

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВКЭ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000», методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного участка РНК вируса клещевого энцефалита, совмещенной с реакцией амплификации образующейся кДНК. Регистрация амплификации выбранного фрагмента (заключающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная денатурация, гибридизация прайме-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и с.н.с. Лаборатории ПЦР Тимофеевым Д.И.

ров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка кДНК, получаемого обратной транскрипцией из искусственно сконструированной РНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии подготовки проб.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка РНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов и детекции обеспечивается выделением РНК ВКЭ из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 1):

- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизованная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (6 стрипов по 8 штук) или плёнкой оптической – 2 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий РНК ВКЭ в пробе.

3.2. Специфичность выявления РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («Циклотемп», фирма СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– центрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитроновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);
- емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью набора для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой, избегая преждевременного вскрытия и повреждения краев пробирок с ГРС.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС сразу упаковать в целлофановый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим!

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы!

7.4. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической пленкой.

Внимание! Образцы следует амплифицировать сразу после внесения раствора выделенной РНК в ГРС!

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента кДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Задать протокол проведения обратной транскрипции и амплификации:

1 стадия: 45 °С – 30 мин

2 стадия: 94 °С – 1 мин

3 стадия: (94 °С – 10 сек, 60 °С* – 20 сек) - 50 циклов

*Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКЭ и ВКО:

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКЭ – канал детекции «ROX».

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).

При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX».

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» и определять значение порогового цикла C_t ПКЭ;

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

9.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКЭ и ОКЭ). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКЭ значение C_t в канале «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест РНК ВКЭ» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

Ch

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

С.н.с. Лаборатории ПЦР

ЗАО «Вектор-Бест»

Д.И. Тимофеев

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

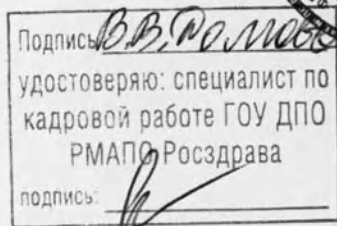
В.К. Ткачев

Зав. кафедры КЛД РМАПО

д.м.н., профессор



В.В. Долгов



Проинформировано
проинформировано
срок годности
4 (четыре) месяца
В.В. Долгов

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВКЭ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000», методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного («Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия)), так и планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного участка РНК вируса клещевого энцефалита, совмещенной с реакцией амплификации образующейся кДНК. Регистрация амплификации выбранного фрагмента (закрывающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная денатурация, гибридизация прайме-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и с.н.с. Лаборатории ПЦР Тимофеевым Д.И.

ров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка кДНК, получаемого обратной транскрипцией из искусственно сконструированной РНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии пробоподготовки.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка РНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов и детекции обеспечивается выделением РНК ВКЭ из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 2):

- Реакционная смесь для ОТ-ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок (на 10 определений каждая);
- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора - выявление 100 копий РНК ВКЭ в пробе.

3.2. Специфичность выявления РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100% .

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия); «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, оборудованный УФ-лампой (например, «Цикло-темп», СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8)°С;

– центрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– миницентрифуга/вортекс типа Комбиспин FVL-2400N (фирма Биосан, Латвия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Фин-

ляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (фирмы NeoTouch, Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром/аэрозольным барьером (фирма FinnTip, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);

– емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО, 1 ПКО) пробирок с лиофилизированной реакционной смесью для ОТ-ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС сразу упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. В пробирку с РС внести 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения допускается хранить РС при температуре от 2 до 8 °С не более 7 дней.

7.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР должна включать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.4. Во все пробирки внести пипеткой, используя наконечник с фильтром, по 25 мкл разведенной реакционной смеси для ОТ-ПЦР.

7.5. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (не захватывая осадок!), используя для каждого образца индивидуальный наконечник. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 25 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. В пробирку, маркированную «ПКО», внести 25 мкл положительного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. Плотнo закрыть крышки пробирок.

Внимание! Образцы следует амплифицировать сразу после внесения раствора выделенной РНК в РС!

7.6. Проведение анализа с помощью амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

Далее по тексту каналы детекции и термины, соответствующие модели амплификатора «Rotor-Gene 6000» указаны в скобках.

7.6.1. Поместить пробирки в амплификатор.

Внимание! Лунка №1 ротора обязательно должна содержать какой-либо исследуемый образец.

7.6.2. Программирование прибора:

- 1) Нажать кнопку «New» в основном меню программы.
- 2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента «Advanced» и выделить «Dual Labeled Probe». Нажать кнопку «New».
- 3) Выбрать ротор на 36 лунок «36-Well Rotor», и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками. Нажать кнопку «Next».
- 4) В открывшемся окне выбрать объем реакционной смеси 50 мкл. Нажать кнопку «Next».

Handwritten signature or mark.

5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку «Edit Profile» и задать следующие параметры:

1. Hold 45°C – 30 мин
2. Hold 94°C – 1 мин
3. Cycling 94°C – 10 сек
 60°C* – 40 сек

Cycle repeats (количество циклов) – 50 times.

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C в каналах FAM и ROX (для прибора Rotor-Gene 6000 – в каналах Green и Orange).

6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку «OK».

7) В окне «New Run Wizard» нажать кнопку «Calibrate» («Gain Optimisation»). В открывшемся окне в строке «Channel Settings» выбрать каналы «ROX» («Orange») и «FAM» («Green»). Установить «Tube Position» 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10. Отметить галочкой «Perform Calibration Before 1st Acquisition». Нажать кнопку «Close».

8) Нажать кнопку «Next», запустить амплификацию кнопкой «Start run».

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием ОТ-РеалБест с расширением *.ret. Тогда при дальнейшей работе программа ОТ-РеалБест будет представлена в списке «New» в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Start run» в файл с расширением *.tex.

7.7. Проведение анализа с помощью амплификатора планшетного типа.

7.7.1. Поместить пробирки в амплификатор.

7.7.2. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента кДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7.3. Задать протокол проведения обратной транскрипции и амплификации:

- 1 стадия: 45 °C – 30 мин
- 2 стадия: 94 °C – 1 мин
- 3 стадия: (94 °C – 10 сек, 60 °C* – 20 сек) - 50 циклов

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.7.4. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКЭ и ВКО:

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКЭ – канал детекции «ROX».

7.7.5. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору. Задать объем реакционной смеси - 50 мкл.

7.7.6. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Анализ результатов ОТ-ПЦР в случае использования амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

8.1.1. Анализ результатов амплификации ВКО:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. FAM» («Cycling A. Green»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 5%.
- 6) В меню «CT Calculation» (в правой части окна) выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.1.2. Анализ результатов амплификации кДНК ВКЭ:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. ROX» («Cycling A. Orange»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 15%.

- 6) В меню «CT Calculation» выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.2. Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) проводится программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов). При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов проводится в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» («Orange»).

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» («Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;
- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определять Ct ВКО.

9.4. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» («Orange») больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКО значение Ct в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест РНК ВКЭ» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52

С.н.с. Лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»

Д.И. Тимофеев

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зав. кафедры КЛД РМАПО
д.м.н., профессор

В.В. Долгов

Подпись *В.В. Долгов*
удостоверяю: специалист
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО, Москва
подпись *К*



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВКЭ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000», методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного участка РНК вируса клещевого энцефалита, совмещенной с реакцией амплификации образующейся кДНК. Регистрация амплификации выбранного фрагмента (закрывающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная денатурация, гибридизация прайме-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и с.н.с. Лаборатории ПЦР Тимофеевым Д.И.

1

ров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка кДНК, получаемого обратной транскрипцией из искусственно сконструированной РНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии подготовки проб.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка РНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов и детекции обеспечивается выделением РНК ВКЭ из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 1):

- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизованная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (6 стрипов по 8 штук) или плёнкой оптической – 2 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий РНК ВКЭ в пробе.

3.2. Специфичность выявления РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («Циклотемп», фирма СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– центрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитроновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);
- емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью набора для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой, избегая преждевременного вскрытия и повреждения краев пробирок с ГРС.

Внимание! *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС сразу упаковать в целлофановый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим!*

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! *Надписи следует располагать на боковой части пробирок.*

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы!

7.4. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической пленкой.

Внимание! Образцы следует амплифицировать сразу после внесения раствора выделенной РНК в ГРС!

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента кДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Задать протокол проведения обратной транскрипции и амплификации:

1 стадия: 45 °С – 30 мин

2 стадия: 94 °С – 1 мин

3 стадия: (94 °С – 10 сек, 60 °С* – 20 сек) - 50 циклов

*Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКЭ и ВКО:

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКЭ – канал детекции «ROX».

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).

При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX».

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

9.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКО значение C_t в канале «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест РНК ВКЭ» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

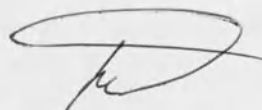
Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

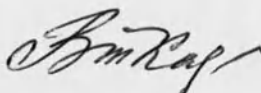
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

С.н.с. Лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»



Д.И. Тимофеев

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского
Клинического Института им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)



В.М. Шумский



Принимается
транспортирование
серийного набора
№ (серия) датировано

И. Бердичевская Е.П. /

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

44 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВКЭ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000», методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного («Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия)), так и планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного участка РНК вируса клещевого энцефалита, совмещенной с реакцией амплификации образующейся кДНК. Регистрация амплификации выбранного фрагмента (закрывающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная денатурация, гибридизация прайме-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и с.н.с. Лаборатории ПЦР Тимофеевым Д.И.

ров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка кДНК, получаемого обратной транскрипцией из искусственно сконструированной РНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии пробоподготовки.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка РНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов и детекции обеспечивается выделением РНК ВКЭ из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 2):

- Реакционная смесь для ОТ-ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок (на 10 определений каждая);
- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора - выявление 100 копий РНК ВКЭ в пробе.

3.2. Специфичность выявления РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100% .

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия); «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, оборудованный УФ-лампой (например, «Цикло-темп», СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8)°С;

– центрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– миницентрифуга/вортекс типа Комбиспин FVL-2400N (фирма Биосан, Латвия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Фин-

ляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (фирмы NeoTouch, Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром/аэрозольным барьером (фирма FinnTip, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);

– емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО, 1 ПКО) пробирок с лиофилизированной реакционной смесью для ОТ-ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС сразу упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. В пробирку с РС внести 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения допускается хранить РС при температуре от 2 до 8 °С не более 7 дней.

7.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР должна включать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.4. Во все пробирки внести пипеткой, используя наконечник с фильтром, по 25 мкл разведенной реакционной смеси для ОТ-ПЦР.

7.5. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (не захватывая осадок!), используя для каждого образца индивидуальный наконечник. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 25 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. В пробирку, маркированную «ПКО», внести 25 мкл положительного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. Плотнo закрыть крышки пробирок.

Внимание! Образцы следует амплифицировать сразу после внесения раствора выделенной РНК в РС!

7.6. Проведение анализа с помощью амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

Далее по тексту каналы детекции и термины, соответствующие модели амплификатора «Rotor-Gene 6000» указаны в скобках.

7.6.1. Поместить пробирки в амплификатор.

Внимание! Лунка №1 ротора обязательно должна содержать какой-либо исследуемый образец.

7.6.2. Программирование прибора:

- 1) Нажать кнопку «New» в основном меню программы.
- 2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента «Advanced» и выделить «Dual Labeled Probe». Нажать кнопку «New».
- 3) Выбрать ротор на 36 лунок «36-Well Rotor», и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками. Нажать кнопку «Next».
- 4) В открывшемся окне выбрать объем реакционной смеси 50 мкл. Нажать кнопку «Next».

5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку «Edit Profile» и задать следующие параметры:

1. Hold 45°C – 30 мин
2. Hold 94°C – 1 мин
3. Cycling 94°C – 10 сек
 60°C* – 40 сек

Cycle repeats (количество циклов) – 50 times.

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C в каналах FAM и ROX (для прибора Rotor-Gene 6000 – в каналах Green и Orange).

6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку «OK».

7) В окне «New Run Wizard» нажать кнопку «Calibrate» («Gain Optimisation»). В открывшемся окне в строке «Channel Settings» выбрать каналы «ROX» («Orange») и «FAM» («Green»). Установить «Tube Position» 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10. Отметить галочкой «Perform Calibration Before 1st Acquisition». Нажать кнопку «Close».

8) Нажать кнопку «Next», запустить амплификацию кнопкой «Start run».

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием ОТ-РеалБест с расширением *.ret. Тогда при дальнейшей работе программа ОТ-РеалБест будет представлена в списке «New» в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Start run» в файл с расширением *.rex.

7.7. Проведение анализа с помощью амплификатора планшетного типа.

7.7.1. Поместить пробирки в амплификатор.

7.7.2. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента кДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7.3. Задать протокол проведения обратной транскрипции и амплификации:

- 1 стадия: 45 °C – 30 мин
- 2 стадия: 94 °C – 1 мин
- 3 стадия: (94 °C – 10 сек, 60 °C* – 20 сек) - 50 циклов

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.7.4. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКЭ и ВКО:

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКЭ – канал детекции «ROX».

7.7.5. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору. Задать объем реакционной смеси - 50 мкл.

7.7.6. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Анализ результатов ОТ-ПЦР в случае использования амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

8.1.1. Анализ результатов амплификации ВКО:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. FAM» («Cycling A. Green»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 5%.
- 6) В меню «CT Calculation» (в правой части окна) выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.1.2. Анализ результатов амплификации кДНК ВКЭ:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. ROX» («Cycling A. Orange»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 15%.

- 6) В меню «CT Calculation» выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.2. Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) проводится программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов). При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов проводится в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» («Orange»).

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» («Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;
- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определять Ct ВКО.

9.4. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» («Orange») больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение Ct в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКО значение Ct в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест РНК ВКЭ» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

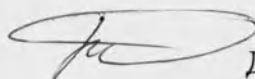
Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52

С.н.с. Лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»



Д.И. Тимофеев

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского
Клинического Института им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)

В.И. Шумский

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВКЭ»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000», методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного участка РНК вируса клещевого энцефалита, совмещенной с реакцией амплификации образующейся кДНК. Регистрация амплификации выбранного фрагмента (закрывающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная денатурация, гибридизация прайме-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и с.н.с. Лаборатории ПЦР Тимофеевым Д.И.

ров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка кДНК, получаемого обратной транскрипцией из искусственно сконструированной РНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии подготовки проб.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка РНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов и детекции обеспечивается выделением РНК ВКЭ из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 1):

- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Готовая реакционная смесь для ОТ-ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (6 стрипов по 8 штук) или плёнкой оптической – 2 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий РНК ВКЭ в пробе.

3.2. Специфичность выявления РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («Циклотемп», фирма СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– центрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитриловые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);
- емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью набора для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью для ОТ-ПЦР. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой, избегая преждевременного вскрытия и повреждения краев пробирок с ГРС.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС сразу упаковать в целлофановый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим!

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать частицы!

7.4. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической пленкой.

Внимание! Образцы следует амплифицировать сразу после внесения раствора выделенной РНК в ГРС!

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента кДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Задать протокол проведения обратной транскрипции и амплификации:

1 стадия: 45 °С – 30 мин

2 стадия: 94 °С – 1 мин

3 стадия: (94 °С – 10 сек, 60 °С* – 20 сек) - 50 циклов

*Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКЭ и ВКО:

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКЭ – канал детекции «ROX».

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.10. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).

При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX».

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» и определять значение порогового цикла C_t ПКЭ;

- нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

9.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКЭ и ОКЭ). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКЭ значение C_t в канале «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест РНК ВКЭ» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

С.н.с. Лаборатории ПЦР

ЗАО «Вектор-Бест»

Д.И. Тимофеев

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Директор ГУЗ НИИ СП
им. Н.В. Склифосовского



М.Ш. Хубутия



Прошнуровано
прошнуровано
серийно по
(силь) листов

А. /Дергачев Е. А./

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

М 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

«РеалБест РНК ВКЭ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» предназначен для выявления РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ; tick-borne encephalitis virus), выделенной из биологических проб с помощью наборов «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000», методом, основанным на обратной транскрипции вирусной РНК с последующей амплификацией кДНК в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного («Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия)), так и планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест РНК ВКЭ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на проведении реакции обратной транскрипции выбранного участка РНК вируса клещевого энцефалита, совмещенной с реакцией амплификации образующейся кДНК. Регистрация амплификации выбранного фрагмента (закрывающейся в многократно повторяющихся циклах: температурная денатурация, гибридизация прайме-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и с.н.с. Лаборатории ПЦР Тимофеевым Д.И.

ров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq ДНК-полимеразой) происходит в режиме реального времени. Параллельно аналогичным образом регистрируется амплификация участка кДНК, получаемого обратной транскрипцией из искусственно сконструированной РНК неконкурентного внутреннего контрольного образца (ВКО), вносимого в анализируемую пробу на стадии пробоподготовки.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка РНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий ее интенсивность. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством вирусной РНК в образце.

Учет эффективности выделения РНК из образцов и детекции обеспечивается выделением РНК ВКЭ из биологических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора (комплект 2):

- Реакционная смесь для ОТ-ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок (на 10 определений каждая);
- Положительный контрольный образец (ПКО) – 1 флакон (1,0 мл);
- Раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность набора - выявление 100 копий РНК ВКЭ в пробе.

3.2. Специфичность выявления РНК ВКЭ (по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток) – 100% .

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия); «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, оборудованный УФ-лампой (например, «Цикло-темп», СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8)°С;

– центрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– миницентрифуга/вортекс типа Комбиспин FVL-2400N (фирма Биосан, Латвия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Фин-

ляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (фирмы NeoTouch, Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром/аэрозольным барьером (фирма FinnTip, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл и 0,25 мл (фирма Хеликон, Россия);

– емкость для сброса наконечников.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используются образцы: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, суспензии клещей.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов для выделения НК «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения РНК, должна содержать ПКО и ОКО (компонент набора для выделения НК).

Выделенная РНК хранению не подлежит! Процедуру выделения РНК из клинического материала следует проводить непосредственно перед постановкой ОТ-ПЦР.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО, 1 ПКО) пробирок с лиофилизированной реакционной смесью для ОТ-ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС сразу упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. В пробирку с РС внести 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения допускается хранить РС при температуре от 2 до 8 °С не более 7 дней.

7.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ОТ-ПЦР должна включать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.4. Во все пробирки внести пипеткой, используя наконечник с фильтром, по 25 мкл разведенной реакционной смеси для ОТ-ПЦР.

7.5. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной РНК (не захватывая осадок!), используя для каждого образца индивидуальный наконечник. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 25 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. В пробирку, маркированную «ПКО», внести 25 мкл положительного контрольного образца, прошедшего подготовку проб. Плотнo закрыть крышки пробирок.

Внимание! Образцы следует амплифицировать сразу после внесения раствора выделенной РНК в РС!

7.6. Проведение анализа с помощью амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

Далее по тексту каналы детекции и термины, соответствующие модели амплификатора «Rotor-Gene 6000» указаны в скобках.

7.6.1. Поместить пробирки в амплификатор.

Внимание! Лунка №1 ротора обязательно должна содержать какой-либо исследуемый образец.

7.6.2. Программирование прибора:

- 1) Нажать кнопку «New» в основном меню программы.
- 2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента «Advanced» и выделить «Dual Labeled Probe». Нажать кнопку «New».
- 3) Выбрать ротор на 36 лунок «36-Well Rotor», и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками. Нажать кнопку «Next».
- 4) В открывшемся окне выбрать объем реакционной смеси 50 мкл. Нажать кнопку «Next».

5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку «Edit Profile» и задать следующие параметры:

1. Hold 45°C – 30 мин

2. Hold 94°C – 1 мин

3. Cycling 94°C – 10 сек

60°C* – 40 сек

Cycle repeats (количество циклов) – 50 times.

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C в каналах FAM и ROX (для прибора Rotor-Gene 6000 – в каналах Green и Orange).

6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку «OK».

7) В окне «New Run Wizard» нажать кнопку «Calibrate» («Gain Optimisation»). В открывшемся окне в строке «Channel Settings» выбрать каналы «ROX» («Orange») и «FAM» («Green»). Установить «Tube Position» 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10. Отметить галочкой «Perform Calibration Before 1st Acquisition». Нажать кнопку «Close».

8) Нажать кнопку «Next», запустить амплификацию кнопкой «Start run».

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием ОТ-РеалБест с расширением *.ret. Тогда при дальнейшей работе программа ОТ-РеалБест будет представлена в списке «New» в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Start run» в файл с расширением *.tex.

7.7. Проведение анализа с помощью амплификатора планшетного типа.

7.7.1. Поместить пробирки в амплификатор.

7.7.2. Запрограммировать прибор для проведения обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента кДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7.3. Задать протокол проведения обратной транскрипции и амплификации:

1 стадия: 45 °C – 30 мин

2 стадия: 94 °C – 1 мин

3 стадия: (94 °C – 10 сек, 60 °C* – 20 сек) - 50 циклов

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.7.4. Выбрать каналы детекции результатов амплификации кДНК ВКЭ и ВКО:

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации кДНК ВКЭ – канал детекции «ROX».

7.7.5. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору. Задать объем реакционной смеси - 50 мкл.

7.7.6. Запустить программу и провести ОТ-ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Анализ результатов ОТ-ПЦР в случае использования амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000»).

8.1.1. Анализ результатов амплификации ВКО:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. FAM» («Cycling A. Green»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 5%.
- 6) В меню «CT Calculation» (в правой части окна) выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.1.2. Анализ результатов амплификации кДНК ВКЭ:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. ROX» («Cycling A. Orange»), «Show».
- 2) Отменить автоматический выбор Threshold, нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу Linear scale.
- 4) В меню основного окна (Quantitation analysis) должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» и «Slope Correct».
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») установить значение NTC threshold 15%.

6) В меню «CT Calculation» выставить Threshold = 0,04.

7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») появятся значения Ct.

8.2. Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) проводится программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов). При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов проводится в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» («Orange»).

9.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации кДНК ВКЭ в канале «ROX» («Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

– нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО в канале «FAM» («Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации кДНК ВКО и определять Ct ВКО.

9.4. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX» («Orange») больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения РНК (в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).

9.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение Ct в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40.

9.7. Если для ОКО значение Ct в канале «ROX» («Orange») меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест РНК ВКЭ» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52

С.н.с. Лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»

Д.И. Тимофеев

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Директор ГУЗ НИИ СП
им. Н.В. Склифосовского

М.Ш. Хубутия

