

160 - 6 2018-11-12

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК
боррелии бургдорфери (*Borrelia burgdorferi*)
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

БОРРЕЛИО-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03505 от 22 ноября 2016 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
2.1 Состав набора.....	4
2.2 Количество анализируемых проб	7
2.3 Принцип действия.....	7
2.4 Время проведения анализа	8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
3.1 Специфичность анализа	8
3.2 Аналитическая чувствительность	8
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	8
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	10
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	11
6.1 Взятие клинического материала.....	11
6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала.....	11
6.3 Подготовка биологического материала к выделению ДНК	11
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	12
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	12
7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции	13
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ.....	17
8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции «Джин» или «Джин-4» (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке»)	17
8.2 Регистрация результатов амплификации (формат «с детекцией в режиме реального времени»)	17
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	17
9.1 Учёт результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции или детектирующего амплификатора	17
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	18
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	19
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	19
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	19
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА.....	20
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	20
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	21
Приложение А	22

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Набор реагентов для выявления ДНК боррелии бургдорфери (*Borrelia burgdorferi*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (БОРРЕЛИО-ГЕН) предназначен для выявления ДНК боррелии бургдорфери (*Borrelia burgdorferi*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологическом материале (в образцах плазмы крови человека и в иксодовых клещах).
- 1.2** Функциональное назначение: набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (определение ДНК боррелии бургдорфери в плазме крови человека и в иксодовых клещах).
- 1.3** Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.4** Набор БОРРЕЛИО-ГЕН может быть использован в клинической практике для диагностики болезни Лайма.
- 1.5** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
- 1.6** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в двух форматах:



Формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (маркируется «Flash») – предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием детектора флуоресцентного.



Формат «с детекцией в режиме реального времени» (маркируется «Real-time») – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов.

Набор состоит из следующих комплектов:

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК¹ REF P-002/1			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок/флаконов	Номинальный объём компонента
Лизирующий раствор	Слегка пенящаяся жидкость от бесцветного до светло-голубого цвета	1 флакон	30 мл
Реагент для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	40 мл
Промывочный раствор №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	50 мл
Промывочный раствор №2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	30 мл
Буфер для растворения	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,25 мл
Отрицательный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 1,5 мл
Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Внутренний контрольный образец (ДНК-ВК)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1,0 мл

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК боррелии бургдорфери REF F1-P005-51/2 , формат «Flash», пробирки 0,5 мл			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	50 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

¹ - включается в набор по запросу. Комплект является универсальным для всех форматов.

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК боррелии бургдорфери
REF F1-P005-21/2, формат «Flash», пробирки 0,2 мл

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	50 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК боррелии бургдорфери
REF R1-P005-23/4, формат «Real-time», пробирки

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	48 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК боррелии бургдорфери
REF R1-P005-S3/4, формат «Real-time», стрипы

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	75 мкл

2.2 Количество анализируемых проб

Набор предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 48 определений для формата «с детекцией в режиме реального времени» и 50 определений для формата «с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип действия

Метод: полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) возрастает пропорционально

количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В наборе БОРРЕЛИО-ГЕН в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой ДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца, входит флуоресцентный краситель Hex. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Borrelia burgdorferi	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов БОРРЕЛИО-ГЕН.

2.4 Время проведения анализа – 5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих ДНК боррелии бургдорфери, после проведения реакции амплификации ПЦР-детектор (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующий амплификатор (формат «с детекцией в режиме реального времени») должны регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК боррелии бургдорфери, ПЦР-детектор или детектирующий амплификатор должны регистрировать отрицательный результат.

3.2 Аналитическая чувствительность

Чувствительность анализа: не более 2000 геном-эквивалентов (копий) ДНК боррелии бургдорфери на 1,0 мл образца.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых

кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, ПЦР и электрофореза следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08. Все рабочие поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение одного часа.

Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркованы и храниться отдельно.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности, контакт с организмом человека исключён.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов БОРРЕЛИО-ГЕН требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- обычный амплификатор (для формата «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующий амплификатор (для формата «с детекцией в режиме реального времени»);
- детектор флуоресцентный Джин или Джин-4 (для наборов в формате «с флуоресцентной детекцией по конечной точке»);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 × g;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65 °C;
- микроцентрифуга-вортекс со скоростью вращения 1000-3000 об/мин;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл, 50 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- пестики-гомогенизаторы для пробирок пластиковых вместимостью 1,5 мл;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;
- 96% этанол;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют плазму крови человека, иксодовых клещей.

6.1 Взятие клинического материала

6.1.1 Образцы периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.1.2 Иксодовые клещи

Живого клеща поместите в чистую посуду, в которую предварительно необходимо положить кусок влажной ткани или смоченную водой салфетку (для предотвращения высыхания клеща).

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Транспортировать и хранить:

- образцы крови до начала исследования при температуре от 2 °C до 8 °C в течение 6 часов;
- живого клеща при температуре от 2 °C до 8 °C в увлажненной среде не более 48 часов.

6.3 Подготовка биологического материала к выделению ДНК

6.3.1 Получение плазмы из образцов периферической крови

6.3.1.1 Центрифугируйте пробирки с кровью при 800-1600 × g в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования (Приложение А). Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.3.1.2 Отберите верхнюю фракцию (плазму) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл.

ВНИМАНИЕ! Время от взятия крови до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Примечание - При необходимости плазму допускается хранить при температуре минус 20 °C не более 3 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Перед выделением НК плазму необходимо перемешать.

6.3.2 Иксодовые клещи

6.3.2.1 Поместите клеща в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

6.3.2.2 Добавьте 1,0мл 96% этанола в пробирку с клещом, встряхните пробирку в течение 3-5 сек и центрифугируйте в течение 3-5 сек на микрокентрифуге-вортексе.

6.3.2.3 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

6.3.2.4 Добавьте 1,0 мл физиологического раствора стерильного, встряхните пробирку в течение 3-5 сек и центрифугируйте в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе.

6.3.2.5 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

ВНИМАНИЕ! Подготовленный материал необходимо сразу использовать для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Примечание - В лизирующем растворе допускается выпадение осадка. В случае выпадения осадка в лизирующем растворе, его необходимо растворить нагреванием флакона при 65 °C в течение 10 мин.

При использовании в качестве анализируемого материала плазмы крови человека выполнить пункт 7.1.1, при использовании иксодового клеща – 7.1.2. Далее в обоих случаях выполнить пункты 7.1.3 – 7.1.14.

7.1.1 Образцы плазмы крови

7.1.1.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца (К-) по одной пробирке объёмом 1,5 мл.

7.1.1.2 Внесите в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.

7.1.1.3 Добавьте по 100 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов (за исключением пробирки «К-»).

7.1.1.4 В пробирку, промаркованную «К-», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.1.5 Термостатируйте пробирки при 65 °C в течение 15 мин, центрифугируйте при 16000 х г в течение 30 сек при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).

7.1.2 Иксодовые клещи

7.1.2.1 Промаркируйте одну пробирку объёмом 1,5 мл для отрицательного контрольного образца (К-).

7.1.2.2 Добавьте в каждую пробирку с подготовленным иксодовым клещом (см. 6.3.2) и пробирку «К-» по 300 мкл лизирующего раствора (отдельным наконечником для каждой пробирки).

7.1.2.3 В пробирку, промаркованную «К-», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.1.2.4 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.2.5 Термостатируйте пробирки при 65 °C в течение одного часа.

7.1.2.6 Разотрите клеша пестиком-гомогенизатором (отдельным пестиком для каждой пробирки).

- 7.1.2.7 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните в течение 3–5 сек и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.1.2.8 Перенесите надосадочную жидкость в новые пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл.
- 7.1.3 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, закройте крышки пробирок и встряхните на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.1.4 Центрифугируйте пробирки при 16000 × g в течение 15 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.1.5 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.6 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки.
- 7.1.7 Центрифугируйте пробирки при 16000 × g (в течение 5 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C)).
- 7.1.8 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.9 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки.
- 7.1.10 Центрифугируйте пробирки при 16000 × g в течение 5 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).
- 7.1.11 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.12 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °C в течение 5 мин.
- 7.1.13 Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения, закройте крышки пробирок. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 сек на микроцентрифуге-вортексе. Прогрейте пробирки при температуре 65 °C в течение 10 мин.
- 7.1.14 Осадите конденсат центрифугированием пробирок при 16000 × g в течение 30 с.

Препарат ДНК готов для проведения ПЦР.

П р и м е ч а н и е - Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20 °C не более 6 месяцев или при температуре минус 70 °C не более одного года.

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 7.1.2 Промаркируйте по одной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К–) и положительного контрольного образца (К+).

П р и м е р : Необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 10 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для «К+» и одну пробирку для «К–». Общее количество пробирок – 12.

ВНИМАНИЕ! При использовании для учёта результатов амплификации детектора флуоресцентного (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке») необходимо промаркировать дополнительно две пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (две нормировочные пробирки «ФОН») для контроля фона флуоресценции.

Пример: Необходимо проанализировать 10 образцов. Нужно промаркировать 10 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для «К+», одну пробирку для «К-» и две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 14.

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Во все промаркованные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. В пробирки, промаркованные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.2.4 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

7.2.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительном контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 сек и центрифугируйте в течение 1-3 сек на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание - Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в соответствующие промаркованные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

7.2.7 Внесите в пробирку, промаркованную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркованную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Внесите в пробирку, промаркованную «ФОН», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.10 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.11 Установите все пробирки в блок амплификатора.

7.2.11.1 Формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке»

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённым для амплификаторов с активным регулированием (Таблица 2).

Примечание - Более подробное описание программирования и управления термостатом «Терцик» содержится в инструкции к прибору (см. «Руководство пользователя»).

Таблица 2 - Режим амплификации для амплификатора «Терцик»

Формат «Flash». Алгоритм регулирования: «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Количество циклов	
	Температура	Время			
		мин	с		
1	94 °C	1	0	1	
2	94 °C	0	5	5	
	64 °C	0	5		
	67 °C	0	5		
3	94 °C	0	1	40	
	64 °C	0	5		
	67 °C	0	5		
4	10 °C	Хранение	

Примечание - При работе с комплектами в формате «с флуоресцентной детекцией по конечной точке» готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в течение одного месяца в тёмном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру от 18 °C до 25 °C, поэтому за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.2.11.2 Формат «с детекцией в режиме реального времени»

Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР создайте и сохраните новый тест. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол сохраненный тест, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (7.2.11) и проведите ПЦР (таблица 3).

Таблица 3 - Режим амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

Формат «Real-time»

№ блока	Температура	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
1	80 °C	0	30	1		Цикл
	94 °C	1	30			
2	94 °C	0	30	5		Цикл
	64 °C	0	15		✓	
3	94 °C	0	10	45		Цикл
	64 °C	0	15		✓	
4	94 °C	0	5	1		Цикл
5	10 °C	Хранение		Хранение

Для прибора iCycler iQ:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 минут. Запустите программное обеспечение iCycler iQ. При первой постановке создайте и сохраните новый протокол. При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию плашки (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в плашке) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 4).

Таблица 4 - Режим амплификации для амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Формат «Real-time»

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo					
1	1				
		1	01:00	80,0	
		2	01:30	94,0	
2	5				
		1	00:30	94,0	
		2	00:45	64,0	
3	2				
		1	00:30	80,0	Real-time
Программа амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:45	64,0	Real-time
5		10,0	Storage

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1** Регистрация результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции «Джин» или «Джин-4» (формат «с флуоресцентной детекцией по конечной точке»)

После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в детектор флуоресценции (ПЦР-детектор), оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для детектора флуоресценции «Джин» или «Джин-4», п.4 «Порядок работы с прибором»).

Примечание - Пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50.

- 8.2** Регистрация результатов амплификации (формат «с детекцией в режиме реального времени»)

- 8.2.1 Для приборов Д-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для амплификаторов детектирующих Д-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96).

- 8.2.2 Для прибора iCycler iQ:

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1** Учёт результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции или детектирующего амплификатора

- 9.1.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектором флуоресценции (ПЦР-детектором) или детектирующим амплификатором.

- 9.1.2 В биологических образцах, содержащих искомый фрагмент генома боррелии бургдорфери, программа фиксирует положительный результат (экспоненциальный рост кривой). Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

- 9.1.3 В биологических образцах, не содержащих искомый фрагмент генома боррелии бургдорфери, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

- 9.1.4 В случае отрицательного результата на наличие искомого фрагмента генома боррелии бургдорфери и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный.

Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

- 9.1.5 При использовании детектора флуоресценции (ПЦР-детектора) программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта (наличие генома боррелии бургдорфери) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см. 9.1.4).
- 9.1.6 При получении положительного результата на наличие генома боррелии бургдорфери в отрицательном контролльном образце (К-), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.1.2 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Комплекты реагентов для выделения нуклеиновых кислот и ПЦР-амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

10.2.2 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, а также с истекшим сроком годности, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;

10.4 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.3 Входящие в состав набора реагентов жидкие компоненты, пришедшие в непригодность, перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой 1:100.

11.4 Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

ВНИМАНИЕ! В случае вскрытия упаковки набора в боксе она относится к отходам класса Б и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

IVD	Только для in vitro диагностики		Дата производства
	Температурный диапазон		Содержит инструкцию по применению
	Количество определений		Каталожный номер
	Годен до		Адрес производителя
LOT	Серия набора		Не допускается воздействие солнечного света
	Не стерильно		Одноразовое использование

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при использовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-Производственное Объединение ДНК-Технология», ООО «НПО ДНК-Технология» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.

Адрес производителя: ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии набора):

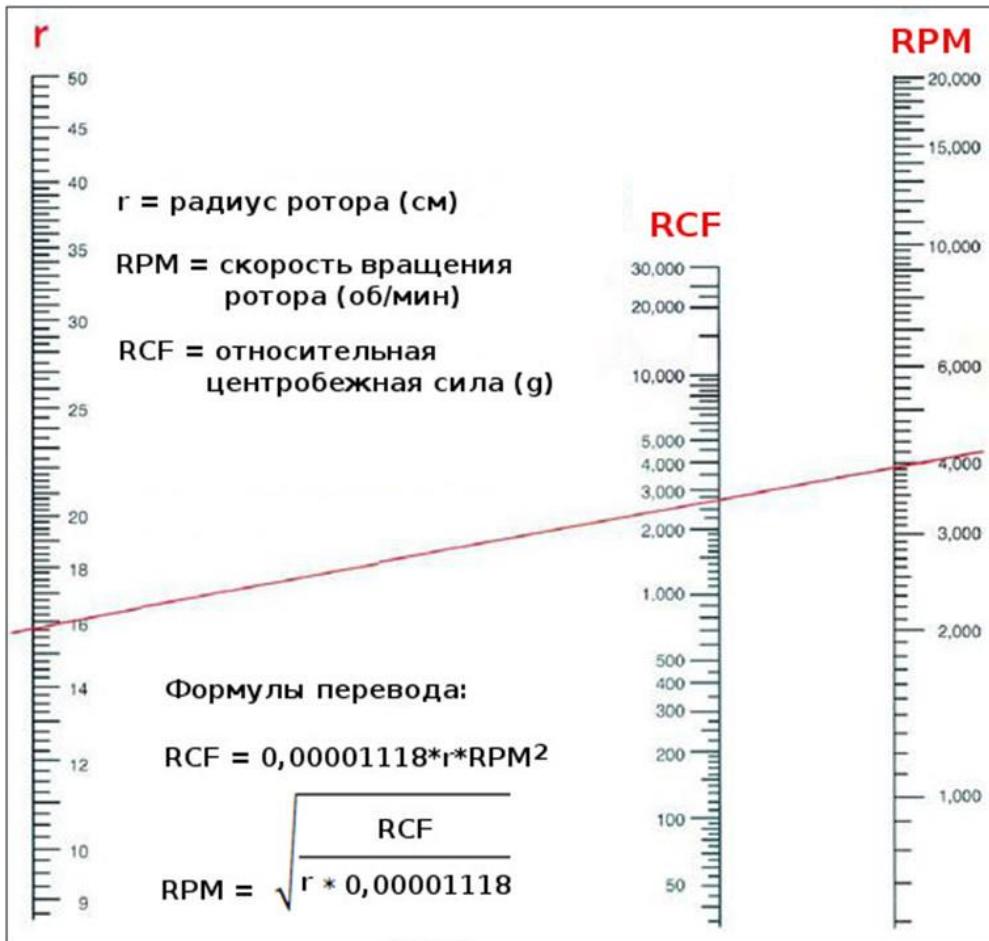
- 1) ООО «НПО ДНК-Технология»: Россия, 142281, Московская обл. г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.
- 2) ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов БОРРЕЛИО-ГЕН, следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru
Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (звонок по России бесплатный),
+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),
E-mail: hotline@dna-technology.ru

Приложение А
(справочное)

Номограмма и формула перевода относительного ускорения центрифуги (RCF) в скорость вращения (RPM) в зависимости от диаметра ротора



ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 5, комн.14
Тел./факс +7 (495) 640-17-71
Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru