10 мкл РНК (общий объём реакционной смеси 20 мкл), выделенной из биологического образца, тщательно пипетируют с последующим центрифугированием для осаждения микрокапель со стенок пробирки.

Внимание! При добавлении РНК проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «РИБО-Сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5.2.6 Смесь инкубируют в термоциклере при 37°С в течение 30 мин.

5.2.7 кДНК разбавляют водой в два раза непосредственно перед постановкой ПЦР.

5.3 Постановка полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени - проводится в Зоне 2

5.3.1 Готовят 0,5 мл (либо 0,2 мл) пробирки, пронумеровав и расположив их соответствующим образом в штативе.

5.3.2 Достают из морозильника ПЦР – смесь и воду, размораживают, пипетируют и осаждают на центрифуге, оставляя в ледяной бане +4°С.

5.3.3 Для приготовления смеси необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать: ПЦР – смесь, воду, Таq-ДНК полимеразу (достают из морозильника непосредственно перед приготовлением смеси), в количестве, указанном в таблице 2, в соответствии с количеством исследуемых проб (с учётом контрольных образцов).

5.3.4 Внести в микропробирки по 45 мкл готовой реакционной смеси.

5.3.5 Используя наконечники с аэрозольным барьером, добавить по 5 мкл кДНК-пробы в пробирки с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.

5.3.5 Поставить контрольные реакции амплификации:

Положительный контроль – внести в пробирки с реакционной смесью 5 мкл К⁺ПЦР.

Отрицательный контроль – внести в пробирки с реакционной смесью 5 мкл воды.

Таблица 2

Объём реагентов на одну реакцию (мкл)	21	24	0,25
Количество реакций	Объём «ПЦР смеси	Вода	Объём «Таq-ДНК полимеразы»
4	84	96	1
6	126	144	1,5
8	168	192	2
10	210	240	2,5
15	315	360	3,75
25	525	600	6,25

5.3.6 Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции продуктов реакции в режиме реального времени) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

Температурный режим для ПЦР: 94°С – 2 мин – 1 цикл; циклирование: 94°С – 30 с, 54°С – 30 с, 72°С – 30 с – 45 циклов.

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется на этапе отжига праймеров по каналу FAM для детекции ВКО и по каналу ROX для детекции генетического материала вируса ЛХМ.

5.3.7 Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора и запустить выполнение программы.

5.4 Регистрация и оценка результатов – проводится в Зоне 3.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени». Учёт результатов проводят отдельно по каждому каналу. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу ROX для регистрации накопления продуктов амплификации фрагментов ДНК вируса ЛХМ и по каналу FAM для регистрации продукта амплификации ДНК 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 «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Для анализа результатов по каждому каналу необходимо установить на соответствующем уровне пороговую линию и включить необходимые опции обработки данных в соответствии с описанием для используемого прибора и набора реагентов в разделе «Проведение ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени» с использованием различных приборов».

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК вируса ЛХМ **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла Ct меньше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- кДНК вируса **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), либо его значение превышает указанное (граничное) значение.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора ROX, и по каналу для флуорофора FAM значение Ct также не определено (отсутствует). В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Внимание! Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для ВКО, положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct (35 цикл)	Значение порогового цикла, Ct (40 цикл)
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора ROX
K ⁺ OT	Выделение РНК, OT	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного
ОКО	OT–ПЦР	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного	Значение отсутствует, либо определено значение по пересечению пороговой линии больше граничного
K ⁺ ПЦР	ПЦР	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного
K ⁻ ПЦР	ПЦР	Значение отсутствует, либо определено значение по пересечению пороговой линии больше граничного	Значение отсутствует, либо определено значение по пересечению пороговой линии больше граничного

Возможные ошибки и их устранение:

1 Если для положительного контроля К⁺ПЦР значение порогового цикла по каналу для флуорофора ROX отсутствует, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК вируса.

2 Если для отрицательного контроля выделения ОКО и/или отрицательного контроля К⁻ПЦР зафиксировано значение порогового цикла по каналу для флуорофора ROX, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК микроорганизма, начиная с этапа экстракции РНК.

6 ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система «Белар-ЛХМ-ПЦР/РВ» выпускается в виде упакованного набора. Один набор рассчитан на проведение 50 анализов, включая контроли.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Хранение тест-системы должно производиться при температурах $(-20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ на протяжении всего срока годности.

Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 1 - 2-х суток. Срок годности тест-системы - 12 месяцев от даты изготовления.