

ИНСТРУКЦИЯ

по применению наборов реагентов
для выявления РНК вирусов гриппа А – **Influenza A virus**;
гриппа В – **Influenza B virus**;
вирусов пандемического гриппа А(Н1N1), подобных штамму
А/California/4/2009 («свиной грипп» - **Пан Н1N1**),
методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции
(ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Регистрационные удостоверения:
Influenza A virus, Influenza B virus (ГриппКомплекс)
№ФСР 2011/12014;
Пан Н1N1
№ФСР 2010/07921

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению наборов реагентов
для выявления РНК вирусов гриппа А – Influenza A virus;
гриппа В – Influenza B virus; вирусов пандемического
гриппа А(Н1N1), подобных штамму
А/California/4/2009 («свиной грипп» - Пан Н1N1),
методом обратной транскрипции и полимеразной цепной
реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы реагентов предназначены для выявления *in vitro*:

РНК вирусов гриппа А (Influenza A virus) 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);

РНК гриппа В (Influenza B virus) в биологическом материале человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки);

РНК нейраминидазы вирусов пандемического гриппа А(Н1N1), подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп»), в биологическом материале человека (мазки и смывы из полости носа и ротоглотки) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

Наборы могут быть использованы в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ

2.1. Принцип действия

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-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 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 содержит 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.

Исследование с использованием наборов реагентов Influenza A virus, Influenza B virus, Пан H1N1 состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

Набор реагентов Influenza A virus включает смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для вирусов гриппа А. Набор реагентов Influenza B virus включает смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для вирусов гриппа В. Набор реагентов ПАН H1N1 включает смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для вирусов пандемического гриппа А(H1N1), подобных штамму A/California/04/2009 («свиной грипп»).

В наборах Influenza A virus; Influenza B virus; Пан H1N1 в пробирки со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продуктов амплификации искомой кДНК и внутреннего контрольного образца, включены флуоресцентные метки Fam и Hex соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации кДНК вирусов гриппа 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 используют амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 .

Таблица 1.
Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza A virus	BK	-	-	-
Influenza B virus	BK	-	-	-
Пан H1N1	BK	-	-	-

2.2. Наборы рассчитаны на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3. Состав наборов

Наборы реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А – **Influenza A virus**; гриппа В – **Influenza B virus**; вирусов пандемического гриппа А(Н1N1), подобных штамму А/California/4/2009 («свиной грипп» – **Пан H1N1**), методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени состоят из следующих компонентов:

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2,

² – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6

1. Комплект реагентов для обратной транскрипции включает:

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

2. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, – 48 пробирок (по 20 мкл в каждой);
- ПЦР-буфер – 1 пробирка (500 мкл);
- Taq-полимеразу – 1 пробирка (25 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (75 мкл).

2.4. Время проведения анализа – 5 часов (с учётом пробоподготовки).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих РНК выявляемых соответствующим комплектом вирусов гриппа (А, В или А(Н1N1), подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп»)), после проведения реакций обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, амплификатор должен регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих РНК выявляемых соответствующим комплектом вирусов гриппа (А, В или А(Н1N1), подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп»)), после проведения реакций обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, амплификатор должен регистрировать отрицательный результат.

3.2. Аналитическая чувствительность на 1,0 мл образца :

1000 геном-эквивалентов РНК вирусов гриппа (А, В или А(Н1N1), подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп»)).

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:

- амплификатор детектирующий;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65 °С;
- 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;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объемом 0,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;

- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объемом 2–20 мкл, 20–200 мкл; 100–1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- 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 (рекомендуется ПРОБА-НК производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3, рекомендуемая версия 7.3.5.57.³

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения НК из биологического материала.

³ – 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/po/>

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 образцов биологического материала человека

6.2.1. Мазки из полости носа

Мазки берут сухим стерильным зондом, для чего 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. Зонд погружают в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10–15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Затем извлекают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удаляют избыток

жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируют, пробирку маркируют.

6.2.2. Мазки из ротоглотки

Мазки берут сухим стерильным зондом вращательным движением с поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки глотки. Зонд помещают в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с транспортной средой для биопроб, вращают зонд в течение 10–15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Затем извлекают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удаляют избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируют, пробирку маркируют.

6.2.3. Смывы 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. Смывы из ротоглотки (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.2.4. Смывы 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. Смывы (300 мкл) переносят в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, пробирки закрывают крышками и маркируют.

6.3. Особенности взятия образцов биологического материала животных

Мазки из трахеи, полости носа, глотки, клоаки берут сухим стерильным зондом, переносят в пластиковые пробирки объёмом

1,5 мл с транспортной средой для биопроб. Пробирки закрывают крышками и маркируют.

Внутренние органы (фрагменты трахеи и легких, селезенка, мозг, печень и др.) помещают в стерильную сухую посуду, которую плотно закрывают крышкой и маркируют.

Пробы фекалий (4–5 г) переносят в стерильную сухую посуду, которую плотно закрывают крышкой и маркируют.

6.4. 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 °С.

В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка материала к выделению РНК

7.1.1. Мазки и смывы

7.1.1.1. Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.1.2. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.2. Фекалии

7.1.2.1. 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.

7.1.2.2. Центрифугируйте пробирку при 1000 об/мин в течение 2–3 мин.

7.1.2.3. Перенесите 800–1000 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируйте при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.2.4. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.3. Внутренние органы животных

7.1.3.1. Поместите ~250 мг исследуемого материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

7.1.3.2. 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.

7.1.3.3. Удалите надосадочную жидкость.

7.2. Выделение РНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект для выделения РНК из биологического материала не входит в состав наборов ГриппКомплекс и ПАН H1N1.

Выделение РНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемый комплект для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала: ПРОБА-НК.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения РНК из биологического материала совместно с комплектами для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения РНК одновременно с выделением РНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК).

7.3. Выделение РНК 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 подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца и выполните п.п. 7.3.1 – 7.3.14.

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

- 7.3.1. Добавьте в пробирки с исследуемыми образцами и «К-» по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.
- 7.3.2. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.3.3. Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 мин, 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 °С в течение 30 мин, осадите конденсат центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек и перенесите надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

- 7.3.4. Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.3.5. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.
- 7.3.6. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.3.7. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.3.8. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 7.3.9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.
- 7.3.10. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.
- 7.3.11. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 7.3.12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

- 7.3.13. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 7.3.14. Добавьте к осадку 50 мкл буфера для растворения и прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

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

7.4. Проведение реакции обратной транскрипции

- 7.4.1. Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объёмом 0,5 мл с учётом пробирки для отрицательного контрольного образца «К-».
- 7.4.2. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25 °С), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

Примечание. В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует дополнительно прогреть при 18–25 °С до полного растворения осадка.

- 7.4.3. В отдельной пластиковой пробирке приготовьте ОТ-смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
- 1,0 x (N+1) мкл праймеров «ОТ-RANDOM+дНТФ»,
- 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

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

Например, необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 6. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 7 (6+1) пробирок, т.е. 14 мкл ОТ-буфера + 7 мкл праймеров + 3,5 мкл обратной транскриптазы.

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

7.4.4. По 3,5 мкл ОТ-смеси внесите в промаркированные пробирки.

7.4.5. В пробирки с ОТ-смесью внесите по 16,5 мкл соответствующего образца РНК (или образца «К-»), используя отдельные наконечники для каждого образца.

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

7.4.6. Пробирки встряхните на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.4.7. Пробирки поместите в термостат и инкубируйте при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем при температуре 95 °С в течение 5 мин.

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

7.4.8. Осадите конденсат 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 мес.

7.5. Проведение полимеразной цепной реакции

7.5.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации (по одной для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца – «К-» и для положительного контрольного образца – «К+»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 7.

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

7.5.3. В отдельной пластиковой пробирке, предварительно перемешав реагенты, приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой:

- 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+».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов, один «К–» и один «К+». Промаркированных пробирок – 7. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Таq-полимеразы для 8 (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера + 4 мкл Таq-полимеразы.

7.5.4. Перемешайте приготовленную смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

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

7.5.5. Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл перемешанной смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой.

