



Набор реагентов для выявления НК возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ОРЗ ВирусКомплекс

Каталожный номер: R3-P429-S3/5

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов ОРЗ ВирусКомплекс предназначен для выявления НК возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека в биологическом материале человека *in vitro*.

Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Материал для исследования:

Мазки и смывы из полости носа и ротоглотки.

Выделение НК:

Рекомендуется комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Особенности набора:

Одновременная детекция (мультиплексный анализ) – в одной пробирке определяются несколько ДНК-мишеней.

Внутренний контрольный образец (ВК) – присутствует в каждой пробирке с амплификационной смесью, необходим для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.5.5.23³.

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

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

2,5 часа.

Количество определений:

24

Состав набора:

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для проведения обратной транскрипции		
• Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ	50 мкл	1 пробирка
• ОТ-буфер	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени		
• Смесью для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	24 стрипа по 8 пробирок
• Taq-полимераза	50 мкл	2 пробирки
• ПЦР-буфер	500 мкл	4 пробирки
• Минеральное масло	1,0 мл	4 пробирки
• Положительный контрольный образец	160 мкл	1 пробирка
• Крышки для стрипов		24 шт.

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

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

³ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

Состав стрипов, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки	Канал детекции			Цветовая маркировка буфера
	Fam	Hex	Rox	
1	Human respiratory syncytial virus	BK	-	Голубой
2	Human coronavirus OC43	BK	Human parainfluenza virus type 3	Бесцветный
3	Human parainfluenza virus type 2	BK	Human coronavirus 229E	
4	Human parainfluenza virus type 1	BK	Human coronavirus NL63	
5	Human parainfluenza virus type 4	BK	Human coronavirus HKU 1	
6	Human rhinovirus	BK	-	
7	Human adenovirus	BK	-	
8	Human metapneumovirus	BK	-	

Проведение анализа

1 Выделение НК

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

1.2 Проведите пробоподготовку согласно инструкции к комплекту для выделения НК (ПРОБА-НК).

При использовании комплекта реагентов ПРОБА-НК осадок после сушки следует растворять в 35 мкл буфера для растворения. ДНК-ВК и РНК-ВК не используются.

Примечание - Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции. Препарат РНК не подлежит хранению.

2 Подготовка и проведение обратной транскрипции

2.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца (К-) по одной пробирке объемом 0,5 мл.

2.2 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для проведения обратной транскрипции при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), затем встряхните пробирки в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.

2.3 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 4,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера;
- 2,0 x (N+1) мкл «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»;
- 1,0 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

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

Например, необходимо проанализировать пять образцов. Промаркированных пробирок — шесть. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 7 (6+1) пробирок, т.е. нужно смешать 28 мкл ОТ-буфера + 14 мкл праймеров + 7 мкл обратной транскриптазы.

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

2.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.

2.5 Добавьте в промаркированные пробирки по 7,0 мкл ОТ-смеси.

2.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 33 мкл соответствующего образца НК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку «К-» НК не внесится.

2.7 В пробирку, маркированную «К-», внесите 33 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК.

Примечание - Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы НК наконечниками с фильтром.

2.8 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 сек при комнатной температуре.

2.9 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.

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

2.10 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с.

2.11 Добавьте к полученному препарату ДНК 15 мкл буфера для растворения из состава комплекта ПРОБА-НК. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Полученный препарат ДНК готов для проведения ПЦР.

3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

3.1 Промаркируйте по одному стрипу со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, для положительного контрольного образца (K+) и для отрицательного контрольного образца (K-).

Примечание – Один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Например, необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать два стрипа для исследуемых образцов, один для «K-» и один для «K+». Общее количество стрипов – четыре (таблица 1).

Таблица 1 - Маркировка пробирок для проведения ПЦР

Образец 1	Стрип 1
Образец 2	Стрип 2
«K-»	Стрип 3
«K+»	Стрип 4

3.2 Разморозьте содержимое пробирки с ПЦР-буфером при комнатной температуре. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Taq-полимеразу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

3.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,5 × (N+1) мкл Taq-полимеразы,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «K-» и «K+».

3.4 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин (или на микроцентрифуге-вортексе) в течение 3–5 с при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение двух часов после приготовления.

3.5 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.

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

3.7 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК в соответствующие стрипованные пробирки для исследуемых образцов. В стрипы «K-», «K+» ДНК не вносится.

3.8 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и реакцию обратной транскрипции, в стрипованные пробирки, маркированные «K-». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованные пробирки, маркированные «K+».

3.9 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3.10 Установите все стрипы в блок детектирующего амплификатора.

3.11 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «ORZ_VirusComplex.ini». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «ОРЗ_ВирусКомплекс», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (3.10) и проведите ПЦР.

4 **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 2.

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме стрипов с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительного контрольного образца, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.

Примечание – Допускается многократное замораживание/оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла.

Стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительный контрольный образец следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 6 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления НК возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОРЗ ВирусКомплекс), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125Ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:
http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Т а б л и ц а 2 - Интерпретация результатов ПЦР

Выбранный флуорофор			Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox		
Анализируемые образцы				
Ср указан (для одной или нескольких пробирок)	Не учитывается	Ср указан (для одной или нескольких пробирок №2-5)	+	Обнаружена НК одного или нескольких возбудителей
Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	Ср указан (для тех же пробирок, что и по каналу Fam\Rox)	Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	-	НК определяемых возбудителей не обнаружена
Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	Ср не указан (для тех же пробирок, что и по каналу Fam\Rox)	Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	нд	Результат недостоверный ⁴
Положительный контрольный образец				
Ср указан (для всех пробирок)	Ср указан (для всех пробирок)	Ср указан (для пробирок №2-5)	+	Результат положительный
Отрицательный контрольный образец				
Ср не указан (для всех пробирок)	Ср указан (для всех пробирок)	Ср не указан (для всех пробирок)	-	Результат отрицательный

Номер: 374-3
30.11.17

⁴ - требуется перестановка ПЦР или повторное выделение НК для данного образца, выполняется последовательно.