УТВЕРЖДАЮ

Директор РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

_____В.А. Горбунов

«___»_____2021 г.

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса (BKV), JC вируса (JCV) и аденовирусов (AdV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «BKV-JCV-AdV»

(ТУ BY 100558032.426-202_)

Инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО

Главный врач ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»

_____ С. Л. Ермак

«_____» _____2022 г.

СОГЛАСОВАНО

Главный врач ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

_____В. В. Рызгунский

«_____»_____2022 г.

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

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса (BKV), JC вируса (JCV) и аденовирусов (AdV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «BKV-JCV-AdV», представляет собой набор реагентов для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления и количественного определения ДНК BKV, JCV, AdV в образцах биологического материала (цельной крови, сыворотки крови, мочи, назофарингеальных мазков, ликвора, фекалий, образцов тканей и органов человека, образцов питьевой/сточной воды).

Основным свойством тест-системы является способность обнаруживать присутствие в исследуемом образце ДНК BKV, JCV, AdV методом ПЦР. Накопление специфических продуктов ПЦР выявляется за счет нарастания интенсивности флуоресценции после освобождения флуоресцентных меток в результате разрушения ДНК-полимеразой гибридизационных зондов, связавшихся со специфическими участками ДНК.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу ROX для регистрации накопления продуктов амплификации фрагментов ДНК BKV, AdV, по каналу FAM (или HEX, в зависимости от комплектации набора) –ДНК JCV, ВКО.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления и количественного определения ДНК BKV, JCV и AdV путем амплификации специфических фрагментов ДНК данных вирусов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор выпускается в трех комплектациях, достаточных для проведения 60 реакций амплификации в отношении каждого возбудителя, включая контроли и калибраторы.

2 СОСТАВ НАБОРА

Таблица №1 – Состав комплектаций набора

		Комплектация №1 «BKV-JCV-AdV»	Комплектация №2 «BKV-JCV»	Комплектация №3 «AdV»
1	ПЦР-смесь №1	2×455 мкл	1×455 мкл	1×455 мкл
2	ПЦР-смесь №2 BKV-JCV-ВКО	–	1×520 мкл	–
3	ПЦР-смесь №2 BKV-JCV	1×520 мкл	–	–
4	ПЦР-смесь №2 AdV-ВКО	1×520 мкл	–	1×520 мкл
5	ДНК-полимераза (5ед/мкл)	2×20 мкл	1×20 мкл	1×20 мкл
6	К+	1×700 мкл	1×700 мкл	1×700 мкл
7	ВКО	1×1000 мкл	1×1000 мкл	1×1000 мкл
8	ОКО	1×1000 мкл	1×1000 мкл	1×1000 мкл
9	BKV/JCV1	1×300 мкл	1×300 мкл	–
10	BKV/JCV2	1×300 мкл	1×300 мкл	–
11	ТХ1	1×300 мкл	–	1×300 мкл
12	ТХ2	1×300 мкл	–	1×300 мкл

Внимание: Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения ДНК. Для проведения исследований с помощью тест-системы дополнительно используют следующие реактивы, не входящие в его состав:

- Набор для выделения вирусной ДНК – любой марки.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая специфичность набора в отношении ДНК BKV, JCV и AdV – 100%.

Аналитическая чувствительность выявления ДНК BKV, JCV и AdV –10^3 ГЭ/мл.

4 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента предприятия-изготовителя каждая серия наборов должна быть проверена и принята отделом биологического контроля (ОБК) изготовителя на соответствие всем показателям ТУ BY 100558032.426-202_

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

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работу следует проводить в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6.01.2017 г. №2. Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями СанНиП «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7.02.2018 г. №14.

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5% 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 ДНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, внесение проб в микропробирки 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.

6 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор для выделения вирусной ДНК («НК-экстра», РНПЦ ЭМ, «РИБО-преп» АмплиСенс или аналогичный любой марки).

4.2 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (CFX96 Bio-Rad, США; Rotor-Gene 3000/6000/Q Corbett Research, Австралия, или аналогичный любой марки).

4.3 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biocom» 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^{0}С (например, «Biocom» или любой другой марки).

4.5 Центрифуга-вортекс (любой марки).

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

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

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

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

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

4.11 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.12 Холодильник на 2–8ºС и на -20ºС, морозильник на -20ºС.

4.13 Ёмкость для сброса наконечников.

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

7 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

7.1. Выделение ДНК.

Реактивы для выделения ДНК НЕ ВХОДЯТ в состав настоящего набора 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+1, где N – количество исследуемых образцов, 1 – пробирка для ОКО.
- Вносят в каждую пробирку по 90 мкл исследуемого образца и 10 мкл ВКО.
- В пробирку ОКО вносят 90 мкл ОКО + 10 мкл ВКО.

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

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

- Разморозить реактивы, входящие в состав набора. **Внимание:** ДНК-полимеразу размораживать не нужно;
- Отобрать и промаркировать нужное количество (из расчета N+2 – для качественного определения или N+5 – для количественного определения, где N – количество исследуемых образцов) пробирок. Тип пробирок, стрипов, плашек следует выбирать с учетом типа используемого прибора;
- В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь №1, одну из ПЦР-смесей №2 (ПЦР-смесь №2 BKV-JCV-ВКО или ПЦР-смесь №2 BKV-JCV или ПЦР-смесь №2 AdV-ВКО – в зависимости от комплектации и/или необходимых исследований), ДНК-полимеразу в соответствии с таблицей 2, тщательно перемешать, осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с). Объем реагентов на 1 реакцию: ПЦР-смесь №1 – 7мкл, ПЦР-смесь №2 – 8 мкл, ДНК-полимераза – 0,25 мкл.

Количество исследуемых образцов*		Объем реагентов		
для количественного определения	для качественного определения	ПЦР-смесь №1	ПЦР-смесь №2	ДНК-полимераза
–	1	28	32	1,00
–	2	35	40	1,25
–	3	42	48	1,50
1	4	49	56	1,75
2	5	56	64	2,00
3	6	63	72	2,25
4	7	70	80	2,50
5	8	77	88	2,75
6	9	84	96	3,00
7	10	91	104	3,25
8	11	98	112	3,50
9	12	105	120	3,75
10	13	112	128	4,00
11	14	119	136	4,25
12	15	126	144	4,50
13	16	133	152	4,75
14	17	140	160	5,00
15	18	147	168	5,25
16	19	154	176	5,50
17	20	161	184	5,75
18	21	168	192	6,00
19	22	175	200	6,25
20	23	182	208	6,50

* – расчеты приведены с учетом запаса (расчет на 1 реакцию больше) и необходимости постановки 5 контрольных образцов (ОКО и по 2 ДНК-калибратора (BKV/JCV1,

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

BKV/JCV2 или TX1, TX2 – в зависимости от ПЦР-смеси №2) в двух повторах для количественного определения ДНК и 2 контрольных образцов (ОКО и К+) для качественного определения ДНК.

- Полученную реакционную смесь внести по 15 мкл в промаркированные пробирки.
- Внести в соответствующие пробирки по 10 мкл ДНК исследуемых образцов.
- Внести по 10 мкл ОКО, ДНК-калибраторов или К+ в соответствующие пробирки (согласно таблице 3). **Внимание:** первым необходимо вносить ОКО, затем ДНК-калибраторы BKV/JCV2 и/или TX2, затем BKV/JCV1 и/или TX1 для предотвращения контаминации. Для получения корректного результата реакции ОКО должен проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения ДНК.

Таблица 3 – Схема внесения контрольных проб

Количественное определение			**Качественное определение**
ПЦР-смесь, содержащая:			
ПЦР-смесь №2 BKV-JCV-ВКО	**ПЦР-смесь №2 BKV-JCV**	**ПЦР-смесь №2 AdV-ВКО**	
ОКО	ОКО	ОКО	ОКО
BKV/JCV1×2	BKV/JCV1×2	TX1×2	К+
BKV/JCV2×2	BKV/JCV2×2	TX2×2	

- Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.
- Запрограммировать амплификатор с оптическим модулем следующим образом:

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Преденатурация	95ºС	5 минут	1
2	Денатурация	95ºС	15 сек	45
	Отжиг *Детекция флуоресцентного сигнала**	55ºС	40 сек	

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется:

– В комплектации набора №1 и №3

Для ВКО и JCV – по каналу для флуорофора FAM

Для ДНК BKV и AdV – по каналу для флуорофора ROX

– В комплектации набора №2

Для ВКО – по каналу для флуорофора HEX

Для ДНК JCV – по каналу для флуорофора FAM

Для ДНК BKV– по каналу для флуорофора ROX

При одновременной постановке ПЦР с разными ПЦР-смесями на приборах RotorGene 3000/6000/Q устанавливают оптимизацию уровня сигнала по ПЦР-смеси, содержащей ПЦР-смесь №2 BKV-JCV-ВКО или ПЦР-смесь №2 BKV-JCV.

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

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Указать прибору, в каких ячейках находятся ДНК-калибраторы и их концентрацию, которая указана во вкладыше к набору.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

Анализ результатов поводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофоров ROX, FAM и HEX. Результаты интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов во вкладыше.

Внимание: Для проведения анализа на приборе Rotor Gene (или аналогичном) 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

При этом в таблице результатов отражается наличие/отсутствие значения Ct реакции, а также концентрация вирусной ДНК в исследуемых пробах, которая автоматически высчитывается программным обеспечением амплификатора на основании Ct ДНК-калибраторов.

Интерпретируют результаты следующим образом:

- ДНК BKV, AdV обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла меньше граничного*.
- ДНК JCV обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла меньше граничного*.
- Результат ПЦР считается достоверным, если для пробы с ОКО получен отрицательный результат, для пробы К+ получено пороговое значение меньше граничного*, для ВКО в каждой пробирке по каналу FAM (или HEX) пороговое значение Ct находится в указанных пределах*.
- Если для К+ или ДНК-калибраторов значение порогового цикла отсутствует или превышает граничное значение*, необходимо повторить ПЦР (п.7.2).
- Если для ВКО в пробе значение порогового цикла отсутствует или выходит за границы*, необходимо повторно выделить ДНК из образца (п.5.1) и провести ПЦР (п.7.2).
- Если для ОКО определено значение порогового цикла Ct ≤39 (на приборах роторного типа) или Ct ≤42 (на приборах планшетного типа), необходимо повторить исследование, начиная с этапа выделения ДНК (п.7.1), строго соблюдая меры предосторожности для предотвращения контаминации.

* - граничные значения пороговых циклов указаны во вкладыше к набору

8 ФОРМА ВЫПУСКА

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса (BKV), JC вируса (JCV) и аденовирусов (AdV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «BKV-JCV-AdV» выпускается в виде упакованного набора. Набор выпускается в комплекте, достаточном для проведения 60 реакций амплификации в отношении каждого возбудителя, включая контроли и калибраторы.

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

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Набор хранят при температуре от -16 до -20ºС в защищенном от света месте на протяжении всего срока годности. Транспортировка набора должна производиться при температуре от -16 до -20ºС или при (+2,0±2)ºС не более 1 суток.

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующий лабораторией инфекций с природным резервуаром,
д-р. мед.наук, проф.
_____ Т.В. Амвросьева
«___»_____2021 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром,
канд.биол.наук
_____ Н.В. Поклонская
«___»_____2021 г.

Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ А.С. Аринович
«___»_____2021 г.

Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ И.В. Бельская

Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ З.Ф. Богуш
«___»_____2021 г.

Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ О.Н. Казинец
«___»_____2021 г.

Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ Ю.А. Шилова

Младший научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ Ю.Б. Колтунова

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