7.5.6. В каждую пробирку добавьте по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закройте пробирки.

7.5.7. Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

Внесите в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл соответствующего препарата кДНК (кроме пробирок «К–», «К+»).

7.5.8. В пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции.

- 7.5.9. В пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.5.10. Все пробирки центрифугируйте при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3–5 сек.
- 7.5.11. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл с соответствующим названием (п.8.1). При последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест (п.9.1), укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (п.9.1.6) и проведите ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2

Программа амплификации для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм 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	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0	Хранение		Хранение

7.6. Загрузка теста для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере

Версия ПО не ниже 7.3, рекомендуемая версия 7.3.5.57⁴.

Примечание. Для иллюстраций в настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.3.5.57.

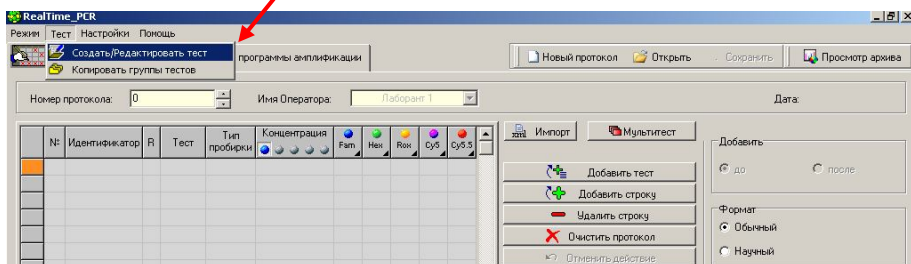
Загрузка и работа с тестом представлены на примере ini файла «Influenza_V».

Тесты (ini файлы) для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляются производителем набора. Их установку в программу Real Time_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

7.6.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с наборами Influenza A virus; Influenza B virus; Пан H1N1, выберите режим «Работа с прибором».

При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

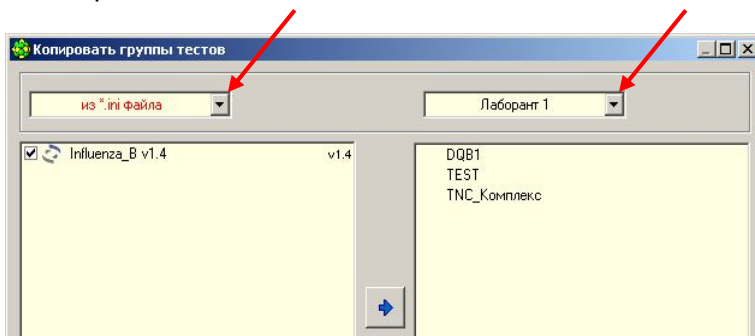
7.6.2. В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».




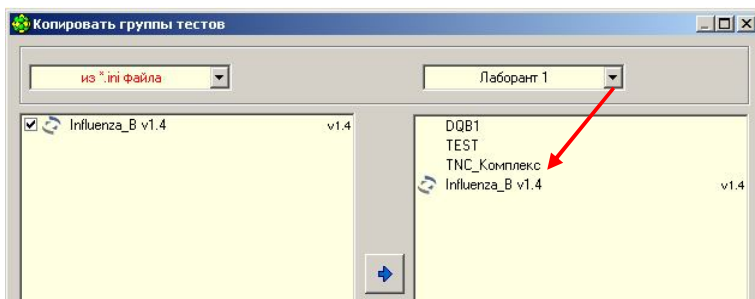
7.6.3. В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл.

⁴ – 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/po/>

- 7.6.4. В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тесты.



- 7.6.5. Нажмите кнопку , после чего выбранные тесты появятся в правой половине окна.

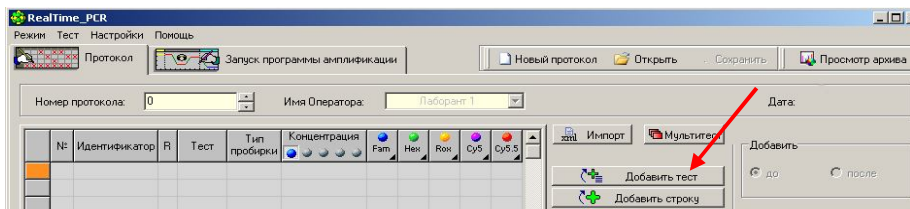


Теперь с тестами может работать оператор, для которого были скопированы тесты.

7.7. Ежедневная работа с тестом

- 7.7.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тесты (см. п. 7.5.4), выберите режим «Работа с прибором».

- 7.7.2. Нажмите кнопку «Добавить тест».



7.7.3. Выберите из списка тест.

Добавить тест

Тест: Influenza_B_v1.4 v1.4 Все тесты

Описание: DQB1
Influenza_B_v1.4
TEST
TNC_Комплекс

Тип анализа: Качественный

1. Образцы: Количество: 1 Дубли: 1

2. Стандарты: Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 2

3. Контроли: Положительные (K+): 1
Отрицательные (K-): 1

Подробнее Добавить Ok Отмена

7.7.4. Укажите количество исследуемых образцов, нажмите кнопку «Ok».

Добавить тест

Тест: Influenza_B_v1.4 v1.4 Все тесты

Описание: Influenza B virus. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК

Тип анализа: Качественный

1. Образцы: Количество: 5 Дубли: 1

2. Стандарты: Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 2

3. Контроли: Положительные (K+): 1
Отрицательные (K-): 1

Подробнее Добавить Ok Отмена

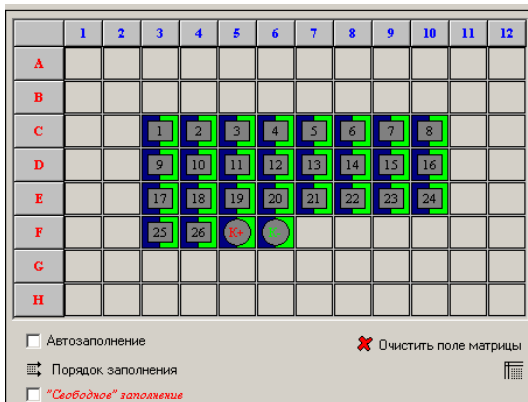
7.7.5. Укажите идентификаторы пробирок.

№	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fam	Nek	Rok	CuS	CuS.5
A1	Образец_1		целза_в_в							
A2	Образец_2		целза_в_в							
A3	Образец_3		целза_в_в							
A4	Образец_4		целза_в_в							
A5	Образец_5		целза_в_в							
A6	Образец_6		целза_в_в							
A7	Образец_7		целза_в_в							
A8	Образец_8		целза_в_в							
A9	Образец_9		целза_в_в							
A10	Образец_10		целза_в_в							
A11	Образец_11		целза_в_в							
A12	Образец_12		целза_в_в							
B1	Образец_13		целза_в_в							
B2	Образец_14		целза_в_в							
B3	Образец_15		целза_в_в							
B4	Образец_16		целза_в_в							
B5	Образец_17		целза_в_в							
B6	Образец_18		целза_в_в							
B7	Образец_19		целза_в_в							
B8	Образец_20		целза_в_в							
B9	Образец_21		целза_в_в							
B10	Образец_22		целза_в_в							
B11	Образец_23		целза_в_в							
B12	Образец_24		целза_в_в							
C1	K+		целза_в_в	K+						
C2	K-		целза_в_в	K-						

7.7.6. Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при необходимости нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» – и «Порядок заполнения» –).

