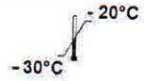
Тест-система «МУЛЬТИБАК» для диагностики инвазивных бактериальных инфекций методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РВ)

Инструкция по применению.

	Предназначен для определения возбудителей первичных бактериальных инфекций (*S. pneumoniae, H. influenzae, N. meningitidis, L. monocytogenes*) и возбудителей группы нозокомиальных инфекций (*A. baumannii, P. aeruginosa, S. aureus, K. pneumoniae, E. coli*) в биологических субстратах на 8/16/32 исследований	
	Универсальный формат Предназначен для использования с термоциклерами, способными работать с пробами объемом 20 мкл и регистрировать FAM/Green и HEX/Yellow флуоресценцию	(8/16/32 тестов с контролями)
	Рекомендованная температура хранения	
	ООО «СИВитал» 210017, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. Гагарина, 11 В	Tel.: +375-212-23-20-07 Fax: +375-212-23-14-48 E-mail: info@sivital.by



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Содержимое тест-системы

Таблица 1. Компоненты тест-системы

Маркировка	Объем (8 иссл.)	Объем (16 иссл.)	Объем (32 иссл.)	Вид упаковки
ПЦР смесь	1 × 690 мкл	1 × 1155 мкл	2 × 1155 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой
Олигонуклеотидный микс 1	12 мкл	20 мкл	40 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой
Олигонуклеотидный микс 2	12 мкл	20 мкл	40 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой
Олигонуклеотидный микс 3	12 мкл	20 мкл	40 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой
Олигонуклеотидный микс 4	12 мкл	20 мкл	40 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой
Олигонуклеотидный микс 5	12 мкл	20 мкл	40 мкл	Флакон с завинчивающейся крышкой
Положительный контрольный образец (ПКО)	200 мкл	200 мкл	200 мкл	ПЦР-пробирка
Отрицательный контроль	200 мкл	200 мкл	200 мкл	ПЦР-пробирка
	1	1	1	Инструкция

Условия хранения, стабильность

Компоненты набора (ПЦР смесь, олигонуклеотидный микс 1-5, положительный контрольный образец (ПКО), отрицательный контроль) должны перевозиться на сухом льду. Их необходимо хранить в темном месте при –20…–30°С, куда следует поместить сразу после доставки. Стабильность набора гарантируется в течение всего срока хранения (при хранении в оговоренных выше условиях).

Сбор образцов

Для анализа может быть использована любая биологическая жидкость (кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, моча, гной, дренажное отделяемое) в количестве не менее 0,2 мл.

Химические взаимодействия

- Повышенный уровень билирубина, липидов, гемоглобина, ЭДТА и цитрата не влияют на работу тест-системы.

Реагенты и оборудование, предоставляемые пользователем

- термоциклер для ПЦР РВ;
- компьютер с программным обеспечением для анализа и протоколирования данных;
- пластиковые расходные материалы для термоциклера;
- пипетки, стерильные наконечники для них с аэрозольным барьером;
- микроцентрифуга, пригодная для пробирок объемом 0,2 мл, 1,5 мл и 2,0 мл, а также для стрипов или 96-луночных планшет;
- вортекс;
- пробирки 1,5 мл;
- перчатки без талька, лабораторный халат.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

⚠ Для работы с ДНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

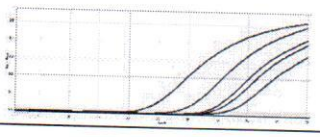
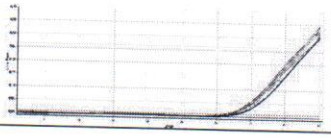
Хранение ДНК

Выделенная ДНК может храниться до 24 часов при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 20 °С.

Принцип действия набора для определения инвазивных бактериальных инфекций

Набор для определения инвазивных бактериальных инфекций – это тест-система, основанная на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Набор разработан для качественной детекции транскриптов возбудителей первичных бактериальных инфекций (*S. pneumoniae, H. influenzae, N. meningitidis, L. monocytogenes)* и возбудителей группы нозокомиальных бактериальных инфекций *(A. baumannii, P. aeruginosa, S. aureus, K. pneumoniae, E. coli*). Положительный контрольный образец состоит из мультиплексированной синтетической ДНК всех детектируемых патогенов и должен амплифицироваться вместе с анализируемыми образцами.

Таблица 2. Краткий обзор протокола эксперимента.

1. Выполнить выделение общей ДНК с использованием набора для экстракции	Выполнить выделение в соответствии с инструкцией производителя набора для экстракции нуклеиновых кислот
2. Приготовить и разлить по пробиркам рабочий раствор реагентной смеси, добавить образцы	Приготовить реагентные смеси для каждой пары возбудителей из расчета 11 мкл ПЦР смеси и 1 мкл Олигонуклеотидного микса 1-5 пропорционально числу анализируемых проб. Добавить 12 мкл полученной смеси во все лунки с испытуемыми образцами и контролями. Добавить по 8 мкл проб ДНК в лунки для испытуемых образцов. Добавить по 8 мкл ПКО в лунки с положительными контролями, 8 мкл воды для ПЦР в лунки с отрицательными контролями. Перемешать пипетированием или на вортексе и осадить.
3. Закрыть пробирки, установить их в термоциклер, настроить и запустить ПЦР РВ	
4. Анализ кривых роста в испытуемых образцах, контрольных пробах и стандартах определения	Кривые роста концентрации ДНК  Кривые роста внутренних контролей образцов 

⚠ **Важно!** Включайте в состав каждой постановки 5 положительных контролей ДНК (ПКО) и 5 отрицательных контролей для каждого типа Олигонуклеотидного микса 1-5. Контрольный образец входит в состав данного набора. Отрицательные контроли, в которых произошла амплификация, указывают на контаминацию проб экзогенным генетическим материалом. В этом случае необходимо повторить ПЦР РВ, используя

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

свежеприготовленные реагенты. Такие образцы необходимо исследовать как минимум два раза подряд.

⚠ **В целях сохранения полной активности реагентов все операции по дозированию и смешиванию реактивов рекомендуется производить на льду либо на охлаждаемом штативе.**

Этапы работы

1. Разморозьте флаконы, входящие в состав тест-системы, и перемешайте на вортексе в течение 5-10 секунд.
2. Кратковременно центрифугируйте их на центрифуге с максимальной скоростью перед тем, как открыть, чтобы содержимое гарантированно переместилось со стенок пробирок на дно.
3. Рассчитайте необходимое количество проб, учитывая как минимум 5 положительных и 5 отрицательных контролей. Рекомендуется добавлять в расчет 1-2 дополнительные пробы, чтобы компенсировать неточности при дозировании и потери при пипетировании.
4. Приготовьте основную реагентную смесь пропорционально числу анализируемых проб:

Состав реагентной смеси на 1 образец – 12 мкл:

ПЦР смесь	**11 мкл**
Олигонуклеотидный микс 1-5	**1 мкл**

Общий объем реакционной смеси на 1 образец – 20 мкл, включая объем пробы – 8 мкл.

5. Для каждой пары детектируемых патогенов необходимо приготовить рабочий раствор с соответствующим олигонуклеотидным миксом:
   - Олигонуклеотидный микс 1: S. pneumoniae/H. influenzae
   - Олигонуклеотидный микс 2: N. meningitidis/L. monocytogenes
   - Олигонуклеотидный микс 3: A. baumannii/P. aeruginosa
   - Олигонуклеотидный микс 4: S. aureus/K. pneumoniae
   - Олигонуклеотидный микс 5: E. coli/Внутренний контроль
6. Приготовьте пробирки в количестве, достаточном для амплификации испытуемых образцов, положительных и отрицательных контролей, и поместите их в охлаждаемый штатив.
7. Добавьте 12 мкл рабочего раствора основной реагентной смеси во все во все пробирки с испытуемыми образцами и контролями.
8. Перенесите по 8 мкл отрицательного контроля в пробирки с отрицательными контролями, не содержащими образцов (т.н. контроли контаминации), и по 8 мкл ПКО в лунки с положительными контролями.
9. Добавьте 8 мкл проб ДНК в соответствующие пробирки с испытуемыми образцами.
10. Закройте пробирки с пробами соответствующими крышечками, стрипами крышечек либо оптической пленкой.
11. Встряхните на шейкере, а затем сбросьте жидкость на дно пробирок центрифугированием в течение 10 секунд.
12. Аккуратно поместите подготовленные пробирки в термоциклер, закройте крышку.
13. Запустите настройку протокола ПЦР РВ, следуя рекомендациям производителя, принимая во внимание отличия в настройках своего инструмента.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

14. Создайте новый протокол или запустите существующий. Задайте момент считывания данных с планшеты на **этапе отжига/элонгации** при 59 °C. Установите количество циклов в петле равным 40. Укажите, что в данном эксперименте нужно использовать каналы FAM/Green и HEX/Yellow. На схеме планшеты укажите используемые ячейки. Впечатайте в каждую ячейку название соответствующей пробы.

Таблица 4. Условия амплификации для обнаружения ДНК исследуемых патогенов.

Этап	Температура	Время	Число повторов
Активация Taq-полимеразы	95 °C	3 минут	1
Денатурация (плавление)	95 °C	15 секунд	40
Отжиг/элонгация и **измерение флуоресценции** по каналам FAM/Green и HEX/Yellow	59 °C	60 секунд	

Приблизительное время, необходимое для завершения ПЦР РВ по данному протоколу, составляет 90 минут.

Настройка анализа для амплификаторов Rotor-Gene, Bio-Rad CFX96 и ДТ-96

Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

Следует выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – скорректировать параметры анализа по таблице, переместить ее вручную до необходимого уровня. Названия параметров могут отличаться в зависимости от установленной версии программного обеспечения.

Rotor-Gene	
Порог Фона (NTC threshold)	10%
Порог (Threshold)	0,1
Динамический фон	Активно
При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0-30%, а порог может быть изменен в диапазоне 0,02-0,2. Допускается активация функций Динамический фон (Dynamic tube), Коррекция уклона (Slope Correct).	
Bio-Rad CFX96	
Пороговая линия (Baseline threshold)	200
При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25-250. В случае высоких значений уровня сигнала (например, при использовании белых непрозрачных стрипов или планшет) пороговую линию устанавливают на уровне около 10% от максимальной флюоресценции, в точке соответствующей линейной части роста кривой амплификации. Допускается активация функций Применить коррекцию дрифта флюоресценции (Apply Fluorescence Drift Correction) и Коррекция базовой линии (Baseline Subtracted Curve fit).	
ДТ-96	
Метод	Пороговый (Ct)
Пороговая линия	10% от полученных для образцов в последнем цикле амплификации
Порог может быть изменен в диапазоне 0-30%.	

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для внутреннего, положительного и отрицательного контролей амплификации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Анализ данных

Каждый цикл амплификации ДНК приводит к генерации флуоресцентного сигнала, измеряемого в **FAM/Green** и **HEX/Yellow** каналах для **мишени**, что приводит к формированию сигмовидной кривой роста. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для внутреннего, положительного и отрицательного контролей амплификации.

Таблица 5. Анализ данных ПЦР РВ.

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу FAM/Green менее 40 и значение Ct по каналу HEX/Yellow менее 40	Образец содержит фрагменты генома исследуемого патогена (**положительный**)
Значение Ct по каналу FAM/Green менее 20 и отсутствие (N/A) значения Ct по каналу HEX/Yellow	Образец содержит фрагменты генома исследуемого патогена (**положительный**)
Отсутствие (N/A) значения Ct по каналу FAM/Green и значение Ct по каналу HEX/Yellow менее 40	Образец не содержит фрагменты генома исследуемого патогена (**отрицательный**)
Отсутствие значения Ct по каналу FAM/Green (N/A) и отсутствие значения Ct по каналу HEX/Yellow (N/A)	Результат считается **невалидным**. Необходимо повторить исследование образца, включая этап экстракции

В случае появления сомнительных положительных результатов возможна контаминация инструментов и рабочего места – следует провести деконтаминационные мероприятия в лаборатории.

Решение проблем

Таблица 6. Возможные причины ошибок способы их устранения

Проблема	Возможная причина	Решение
Проблемы, связанные с подготовкой образцов		
Недостаточная степень чистоты экстрагированной ДНК	Контаминация образцов РНК/ДНК солями белков, углеводами и прочей органикой, ингибирующей ПЦР РВ	Избегать методов фенольной и/или других методов экстракции, использовать только прилагаемый набор для экстракции нуклеиновых кислот.
Проблемы, связанные с пипетированием		
Получен флуоресцентный сигнал из проб, не содержащих ДНК, и/или из контролей контаминации реагентов	Контаминация негативных проб ампликонами	Повторить экстракцию и/или ПЦР РВ с новыми реагентами; провести деконтаминацию инструментов и рабочего места.
Итоговый объем реакционной смеси отличается от 20 мкл	Ошибки пипетирования, например, пропуск либо повторная заливка ячеек	Используйте мультиканальные пипетки, автоматизированное пипетирование либо развивайте внимание и концентрацию.
Проблемы, связанные с амплификацией		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Необычно большие значения C_t стандарта и/или завышенная концентрация ДНК в испытуемых образцах	Неверный протокол амплификации	Проверьте настройки оборудования, следуйте инструкциям из руководства по пользованию прибором.
	Нарушение условий и/или сроков хранения реагентов	Проверьте условия хранения и срок годности.
	Распад определяемой ДНК	Используйте расходные материалы и реагенты, не содержащие нуклеаз; после синтеза сразу помещайте образцы ДНК на лед.
Не сигмовидная форма кривых роста стандартов концентрации и испытуемых образцов	Частое размораживание/ оттаивание либо неправильное хранение смеси растворенных реагентов	Прочтите инструкцию, проверьте условия хранения, приготовьте свежую реагентную смесь.
	Условия хранения не соответствуют рекомендуемым, истек срок хранения набора	Проверьте условия хранения и срок годности.
Отсутствует флуоресцентный сигнал	Измерение флуоресцентного сигнала отключено, камера неправильно установлена	Проверьте настройки оборудования.
	Выбран неправильный канал записи флуоресцентного сигнала	Для определения ДНК возбудителя выберите канал FAM/Green и HEX/Yellow. Для определения внутреннего контроля выберите канал HEX/Yellow.
	Неверный протокол амплификации	Проверьте настройки оборудования.
	Нарушение условий и/или сроков хранения набора	Проверьте условия хранения и срок годности.
Различный вид амплификации ДНК в испытуемых образцах, непараллельный рост кривых в экспоненциальной фазе реакции	Избыток ингибиторов ПЦР в пробе	Используйте рекомендованный набор для экстракции, точно следуйте инструкциям производителя. Разведение ДНК перед анализом может снизить содержание ингибиторов в образце
	Неправильно собранный материал (например, гепаринизированная кровь)	Используйте правильно собранные образцы.
Регистрируется низкий уровень флуоресцентного сигнала в ходе амплификации определяемой ДНК	Загрязнение оптических линз	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера; если позволяет конструкция – раз в месяц протирать линзы, используя абсолютный этиловый спирт и ватные палочки.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Загрязнение системы охлаждения и/или матицы оптического сенсора	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера; можно также заполнить каждую ячейку сенсора изопропанолом, инкубировать 10 минут при 50°С, удалить изопропанол и промыть бидистиллированной водой.
	Испарение из ячейки в ходе ПЦР РВ	Крышки планшет, пробирок, стрипов должны быть максимально эффективными.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru