УТВЕРЖДАЮ
Директор РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
_____ В.А. Горбунов
«____»_____

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПАРВОВИРУСА В19 МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «Parvovirus B19»

ТУ BY 100558032.264 – 2015 изм. «1»

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

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПАРВОВИРУСА B19 МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «Parvovirus B19»

Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь
12.01.2016

Б.1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Б.1.1 Набор «Parvovirus B19» предназначен для амплификации ДНК парвовируса B19 в режиме реального времени *in vitro*. Набор адаптирован для работы с амплификаторами 7300/7500/7900 (Applied Biosystems, США), CFX96 (BioRad, США).

Б.1.2 Выявление ДНК парвовируса B19 используется для диагностики острой и хронической форм парвовирусной инфекции независимо от вида клинических проявлений, а также для установления инфицирования женщины в период беременности, плода и новорожденного в случае риска внутриутробного инфицирования, для оценки наличия вируса в организме донора при подготовке к трансплантации органов и тканей.

Б.2 ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Б.2.1 Состав набора:

- Раствор 1 – 4 микропробирки;
- Раствор 2 – 1 микропробирка;
- Вода для ПЦР – 1 микропробирка;
- Отрицательный контрольный образец ОКО – 1 микропробирка;
- Положительный контрольный образец ПКО – 1 микропробирка.

Б.2.2 Набор рассчитан на проведение 48 определений (включая контроли).

Время проведения анализа не более 120 мин.

Регистрация результатов: каналы FAM и ROX.

Б.2.3 Принцип работы набора состоит в следующем:

Выявление специфической ДНК парвовируса B19 осуществляется в 3 этапа:

1 Выделение ДНК из исследуемого клинического материала (реагенты для выделения ДНК не входят в состав набора).

2 Приготовление смеси для ПЦР.

3 Проведение ПЦР в режиме реального времени. Детекция целевой мишени осуществляется по каналу FAM, детекция внутреннего контроля осуществляется по каналу ROX. Анализ данных ПЦР.

Выделение ДНК из образцов биоматериала осуществляется с помощью набора реагентов «ДНК-ВК» (ИБОХ НАН РБ), либо аналогичного. В ходе ПЦР в режиме реального времени происходит накопление специфических продуктов реакции, регистрируемых путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. В состав реакционной смеси включены набор олигонуклеотидных праймеров и зонд FAM для выявления ДНК парвовируса B19 (целевая мишень), а также набор олигонуклеотидных праймеров и зонд ROX для выявления ДНК человека (внутренний контроль). Анализ результатов осуществляется с помощью порогового метода, который предполагает определение значения порогового цикла реакции C_t как точки пересечения кривой флуоресценции и пороговой линии.

Б.3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Б.3.1 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, т. к. биологические образцы рассматриваются как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Б.3.2 Одноразовые резиновые перчатки не должны содержать пудры и/или талька.

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

Б.3.3 Категорически запрещается прием пищи, использование косметических принадлежностей и курение в помещениях, предназначенных для работы с биологическими образцами.

Б.3.4 Основные этапы работ должны проводиться в физически изолированных зонах. Всё лабораторное оборудование, а также штативы, пипетки, и др. должны быть промаркированы по принадлежности к соответствующей рабочей зоне. Запрещается перемещение оборудования из одной рабочей зоны в другую.

Б.3.5 Во избежание перекрестной контаминации необходимо вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

Б.3.6 При подготовке реакционной смеси и внесении контрольных и исследуемых образцов перчатки, наконечники и пробирки используются только однократно.

Б.3.7 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности, предусмотренных при работе с биологическим материалом. В случае пролива образцов на рабочие поверхности необходимо проводить дезинфекцию.

Б.4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификаторы 7300/7500/7900 (AppliedBiosystems, США), CFX96 (BioRad, США), RotorGene 3000/6000 (CorbettLifeScience, Австралия).
- бокс для ПЦР с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;
- мини центрифуга-вортекс;
- отдельные наборы дозаторов полуавтоматических одноканальных, позволяющих отбирать объемы жидкостей (1-20) мкл и (20-200) мкл, аттестованных по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- отдельные халаты и одноразовые резиновые хирургические перчатки без талька;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки (микропробирки в стрипах, 48/96-ячеечные микропланшеты) с максимальным объёмом 0,2 мл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для пипеток объемом до 20 мкл и до 200 мкл;
- штативы для наконечников;
- штативы для микропробирок на 0,2 мл;
- морозильная камера на температуру минус (12-18) ^{0}C;
- транспортный контейнер со льдом;
- дезинфицирующее средство;
- образцы ДНК.

Б.5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Б.5.1 Выделение ДНК из исследуемого биоматериала осуществляется в зоне 1. Приготовление смеси для ПЦР проводится в зоне 2. Образцы ДНК и контрольные образцы вносят в смесь для ПЦР в зоне 3. ПЦР проводят в зоне 4. При переходе из одной зоны в другую необходимо проводить смену перчаток и лабораторной одежды (халата, бахил, маски, шапки, др.). Перемещать готовую смесь для ПЦР в зону 3 следует в транспортном контейнере со льдом.

Б.5.2 Выделение ДНК из образцов биоматериала осуществляется с помощью набора реагентов «ДНК-ВК» (ИБОХ НАН РБ) либо аналогичного в зоне 1. Полученные растворы, содержащие ДНК, готовы к внесению в смеси для ПЦР. Препараты ДНК можно хранить до 7 суток при температуре (2-8) ^{0}C. Более длительное хранение осуществлять при минус (12-18) ^{0}C не более 6 месяцев.

Б.5.3 Составить протокол-схему анализа и рассчитать необходимое количество микропробирок (микропробирок в стрипах, 48/96-ячеечный микропланшет) вместимостью 0,2 мл с учётом контрольных образцов и количества исследуемых образцов.

Б.5.4 В зоне 2 извлечь из упаковочного пакета необходимое количество (1-4) микропробирок с компонентом «Раствор 1», в зависимости от количества исследуемых образцов, и микропробирки

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

с остальными компонентами набора. Поместить на лёд. Избегать попадания прямых солнечных лучей. Провести разморозку компонентов в течение 10 мин.

Б.5.5 Осадить содержимое микропробирок на дно с помощью мини центрифуги-вортекса. Избегать интенсивного встряхивания раствора 2.

Б.6 ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Б.6.1 Внести по 4 мкл компонента «Раствор 2» и 225 мкл воды для ПЦР в каждую микропробирку с компонентом «Раствор 1». Перемешать пипетированием 3 раза. Готовой смеси, полученной в каждой пробирке, достаточно для проведения 12 реакций.

Б.6.2 Микропробирки с оставшимися компонентами заморозить.

Б.6.3 Поместить микропробирки (микропробирки в стрипах или 48/96-ячеечный микропланшет) в штатив. Внести в каждую микропробирку по 20 мкл смеси для ПЦР.

Б.6.4 Штатив поместить в специальный контейнер со льдом.

Б.6.5 Переместить контейнер в зону 3.

Б.6.6 Извлечь штатив с микробирками или планшетом из контейнера со льдом.

Б.6.7 Внести по 5 мкл образцов ДНК или контрольных образцов в каждую пробирку со смесью для ПЦР (в соответствии с протоколом-схемой анализа), используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого образца. Перемешать пипетированием 3 раза.

Б.6.8 Микропробирки закрыть крышками, планшет заклеить оптической адгезивной плёнкой.

Б.6.9 Поместить штатив с микроприбирками или планшетом в контейнер со льдом.

Б.6.10 Переместить контейнер в зону 4.

Б.6.11 Извлечь штатив с микробирками или планшетом из контейнера со льдом. Извлечь микропробирки или планшет из штатива.

Б.6.12 Поместить микропробирки или планшет в термоблок амплификатора.

Б.6.13 Запрограммировать прибор для выполнения соответствующего режима амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, согласно инструкции по эксплуатации прибора.

Режим амплификации для 7300/7500/7900 (AppliedBiosystems, США), CFX96 (BioRad, США):

Температура	Время	Количество циклов
95°C	2 мин	1
95°C 60°C	10 с 60 с	45

Режим амплификации для RotorGene 3000/6000 (CorbettLifeScience, Австралия):

Температура	Время	Количество циклов
95°C	2 мин	1
95°C 60°C	10 с 60 с	45

Объём реакционный смеси 25 мкл.

Флуоресценция измеряется при 60^0C на каналах FAM (ДНК парвовируса B19) и ROX (ДНК человека).

Б.7 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ НА ПРИБОРЕ 7300/7500/7900 (AppliedBiosystems, США), CFX96 (BioRad, США)

Б.7.1 После проведения реакции необходимо выставить значения пороговой линии: 10% от максимального уровня флуоресценции ПКО для каждого канала – FAM (ДНК парвовируса B19) и ROX (ДНК человека),

Б.7.2 Учитывать результаты можно лишь в том случае, если:

- уровень флуоресценции в ОКО по каналу FAM на протяжении всего эксперимента не отличается от стартового,

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

- уровень флуоресценции по каналу ROX не пересекает пороговую линию.

Б.7.3 Результаты не могут быть учтены в тех случаях, когда:

- уровень флуоресценции в ОКО по каналу FAM пересекает пороговую линию до 35 цикла амплификации;

- уровень флуоресценции в ОКО по каналу ROX пересекает пороговую линию до 35 цикла амплификации.

Б.7.4 Результат анализа считается положительным в случае возрастания уровня флуоресценции выше пороговой линии по каналу FAM.

Б.8 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ НА ПРИБОРЕ RotorGene 3000/6000 (CorbettLifeScience, Австралия)

Б.8.1 После проведения реакции в меню *Вычисление CT* необходимо выставить уровень пороговой линии *Порог*= 0,03. Выбрать параметр *Устранение выбросов* и установить значение порога отрицательных проб *Порог фона* = 10%.

Б.8.2 Учитывать результаты можно лишь в том случае, если:

- уровень флуоресценции в ОКО по каналу FAM на протяжении всего эксперимента не отличается от стартового,

- уровень флуоресценции по каналу ROX не пересекает пороговую линию.

Б.8.3 Результаты не могут быть учтены в тех случаях, когда:

- уровень флуоресценции в ОКО по каналу FAM пересекает пороговую линию до 35 цикла амплификации;

- уровень флуоресценции в ОКО по каналу ROX пересекает пороговую линию до 35 цикла амплификации.

Б.8.4 Результат анализа считается положительным в случае возрастания уровня флуоресценции выше пороговой линии по каналу FAM.

Б.9 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Б.9.1 Уровень флуоресценции в ОКО по каналам FAM и ROX не пересекает пороговую линию ранее 35 цикла амплификации.

Б.9.2 Уровень флуоресценции в ПКО по каналам FAM и ROX пересекает пороговую линию до 35 цикла амплификации (с случае пересечения пороговой линии после 35 цикла результат может рассматриваться как положительный на усмотрение оператора).

Б.9.4 Специфичность не менее 95%.

Б.10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Б.10.1 Набор должен храниться при температуре минус (12-18) ^{0}C в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

Б.10.2 Не держать реагенты во время подготовки и проведения анализа на ярком свету.

Б.10.3 Не допускается повторное замораживание и размораживание компонента «Раствор 1» и готовой смеси для амплификации.

Б.10.4 Не смешивать реагенты из разных партий.

Б.10.5 При несоблюдении правил хранения и транспортировки набора, а также других пунктов настоящей инструкции, производитель не несёт ответственности за результаты анализа.

Б.10.6 Срок годности набора 6 месяцев.

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