

**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 <sup>+</sup> ОТ (500 мкл)	1 пробирка
7	Положительная контрольная проба ПЦР – К <sup>+</sup> 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 «Амплисенс», 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°С (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°С и на минус 20°С, морозильник на минус 20°С.

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<sup>+</sup>ОТ**) для контроля работы специфических праймеров и смеси реагентов. 100 мкл К<sup>+</sup>ОТ вносят в отдельную пробирку, вместо биологической жидкости, и продолжают процедуру выделения РНК.

**Внимание!** Для предотвращения контаминации К<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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 <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> ПЦР	ПЦР	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного	Определено значение по пересечению пороговой линии меньше граничного
K <sup>-</sup> 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<sup>+</sup>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<sup>-</sup>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±2)°С на протяжении всего срока годности.

Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре (4±2)°С в течение 1 - 2-х суток. Срок годности тест-системы - 12 месяцев от даты изготовления.