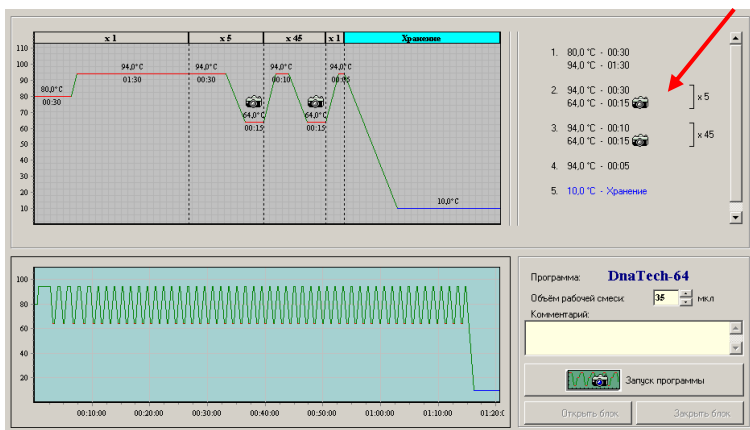
№	Идентификатор	R	Тест	Тип пробирки	Концентрация	Fam	Nek	Rok	CuS	CuS.5
A1	Образец_1		целза_в_в							
B1	Образец_2		целза_в_в							
C1	Образец_3		целза_в_в							
D1	Образец_4		целза_в_в							
E1	Образец_5		целза_в_в							
F1	Образец_6		целза_в_в							
G1	Образец_7		целза_в_в							
H1	Образец_8		целза_в_в							
A2	Образец_9		целза_в_в							
B2	Образец_10		целза_в_в							
C2	Образец_11		целза_в_в							
D2	Образец_12		целза_в_в							
E2	Образец_13		целза_в_в							
F2	Образец_14		целза_в_в							
G2	Образец_15		целза_в_в							
H2	Образец_16		целза_в_в							
A3	Образец_17		целза_в_в							
B3	Образец_18		целза_в_в							
C3	Образец_19		целза_в_в							
D3	Образец_20		целза_в_в							
E3	Образец_21		целза_в_в							
F3	Образец_22		целза_в_в							
G3	Образец_23		целза_в_в							
H3	Образец_24		целза_в_в							
A4	K+		целза_в_в	K+						
C4	K-		целза_в_в	K-						

Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока.



7.7.7. Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.7.8. В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации.



7.7.9. Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

7.7.10. Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. п.7.5.1).

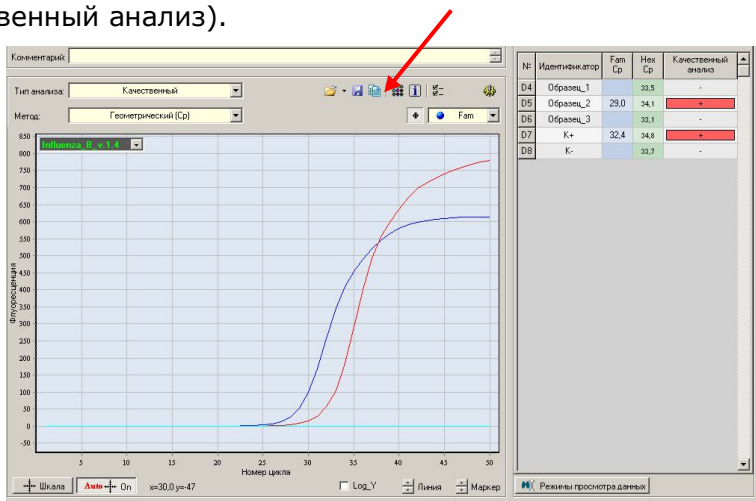
8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала проводится прибором во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются амплификатором детектирующим автоматически.

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 программным обеспечением. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ).



По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчёта необходимо нажать

кнопку  .

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

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

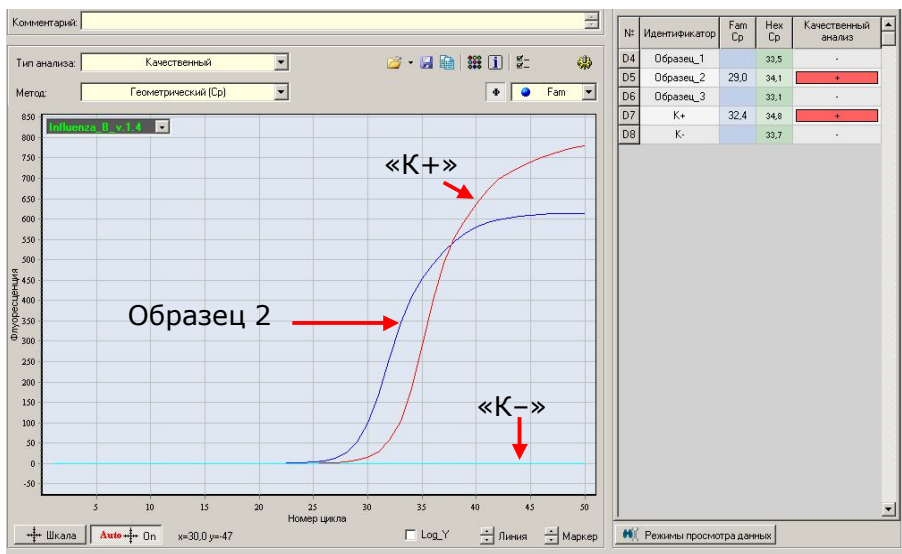
Таблица 3

Интерпретация результатов ПЦР

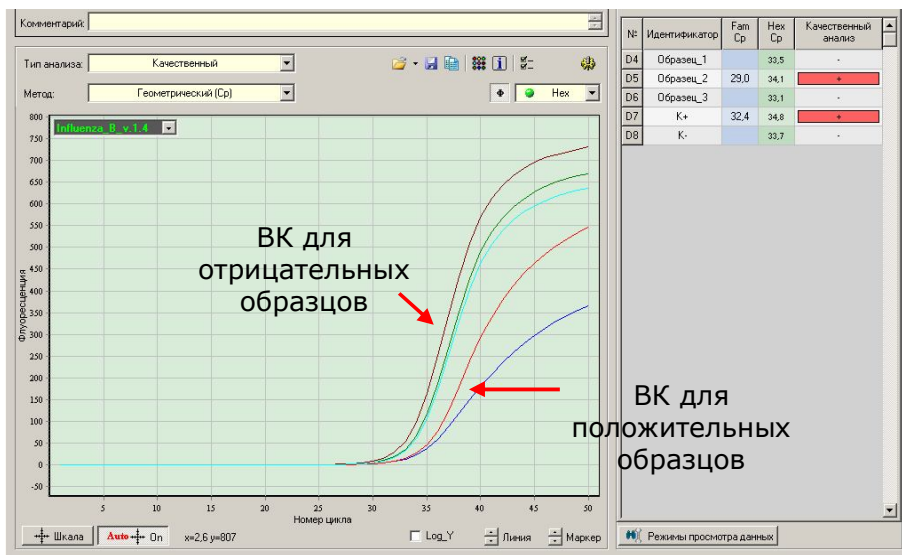
Выбранный флуорофор		Интерпретация результата
Fam	Hex	
Анализируемые образцы		
Ср указан	Ср указан/не указан	+ (результат положительный)
Ср не указан	Ср указан	- (результат отрицательный)
Ср не указан	Ср не указан	нд (результат недостоверный)
Положительный контрольный образец		
Ср указан	Ср указан/не указан	+ (результат положительный)
Отрицательный контрольный образец		
Ср не указан	Ср указан	- (результат отрицательный)

Пример.

Результат по каналу Fam:



Результат по каналу Hex:



Примечание. Допустимый разброс по Ср для внутреннего контроля в отрицательных образцах ≤ 2 циклам. Для положительных образцов результат амплификации VK не учитывается.

9.1. При получении недостоверного результата необходимо повторить исследование 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 либо повторная постановка ПЦР, либо повторное выделение РНК и постановка обратной транскрипции и ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

9.2. При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца («К+») результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.3. При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца («К-») результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРОВ

10.1. Срок годности наборов – 9 месяцев с даты изготовления.

10.2. Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительного контрольного образца, следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности комплекта. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре 2–8 °С. Допускается многократное замораживание-оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла.

10.3. Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительный контрольный образец следует хранить в тёмном месте при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности.

- 10.4.** Транспортирование наборов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав наборов. Наборы с истекшим сроком годности использованию не подлежат.
- 10.5.** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению наборов.
- 10.6.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие наборов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества наборов реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А – Influenza A virus; гриппа В – Influenza B virus; вирусов пандемического гриппа А(Н1N1), подобных штамму А/California/4/2009 («свиной грипп» – Пан Н1N1), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.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/customer_support/

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
Служба клиентской поддержки:
8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru