УТВЕРЖДАЮ

Главный врач ГУ Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

_____ А.Л. Скуранович

«25» 12 2024 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ВК ВИРУСА (BKV) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Извещение об изменении №2

ТУ BY 100558032.367-2016

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

«Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса (BKV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», представляет собой набор реагентов для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления и количественного определения ДНК ВК вируса в клинических образцах пациентов (сыворотка крови, моча).

Основным свойством тест-системы является способность обнаруживать присутствие в исследуемом образце ДНК ВК вирусов методом ПЦР. Накопление специфического продукта ПЦР выявляется за счет нарастания интенсивности флуоресценции после освобождения флуоресцентной метки в результате разрушения Taq-полимеразой гибридизационного зонда, связавшегося со специфическим участком 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 ВК вирусов и ДНК ВКО по каналу FAM.

Постановку реакции следует производить в соответствии с требованиями безопасности при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, маске, сменном халате. 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.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления и количественного определения ДНК ВК вируса человека (BKV) путем амплификации специфического фрагмента ДНК вируса методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор выпускается в комплекте, достаточном для проведения 60 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

2 СОСТАВ НАБОРА

1	ПЦР-смесь №1	1×455 мкл
2	ПЦР-смесь №2	1×520 мкл
3	Taq-полимераза (5ед/мкл)	1×16 мкл
4	Внутренний контрольный образец (ВКО)	1×700 мкл
5	Положительный контрольный образец (К+ ПЦР)	1×700 мкл
6	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	1×700 мкл
7	К1	1×300 мкл
8	К2	1×300 мкл
9	Инструкция по применению	1шт.

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 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 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.

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

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 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.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор для выделения вирусной ДНК («ДНК-сорб-В» АмплиСенс, «АмплиПрайм 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 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, на 0,5 мл и на 0,2 мл.

4.11 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

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

4.13 Ёмкость для сброса наконечников.

5 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 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+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.

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

- В пробирку К+ПЦР вносят 80 мкл ОКО + 10 мкл К+ПЦР + 10 мкл ВКО.

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

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

- Отобрать и промаркировать нужное количество (из расчета N+5, где N – количество исследуемых образцов) пробирок. Тип пробирок, стрипов, плашек следует выбирать с учетом типа используемого прибора;
- Разморозить реактивы, входящие в состав тест-системы. **Внимание:** Taq-полимеразу размораживать не нужно;
- В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь №1, ПЦР-смесь №2 Taq-полимеразу (объем реагентов на 1 реакцию: ПЦР-смесь №1 – 7мкл, ПЦР-смесь №2 – 8 мкл, ДНК-полимераза – 0,25 мкл), тщательно перемешать, осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1–2 с);
- Полученную реакционную смесь внести по 15 мкл в промаркированные пробирки.
- Внести в каждую пробирку по 10 мкл ДНК исследуемых образцов.
- Внести по 10 мкл контрольных образцов ОКО и К+ПЦР. Для получения корректного результата реакции ОКО и К$^{+}$ПЦР должны проходить через все те же этапы, что и исследуемые образцы, начиная с выделения ДНК.
- Внести по 10 мкл ДНК-калибраторов К1 и К2 в соответствующие пробирки. **Внимание:** первым необходимо вносить ДНК-калибратор К2, затем К1, для предотвращения контаминации.
- 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	95°С	5 минут	1
2	Денатурация	95°С	15 сек	40
	Отжиг *Детекция флуоресцентного сигнала**	55°С	45 сек	

Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется:
Для ВКО – по каналу для флуорофора FAM
Для ДНК ВК вирусов – по каналу для флуорофора ROX

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Указать прибору, в каких ячейках находятся ДНК-калибраторы и их концентрацию.
- 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 флуорофора ROX и FAM. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие/отсутствие для данной пробы ДНК BKV.

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 порогового

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

цикла (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 обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла меньше граничного*.
- Результат ПЦР считается достоверным, если для пробы с ОКО получен отрицательный результат, для пробы К+ПЦР получено пороговое значение меньше граничного*, для ВКО в каждой пробирке по каналу FAM пороговое значение Ct находится в указанных пределах*.
- Если для положительных контролей значение порогового цикла отсутствует или превышает граничное значение*, необходимо повторить ПЦР (п.5.2).
- 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.5.2).
- Если для ОКО определено значение порогового цикла Ct ≤37 (на приборах роторного типа) или Ct ≤40 (на приборах планшетного типа), необходимо повторить исследование, начиная с этапа выделения ДНК (п.5.1), строго соблюдая меры предосторожности для предотвращения контаминации.

* - граничные значения пороговых циклов указаны во вкладыше к набору

6 ФОРМА ВЫПУСКА

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

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Хранение набора должно производиться при температуре -16 до -20^{0}С в защищенном от света месте на протяжении всего срока годности. Транспортирование набора должно производиться при температуре -16°…-20°С.

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

РАЗРАБОТЧИКИ:

Заведующий лабораторией инфекций с природным резервуаром, д-р. мед.наук, проф.
_____ Т.В. Амвросьева
«01» 07 2024 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром, канд.биол.наук
_____ Н.В. Поклонская
«01» 07 2024 г.

Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ О.Н. Казинец
«01» 07 2024 г.

Научный сотрудник лаборатории инфекций с природным резервуаром
_____ З.Ф. Богуш
«01» 07 2024 г.

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