

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гриппа А
субтипа Н5N1 («птичьего гриппа»)
(Influenza A virus subtype H5N1)
методом полимеразной цепной реакции
с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1.** Набор реагентов предназначен для выявления *in vitro* РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1) в биологическом материале человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки) и материале от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).
- 1.2.** Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК методом ПЦР. Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающемся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Набор реагентов включает смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1).

Последовательности праймеров, используемых в данном наборе, полностью соответствуют праймерам, рекомендованным Всемирной Организацией Здравоохранения в 2005 году.

В набор реагентов входит внутренний контрольный образец, представляющий собой стабилизированный фрагмент РНК (РНК-ВК). Он предназначен для оценки качества всех этапов

исследования и добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот.

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 амплификационную 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) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации искомой кДНК и внутреннего контрольного образца, включены флуоресцентные метки FAM и HEX соответственно (Таблица 1), что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вирусов гриппа А субтипа H5N1 и внутреннего контрольного образца.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Для проведения ПЦР и детекции используют:

- термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырёхканальный Терцик (ООО «НПО ДНК-Технология») и детектор флуоресцентный Джин или Джин-4 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

или

- амплификаторы детектирующие ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), амплификатор iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories).

ВНИМАНИЕ! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании.

Таблица 1

Каналы детекции продуктов амплификации

FAM	HEX	Rox	Cy5
Вирус гриппа А Н5 (Influenza A virus H5)	PHK-BK	-	-
Вирус гриппа А Н1 (Influenza A virus N1)	PHK-BK	-	-

2.2. Состав набора

Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа Н5Н1 («птичьего гриппа») методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) состоит из следующих компонентов:

1. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК) включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (15 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (20 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (25 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (15 мл);
- буфер для растворения – 2 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец («К-») – 1 пробирка (1,5 мл);

- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (500 мкл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (500 мкл).

2. Комплект реагентов для обратной транскрипции включает:

- смесь праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) для обратной транскрипции «Праймеры ОТ-ИнфА+дНТФ» – 1 пробирка (50 мкл);
- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (25 мкл).

3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации «Вирус гриппа А Н5 (Influenza A virus H5)», запечатанную парафином, – 50 пробирок (по 20 мкл);
- смесь для амплификации «Вирус гриппа А N1 (Influenza A virus N1)», запечатанную парафином, – 50 пробирок (по 20 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- Taq-полимеразу – 1 пробирка (50 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») Н5 – 1 пробирка (75 мкл);
- положительный контрольный образец («К+») N1 – 1 пробирка (75 мкл).

В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в двух форматах:



«FLASH» - предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием детектора флуоресцентного.



«Real-time» - предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих.

- 2.3.** Время проведения анализа – 5 часов (с учётом пробоподготовки).
- 2.4.** Набор рассчитан на проведение 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих РНК вируса гриппа А субтипа H5N1, после проведения реакций обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с двумя комплектами «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)», детектор флуоресцентный или амплификатор детектирующий должен регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вируса гриппа А субтипа H5N1, после проведения реакций обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, детектор флуоресцентный или амплификатор детектирующий должен регистрировать отрицательный результат при проведении реакции с любым из двух комплектов или с обоими комплектами.

3.2. Аналитическая чувствительность на 1,0 мл образца:

1000 геном-эквивалентов РНК вируса гриппа А субтипа H5N1.

3.3 Диагностическая чувствительность:

94%

3.4 Диагностическая специфичность:

91%

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с комплектами реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для наборов в формате «FLASH») или детектирующий амплификатор (для наборов в формате «Real-time»);
- детектор флуоресцентный Джин или Джин-4 (для наборов в формате «FLASH»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл (для наборов в формате «Real-time»);
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 0,5 мл;

- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб (производство ООО «НПО ДНК-Технология») и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный;
- комплект для выделения НК из биологического материала (ПРОБА-НК производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для детекторов флуоресцентных:

- версия ПО не ниже 3.3.

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТ-322 и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3., рекомендуемая версия 7.3.4.0.¹

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют мазки и смывы из полости носа и ротоглотки; материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы).

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК.

¹ – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/support/>

6.1. Взятие образцов биологического материала

6.1.1. Взятие образцов биологического материала человека

Взятие мазков проводится сухим стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с транспортной средой для биопроб.

Смывы собирают в стерильную пробирку.

6.1.2. Взятие образцов биологического материала животных

Взятие мазков проводится сухим стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с транспортной средой для биопроб.

Внутренние органы и пробы фекалий помещают в стерильную сухую посуду.

6.1.3. Общие требования

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортировка и предварительная обработка.

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

6.1.4. Материал для исследований

Решение о выборе места взятия материала для исследования принимает врач.

6.2. Особенности взятия биологического материала у человека

6.2.1. Особенности взятия мазков из полости носа

Зонд вводят лёгким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

6.2.2. Особенности взятия мазков из ротоглотки

Мазки берут вращательным движением с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки глотки.

6.2.3. Особенности взятия смывов из ротоглотки

Перед взятием смывов из ротоглотки проводят предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10–15 секунд) 8,0–10 мл физиологического раствора стерильного. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования.

6.2.4. Особенности взятия смывов из полости носа

Взятие материала производят в положении больного сидя с отклонённой назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода поочередно с помощью зонда или одноразового шприца вводят по 3,0–5,0 мл теплого физиологического раствора стерильного. Промывную жидкость из обоих носовых ходов собирают через воронку в одну стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без предварительного автоклавирования.

6.3. Порядок взятия мазков в пробирку с транспортной средой

6.3.1. Откройте крышку пробирки.

6.3.2. С помощью одноразового зонда возьмите мазок. Перенесите зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости и выбросьте. При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

6.3.3. Плотно закройте крышку пробирки, промаркируйте пробирку.

6.4. Порядок взятия смывов

6.4.1. Соберите промывочную жидкость в стерильную пробирку. При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал в новую пробирку.

6.4.2. Перенесите 300 мкл собранной жидкости в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл. При взятии материала из нескольких биотопов необходимо переносить его в отдельные пробирки.

6.4.3. Плотно закройте крышку пробирки, промаркируйте пробирку.

6.5. Порядок взятия внутренних органов и фекалий у животных

- Поместите внутренние органы (фрагменты трахеи и легких, селезёнка, мозг, печень и др.) в стерильную сухую посуду, плотно закройте крышкой, промаркируйте.
- Перенесите пробы фекалий (4–5 г) в стерильную сухую посуду, плотно закройте крышкой, промаркируйте.

6.6. Транспортировка и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов.

Транспортировать и хранить образцы до начала исследования следует при 2–8°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка материала к выделению РНК

7.1.1 Мазки и смывы

- Центрифугируйте пробирку, содержащую анализируемый материал, при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.2 Фекалии

- Перенесите ~250 мг (мкл) фекалий в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного. Встряхните пробирку на вортексе в течение 5–10 сек.
- Центрифугируйте пробирку при 1000 об/мин в течение 2–3 мин.
- Перенесите 800–1000 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируйте при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.3. Внутренние органы животных

- Поместите ~250 мг исследуемого материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.
- Добавьте 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
- Встряхните пробирку на вортексе в течение 3–5 сек, центрифугируйте пробирку на микроцентрифуге/вортексе при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- Удалите надосадочную жидкость.

7.2. Выделение РНК из биологического материала с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

ВНИМАНИЕ! На этапе выделения РНК используйте только наконечники с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

Одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо провести пробоподготовку отрицательного контрольного образца «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца и выполните п. 7.2.1. – 7.2.17. настоящей инструкции.

Примечание. В лизирующем растворе допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65°C в течение 10 мин.

- 7.2.1. Внесите в каждую пробирку с образцом, прошедшим предподготовку (п. 7.1.), и отрицательным контрольным образцом по 10 мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК). ДНК-ВК не используется.
- 7.2.2. Добавьте в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.
- 7.2.3. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.2.4. Термостатируйте пробирки 15 мин при 65°C, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

ВНИМАНИЕ! При выделении РНК вируса гриппа А из тканей внутренних органов животных термостатируйте пробирки при 65°C в течение 30 мин, осадите конденсат центрифугированием при 1000

об/мин в течение 3-5 сек. Перенесите надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

7.2.5. Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.2.6. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

7.2.7. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.2.8. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирку.

7.2.9. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.2.10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.2.11. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирку.

7.2.12. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.2.13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).

7.2.14. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65°C в течение 5 мин.

7.2.15. Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 сек.

7.2.16. Прогрейте пробирки при 65°C в течение 10 мин. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.

7.2.17. Осадите капли центрифугированием пробирок при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Полученный препарат РНК рекомендуется сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

7.3. Подготовка и проведение обратной транскрипции

7.3.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К–» по одной пробирке объемом 0,5 мл.

- 7.3.2. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-ИнфА+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25°C), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.3.3. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
- 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-ИнфА+дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,
- где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

- 7.3.4. Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.3.5. Добавьте в промаркированные пробирки по 3,5 мкл ОТ-смеси.
- 7.3.6. Внесите в пробирки для исследуемых образцов с ОТ-смесью по 16,5 мкл соответствующего образца РНК, используя отдельные наконечники для каждого образца.
- 7.3.7. В пробирку, маркированную «К-», внесите 16,5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с аэрозольным барьером.

- 7.3.8. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 7.3.9. Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40°C в течение 30 мин, затем прогрейте при 95°C в течение 5 мин.

Примечание. Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» производства «НПО ДНК-Технология»).

- 7.3.10. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание. Допускается хранение кДНК при температуре минус 20°С в течение 1 месяца.

7.4. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ! Для получения достоверных результатов о наличии в образце вируса гриппа А субтипа H5N1 одновременно проводят реакции с комплектами «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)».

7.4.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца («К+») и отрицательного контрольного образца («К-») по две пробирки с запечатанными парафином смесями для амплификации («Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)»). Для каждого положительного контрольного образца («К+») промаркируйте по одной пробирке с соответствующей запечатанной парафином смесью для амплификации.

ВНИМАНИЕ! При использовании для учёта результатов амплификации детектора флуоресцентного (формат «Flash») необходимо промаркировать дополнительно две пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и две пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)» (всего четыре нормировочные пробирки «ФОН») для контроля фона флуоресценции.

7.4.2. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Таq-полимеразой на микроцентрифуге/вортексе, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

7.4.3. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5 x (N+1) мкл Таq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+».

ВНИМАНИЕ! Таq-полимеразу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

7.4.4. Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Таq-полимеразой в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе, затем центрифугируйте в течение 1–3 сек.

Смесь можно хранить при комнатной температуре (18–25°C) не более 1 ч.

- 7.4.5. Добавьте в каждую пробирку (за исключением пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. В пробирки, маркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 7.4.6. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

Примечание. Для предотвращения контаминации следует перед внесением образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Образцы следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

- 7.4.7. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
- 7.4.8. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирки, маркированные «К-» и «ФОН». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца в пробирки, маркированные «К+».
- 7.4.9. Центрифугируйте все пробирки при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 1-3 сек.
- 7.4.10. Установите все пробирки в амплификатор или термостат программируемый и проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл (Таблицы 2, 3, 4).

Для ДТ-322 и ДТ-96 версия ПО не ниже 7.3., рекомендуемая версия 7.3.4.0².

Оформление протокола (для ДТ-322 и ДТ-96 тип анализа «Качественный») проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322 или ДТ-96, «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

² – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/support/>

Таблица 2. **Формат «FLASH»**

Режим амплификации для амплификатора Терцик
Алгоритм регулирования – «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °С	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 64,0 72,0	0 0 0	5 5 5	5
3	94,0 64,0 72,0	0 0 0	1 5 5	40
4	10,0	хранение

Таблица 3. **Формат «Real-time»**

Режим амплификации для амплификаторов детектирующих
ДТ-322 и ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 4. **Формат «Real-time»**

Режим амплификации для детектирующего амплификатора
iCycler iQ

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	00:30	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

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8°C в течение 5 суток.

Примечание: При работе с наборами в формате «FLASH» 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 2–8°C в течение 1 месяца в тёмном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18–25°C), поэтому за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ДЕТЕКЦИИ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции «Джин» или «Джин-4» (формат «FLASH»)

После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в детектор флуоресценции, оформите протокол и

проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору.

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

8.2. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 или ДТ-96 (формат «Real-time»)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим в соответствии с инструкцией к прибору.

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п.4.6. «Руководство по эксплуатации. Часть 1. Работа с прибором»).

Анализ проводится автоматически. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, пороговый цикл (C_p), результат для каждого образца (качественный анализ).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

8.3. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ.

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектором флуоресценции или амплификатором детектирующим.

9.2. Для биологических образцов, содержащих РНК вируса гриппа А субтипа H5N1, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации

внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

ВНИМАНИЕ! Образец считается положительным (содержит РНК вируса гриппа А субтипа H5N1), если программа фиксирует положительный результат для каждого из комплектов «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)».

9.3. Для биологических образцов, не содержащих РНК вируса гриппа А субтипа H5N1, и отрицательного контрольного образца, при условии получения положительного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

ВНИМАНИЕ! Образец считается отрицательным при получении отрицательного результата для любого из двух комплектов «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)».

9.4. Внутренний контрольный образец (канал Hex) определяется в биологических образцах, положительных контрольных образцах и отрицательном контрольном образце. При высокой первоначальной концентрации специфичной РНК-мишени в образцах внутренний контрольный образец может не определяться.

9.5. В случае отрицательного результата на наличие РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторная постановка препарата кДНК, повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

Примечание. При учёте результатов реакции с помощью детектора флуоресценции (формат «FLASH») программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфики (наличие кДНК вируса гриппа А субтипа H5N1) попадает в зону

неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.5.).

- 9.6.** Для положительных контрольных образцов программа фиксирует положительный результат по каналу Fam. При получении отрицательного значения результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.
- 9.7.** Для отрицательного контрольного образца программа фиксирует отрицательный результат по каналу Fam. При получении положительного значения результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 10.1.** Срок годности набора: формат «FLASH» – 6 месяцев с даты изготовления. Формат «Real-time» – 9 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации, следует хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре 2–8°C. Допускается многократное размораживание ПЦР-буфера и минерального масла.
- 10.3.** Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в тёмном месте при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.
- 10.4.** Транспортировку набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.5.** Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

- 10.6.** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.7.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6.

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail:help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru