

Настоящая инструкция распространяется на тест-систему для выявления ДНК риккетсий, переносимых клещами, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией представляет собой набор реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления ДНК риккетсий в биопробах (клещи и др. кровососущие насекомые) и клинических пробах (кровь, ликвор).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления ДНК переносимых клещами риккетсий, в биопробах (клещи и др. кровососущие насекомые) и клинических пробах (кровь, ликвор). Тест-система рассчитана на проведение 50 исследований, включая контроли.

2. СОСТАВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Состав: тест-система выпускается в следующей комплектации:

Комплект 1

1. ПЦР-смесь-1	1 пр (300 мкл)
2. ПЦР-смесь-2/Рик//ВКО	5 пр.(140±5 мкл)
3. Taq-полимераза рекомбинантная горячего старта (5U/мкл)	1 пр.(35±1 мкл)
4. K+ Rickettsia	1 пр.(50±1 мкл)
5. Отрицательный контроль ПЦР (К-)	1 пр.(50±1 мкл)
6. Внутренний контрольный образец – ВКО	1 пр (500±5 мкл)
7. Инструкция по применению	1 шт.

Комплект 2

1 ПЦР-смесь-ОмрА	2 пр (300±5 мкл)
2 Taq-полимераза рекомбинантная горячего старта (5U/мкл)	1 пр.(35±1 мкл)
3 K+ Rickettsia-ОмрА	1 пр.(50±1 мкл).
4 Отрицательный контроль ПЦР (К-)	1 пр.(50±1 мкл)

Внимание: Тест-система не укомплектована наборами реагентов для выделения ДНК и маркером молекулярного веса двухцепочечной ДНК.

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

Набор для выделения ДНК – любой марки, предназначенный для работы с тем видом клинического материала, в отношении которого проводят детекцию риккетсий.

Маркер молекулярного веса двухцепочечной ДНК до 1 тысячи пар нуклеотидов с шагом в 50 или 100 пар нуклеотидов любого производителя.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность тест-системы в отношении ДНК риккетсий - 99 %;

4 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента предприятия-изготовителя каждая серия тест-системы должна быть проверена и принята отделом биологического контроля (ОБК) изготовителя на соответствие всем показателям ТУ ВУ 100558032.418-

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденных постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 6.01.2017 № 2

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) – приготовление ПЦР-смесей. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, выделение ДНК из проб биологического материала, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами. 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 тест-система строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать тест-система по истечению срока годности.

6 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

6.1 Набор для выделения вирусной ДНК («Рибопреп» АмплиСенс, или аналогичный любой марки).

6.2 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, CFX96, Bio-Rad, США; Rotor-Gene Q, Qiagene ФРГ, ДТ-96, Россия.

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

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

6.5 Центрифуга-вортекс (любой марки).

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

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

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

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

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

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

6.12 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

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

6.14 Ёмкость для сброса наконечников.

7 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

7.1 Выделение ДНК и проведение обратной транскрипции.

Реактивы для выделения ДНК и проведения реакции обратной транскрипции НЕ ВХОДЯТ в состав настоящей тест-системы 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 ПКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ПКО.

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

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

- Разморозить реактивы, входящие в состав тест-системы.
- Отобрать и промаркировать пробирку объемом 1,5 мл для приготовления ПЦР-смеси (из расчета $N+2$, где N – количество исследуемых образцов) пробирок объемом 0,2 мл с прозрачной плоской крышкой;
- В промаркированные пробирки для приготовления ПЦР-смесей внести:

Таблица 1 – Схема приготовления ПЦР-смеси

Компонент тест-системы	риккетсии
ПЦР-смесь №1	6мкл $\times(N+5)$
ПЦР- смесь-2/Рик//ВКО	14мкл $\times(N+5)$
Тaq-ДНК-полимераза	0,5мкл $\times(N+5)$

Где N – количество исследуемых проб

- После добавления каждого компонента тест-системы осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с);
- Полученную реакционную смесь внести по 20 мкл в промаркированные пробирки.
- Внести в каждую пробирку по 5 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов.
- Внести 5 мкл контрольных образцов КПЦР и K^+ ПЦР. Данные контрольные образцы используются для контроля только этапа ПЦР.
- Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы – 5 мкл.
- Запрограммировать термоциклер с оптическим модулем следующим образом (таблица 2)

Таблица 2 – Режим амплификации

№	Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
1	Преденатурация	95°C	5 минут	1
2	Денатурация	95°C	10 сек	45
3	Отжиг Детекция флюоресцентного сигнала	60°C	45 сек	
4	Элонгация	72°C	30 сек	

Детекция флюоресцентного сигнала осуществляется:

Для риккетсий – по каналу для флуорофора FAM

Для ВКО- по каналу для флуорофора ROX

Анализ и интерпретация результатов.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флюоресцентного сигнала по каналу для флуорофора FAM (риккетсий) и ROX (ВКО).

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 CT» - 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 РНК/ДНК возбудителя. При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения порогового цикла (Ct) реакции. Интерпретируют результаты следующим образом (таблица 3)

Таблица 3 – Интерпретация результатов

	FAM	ROX	Интерпретация
риккетсия/ВКО	Ct ≤38 (40)	Ct ≤38 (40)	В пробе присутствует ДНК риккетсий
	-	Ct ≤38 (40)	В пробе отсутствует ДНК риккетсий
	Ct ≥38 (40)	Ct ≤38 (40)	В пробе отсутствует ДНК риккетсий
	-	Ct ≥38 (40)	Результат исследования данной пробы не валиден

В круглых скобках приведено значение порогового цикла для приборов планшетного типа, без скобок – для приборов роторного типа.

7.3 Проведение ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции.

Из компонентов тест-системы готовят реакционные смеси, схема приготовления которых приведена в таблице 4.

Таблица 4 - Приготовление реакционных смесей.

Компонент тест-системы	риккетсии
ПЦР-смесь-Омра	20мкл x(N+2)
Тaq-ДНК-полимераза	0,3мкл x(N+2)

Для проведения одновременно нескольких реакций и снижения вероятности погрешности пипеток, готовят ПЦР-смесь в отдельной пробирке из расчета количества образцов +1 образец. Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл.

- После добавления каждого компонента тест-системы осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с);
- Полученную реакционную смесь внести по 20 мкл в промаркированные пробирки.
- Вносят ДНК исследуемых проб по 5 мкл в 10 пробирок с реакционной смесью
- Вносят 5 мкл ОКО в 1 пробирку с реакционной смесью (К⁻ ПЦР).
- Вносят 5 мкл К⁺ ПЦР в 2 пробирки с соответствующей реакционной смесью.
- Пробирки закрывают, содержимое осаждают на вортекс-центрифуге в течение 3-5 сек.
- Пробирки переносят в термоциклер с и задают режим амплификации, указанный в таблице 5.

Таблица 5 – Режим амплификации

№	Сегмент цикла	температура	время	Количество циклов
1	Преденатурация	95 ⁰ С	5 минут	1
2	Денатурация	95 ⁰ С	20 сек	40
	Отжиг	60 ⁰ С	20 сек	
	Элонгация	72 ⁰ С	45 сек	

Учёт результатов проводят методом электрофоретической детекции продуктов амплификации.

Электрофорез продуктов амплификации проводится в агарозном геле с использованием этидиума бромида в качестве интеркалирующего красителя ДНК. Концентрация геля – 1,5%, буферы – однократный ТБЭ или ТАЭ. Учёт результатов проводят с использованием проходящего УФ-света, длина волны 302 нм., на приборе любого производителя с фото документированием, путём сравнения с маркёром молекулярного веса двухцепочечной ДНК(не входит в тест-систему) и продуктом амплификации положительного контрольного образца.

8 ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система для выявления ДНК риккетсий, переносимых клещами, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «БЕЛАР-Рик-ПЦР/РВ» выпускается в виде упакованной тест-системы. Тест-система рассчитана на проведение 50 исследований, включая контроли.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при (-20±2) °С. Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре (+2,0±2)⁰С в течение суток. Срок годности тест-системы – 6 месяцев с даты изготовления.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие тест-системы требованиям ТУ ВУ 100558032.418-проект при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.