



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления нуклеиновых кислот (НК) вируса иммунодефицита
человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции
и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

ВИЧ-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03504 от 26 апреля 2010 года

Каталожные номера:

R3-P609-23/9 (пробирки 0,2 мл, формат «Real-time»)

R3-P609-S3/9 (стрипы 0,2 мл, формат «Real-time»)

F3-P609-51/1(пробирки 0,5 мл, формат «FLASH»)

F3-P609-21/1(пробирки 0,2 мл, формат «FLASH»)

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
2.1. Принцип действия.....	4
2.2. Количество тестов.....	5
2.3. Состав набора.....	5
2.4. Время проведения анализа.....	7
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	10
6.1. Взятие образцов периферической крови.....	10
6.2. Транспортировка и хранение исследуемого материала.....	10
6.3. Получение плазмы.....	10
7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	11
7.1. Выделение РНК из плазмы крови.....	11
7.2. Проведение реакции обратной транскрипции.....	14
7.3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции.....	15
8. СОЗДАНИЕ ТЕСТА ДЛЯ АМПЛИФИКАТОРОВ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ ПРИ ПЕРВОЙ ПОСТАНОВКЕ НА ДАННОМ КОМПЬЮТЕРЕ	19
8.1. Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96.....	19
8.2. Для прибора iQ.....	21
8.3. Для прибора iQ5.....	22
9. ЕЖЕДНЕВНАЯ РАБОТА С ТЕСТОМ	23
9.1. Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96.....	23
9.2. Для прибора iQ.....	27
9.3. Для прибора iQ5.....	30
10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	34
10.1. Регистрация результатов амплификации с использованием детектора флуоресценции «Джин» или «Джин-4».....	34
10.2. Регистрация результатов амплификации (формат «Real-time»).....	34
11. УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ	40
12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	41
13. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	42
14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	42
ПРИЛОЖЕНИЕ А	44
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	45

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления нуклеиновых кислот (НК)
вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)
методом обратной транскрипции
и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

ВИЧ–ГЕН

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1.** Набор реагентов ВИЧ–ГЕН для выявления нуклеиновых кислот (НК) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) предназначен для определения РНК ВИЧ 1-го типа в образцах плазмы крови методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.2.** Набор реагентов ВИЧ–ГЕН может быть использован в клинической практике для диагностики ВИЧ 1-го типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

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

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

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флу-

оресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

Исследование с использованием набора реагентов ВИЧ-ГЕН состоит из следующих этапов: выделение РНК (пробоподготовка), реакция обратной транскрипции, ПЦР-амплификация кДНК ВИЧ-1 в режиме реального времени.

На стадии выделения РНК в реакционную смесь добавляют внутренний контрольный образец (РНК-ВК), предназначенный для оценки эффективности всех этапов исследования.

В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации искомой кДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца (РНК-ВК), входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Т а б л и ц а 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
ВИЧ	РНК-ВК	-	-	-

2.2. Набор рассчитан на проведение 96/100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3. Состав набора

Набор состоит из трёх комплектов:

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

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);
- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);

¹ - включается в набор по запросу.

- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

2. Комплект реагентов для обратной транскрипции включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймеров для обратной транскрипции «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (50 мкл).

3. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

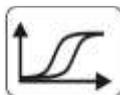
- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок² (по 20 мкл) для формата «FLASH» и 96 пробирок (по 20 мкл) или 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл) для формата «Real-time»;
- полимеразу ТехноТақ – 1 пробирка (50 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец – 1 пробирка (150 мкл).

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

² - комплекты реагентов для ПЦР-амплификации в зависимости от наименования выпускаются в пробирках 0,5 и 0,2 мл.



Формат «FLASH» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора (флуоресцентная детекция по конечной точке).



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

2.4. Время проведения анализа – 4 часа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК ВИЧ, ПЦР-детектор (формат «FLASH») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должен регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала человека, не содержащих РНК ВИЧ, ПЦР-детектор (формат «FLASH») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должен регистрировать отрицательный результат.

3.2. Чувствительность анализа: 200 копий на 1,0 мл плазмы.

При проведении предварительного ультрацентрифугирования плазмы крови чувствительность анализа составляет 30–50 копий на 1,0 мл плазмы.

3.3. Диагностическая чувствительность: 99,5%.

3.4. Диагностическая специфичность: 100%.

3.5. Выявление субтипов ВИЧ-1: набор реагентов ВИЧ-ГЕН выявляет все субтипы группы M.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

патогенности» и санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3 3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

- бокс биологической (микробиологической) безопасности II класса;
- ПЦР-бокс;
- обычный амплификатор (термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырёхканальный Терцик, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1 производства ООО «НПО ДНК-Технология» или аналогичный) для наборов в формате «FLASH»
или детектирующий амплификатор (ДТ-322, ДТлайт³, ДТпрайм⁴ и ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-Технология» или амплификаторы iCycler iQ и iQ5 производства Bio-Rad Laboratories) для наборов в формате «Real-time»;
- детектор флуоресцентный Джин или Джин-4 (для наборов в формате «FLASH»);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 x 000 g;

³ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

⁴ – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

- центрифуга для микропробирок, с RCF не ниже 24 000 g;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 40 °С до 95 °С;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- дозаторы электронные с адаптером или дозаторы механические переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для аспиратора с колбой-ловушкой;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.

Программное обеспечение для детекторов флуоресцентных:

- детектор флуоресцентный «Джин» – версия программного обеспечения не ниже 3.3, рекомендуемая версия 4.4.0.10;
- детектор флуоресцентный «Джин 4» – версия программного обеспечения не ниже 4.4.0.8, рекомендуемая версия 4.4.0.10.

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

- версия ПО не ниже 7.3⁵.
- файл с параметрами анализа «HIV.ini».

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

6.1. Взятие образцов периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2. Транспортировка и хранение исследуемого материала

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

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при температуре от 2 °С до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Цельную кровь нельзя замораживать.

6.3. Получение плазмы крови

6.3.1. Пробирки с кровью центрифугируйте при 800-1600 x g (соответствует 3000-4100 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

⁵ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <https://dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

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

- 6.3.2. После центрифугирования отберите дозатором верхнюю фракцию (плазма) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Допускается хранение полученной плазмы:

- при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более трёх месяцев;
- при температуре не выше минус 70 °С не более одного года.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение РНК из плазмы крови

Примечания

1. Перед началом работы необходимо достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка лизирующий раствор прогреть при 65 °С до полного растворения осадка. Затем перемешать лизирующий раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования.
2. На данном этапе используйте только наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.
3. При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими (HCV и HIV) и ДНК-содержащими (HBV) вирусами, необходимо на стадии пробоподготовки внести два внутренних контроля (РНК-ВК+ДНК-ВК).
4. Для повышения чувствительности анализа необходимо провести предварительное ультрацентрифугирование плазмы крови. Для этого 1,0 мл плазмы крови пациента центрифугируют в течение одного часа при температуре от 2 °С до 8 °С при 16 500 об/мин (24 000 g или более). Затем супернатант удаляют и работают с осадком как описано ниже.

ВНИМАНИЕ! В случае использования для повышения чувствительности анализа предварительного ультрацентрифугирования плазмы крови, то далее анализ из полученного препарата НК выполняется только для выявления РНК ВИЧ!

7.1.1. Подготовьте образцы:

- образцы плазмы, хранившиеся при температуре минус 18 °С и ниже, разморозьте при комнатной температуре или при температуре от 2 °С до 8 °С, перемешайте на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте 5 мин при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424). Для исследования необходимо использовать надосадочную жидкость, не затрагивая осадка (при его наличии).
- образцы плазмы, хранившиеся при температуре от 2 °С до 8 °С, а также отрицательный контрольный образец и РНК-ВК перемешайте и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.2. Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учётом пробирки для отрицательного контрольного образца «К–».

Например, для исследования 28 образцов необходимо промаркировать 29 пробирок (28 пробирок для исследуемых образцов и одна пробирка «К–»).

7.1.3. Внесите во все промаркированные пробирки по 10 мкл предварительно перемешанного внутреннего контрольного образца (РНК-ВК).

7.1.4. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.

Примечание - Для предотвращения контаминации следует перед внесением образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего.

7.1.5. Внесите по 100 мкл предварительно перемешанной плазмы в пробирки для исследуемых образцов. В пробирку, промаркированную «К–», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Пробирки с исследуемыми образцами и отрицательным контрольным образцом необходимо обрабатывать по единой схеме.

7.1.6. Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 с дважды и осадите капли на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с при комнатной температуре.

- 7.1.7. Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 30 с при комнатной температуре.
- 7.1.8. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхните на вортексе в течение 3–5 с дважды.
- 7.1.9. Центрифугируйте пробирки при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 7.1.10. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.11. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки. Необходимо переворачивать каждую пробирку индивидуально.
- 7.1.12. Центрифугируйте пробирки при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.13. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.14. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и 3–5 раз аккуратно переверните пробирки. Необходимо переворачивать каждую пробирку индивидуально.
- 7.1.15. Центрифугируйте пробирки при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 7.1.16. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.1.17. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 5 мин.
- 7.1.18. Добавьте к осадку 16,5 мкл буфера для растворения, закройте крышки пробирок. Осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.1.19. Прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин.

7.1.20. Осадите капли центрифугированием пробирок при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат РНК необходимо в течение 30 мин использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

ВНИМАНИЕ! В случае использования для повышения чувствительности анализа предварительного ультрацентрифугирования плазмы крови, то далее анализ из полученного препарата НК выполняется только для выявления РНК ВИЧ!

ВНИМАНИЕ! Увеличение объёма буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.

Чувствительность анализа, равная 200 копий/мл, для комплекта ВИЧ-ГЕН определена при растворении осадка в 16,5 мкл буфера для растворения.

7.2. Проведение реакции обратной транскрипции

7.2.1. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре, затем встряхните пробирки и центрифугируйте в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание - В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

7.2.2. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 2,0x(N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»;
- 1,0x(N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ»;
- 0,5x(N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-».

Например, необходимо проанализировать 28 образцов. Промаркированных пробирок – 29. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 30 (29+1)

пробирок, т.е. 60 мкл ОТ-буфера + 30 мкл праймеров + 15 мкл обратной транскриптазы.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.3. Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с при комнатной температуре.
- 7.2.4. Добавьте по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки (включая «К–») и перемешайте пипетированием 5–7 раз.
- 7.2.5. Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.
- 7.2.6. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на Eppendorf Centrifuge 5424) в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание - Допускается хранение кДНК при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

7.3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 7.3.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для исследуемых образцов плазмы крови, положительного контрольного образца ДНК «К+» и отрицательного контрольного образца «К–».

Например, необходимо проанализировать 28 образцов. Нужно промаркировать 28 пробирок для исследуемых образцов, одну пробирку для «К–» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 30.

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

Например, необходимо проанализировать 28 образцов. Нужно промаркировать 28 пробирок для исследуемых образцов,

одну пробирку для «К+», одну пробирку для «К-» и две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 32.

7.3.2. Разморозьте при комнатной температуре ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации.

7.3.3. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq в течение 3–5 с и осадите капли на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с при комнатной температуре.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.4. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq. Смешайте в отдельной пробирке:

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

где N – количество промаркированных пробирок с учетом «К-» и «К+».

Например, необходимо проанализировать 28 образцов. Промаркированных пробирок – 30. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq для 31 (30+1) пробирки, т.е. 310 мкл ПЦР-буфера + 15,5 мкл полимеразы ТехноТaq.

7.3.5. Перемешайте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq в течение 3–5 с и осадите капли на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Смесь можно хранить при комнатной температуре не более одного часа.

7.3.6. Добавьте во все промаркированные пробирки (за исключением пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq. В пробирки, маркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.

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

7.3.8. Встряхните пробирки с препаратом кДНК и осадите капли на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.9. Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которую бу-

дет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить накопниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.

7.3.10. Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и реакцию обратной транскрипции, в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца ДНК, в пробирку, промаркированную «К+».

7.3.11. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с при комнатной температуре.

7.3.12. Установите все пробирки в амплификатор или термостат программируемый.

7.3.12.1. Формат «FLASH»:

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

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

Таблица 2 - Режим амплификации для амплификаторов с активным регулированием (Формат «FLASH»)

Алгоритм регулирования – «быстрый»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °С	Время		
		мин	с	
1	94,0	5	0	1
2	94,0 58,0 64,0	0 0 0	10 25 15	50
3	10,0	хранение

Примечание - При работе с наборами в формате «FLASH» готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца в защищённом от света месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру, поэтому за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.3.13. Формат «Real-time»

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

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HIV.ini» (8.1). При последующих постановках добавьте в протокол тест «HIV» (9.1), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (9.1.6) и проведите ПЦР.

При выборе теста «HIV» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 3.

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

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	94,0	5	00	1		Цикл
2	94,0	0	10	50	√	Цикл
	58,0	0	25			
	64,0	0	15			
3	10,0	Хранение		Хранение

7.3.14. Для приборов iQ и iQ5:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 минут. Запустите программное обеспечение iCycler (или Bio-Rad iQ5). При первой постановке создайте и сохраните новый протокол (8.2, 8.3). При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию плашки (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в плашке) (9.2, 9.3) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

8. СОЗДАНИЕ ТЕСТА (ПРОТОКОЛА) ДЛЯ АМПЛИФИКАТОРОВ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ ПРИ ПЕРВОЙ ПОСТАНОВКЕ НА ДАННОМ КОМПЬЮТЕРЕ

8.1. Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

Версия ПО не ниже 7.3⁶.

Примечание - Для иллюстраций в настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.9.5.15.

Тест «HIV» (файл HIV.ini) для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем набора.

Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

8.1.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с набором ВИЧ-ГЕН, выберите режим «Работа с прибором».

⁶ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <https://dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

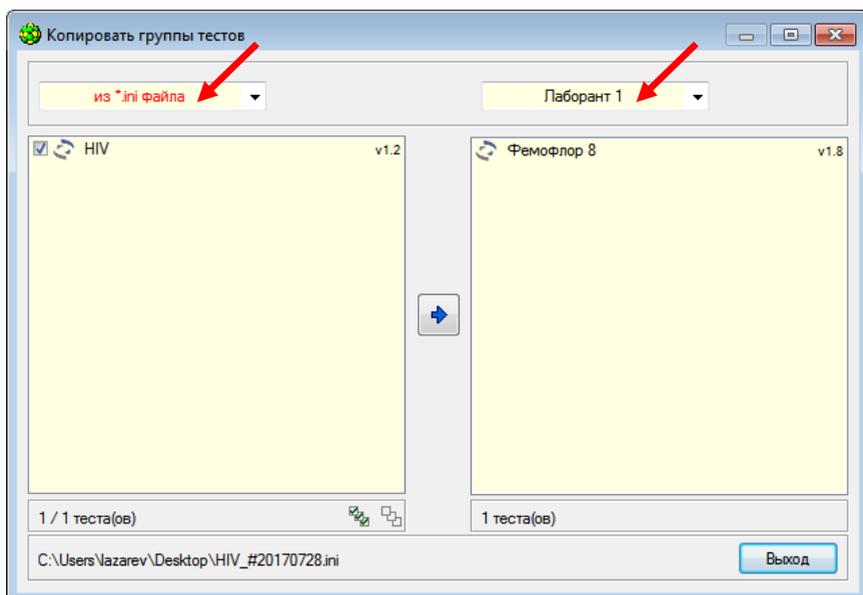
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.

- 8.1.2. В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».

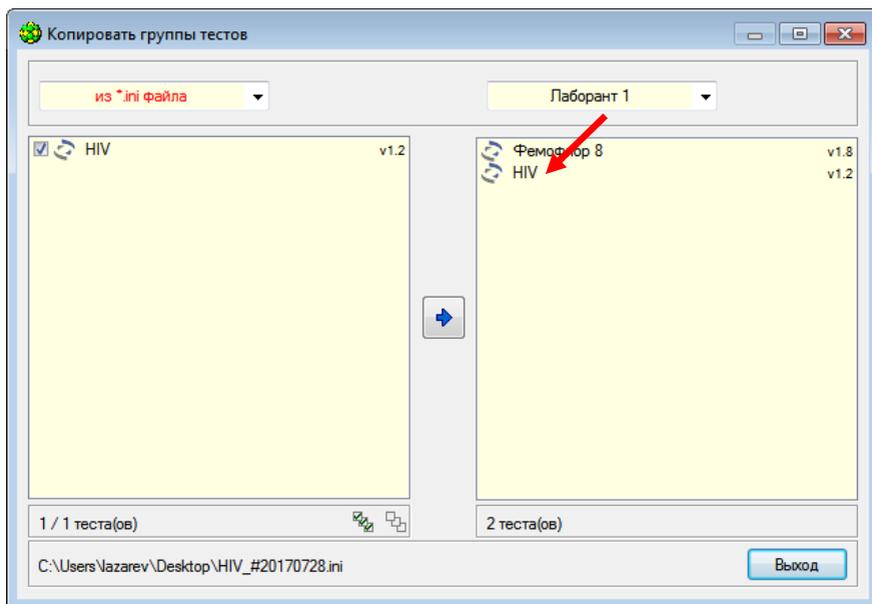


- 8.1.3. В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HIV.ini».

- 8.1.4. В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «HIV».



- 8.1.5. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.



8.1.6. Теперь с тестом «HIV» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

8.2. Для прибора iQ:

8.2.1. Откройте программное обеспечение iCycler. Выберите «Library» в левой части окна программы.

8.2.2. Отредактируйте и сохраните файл dynamicwf.tmo (Таблица 4).

8.2.3. Выберите «Производственный модуль» («Workshop») в левой части окна программы. Создайте и сохраните протокол (файл с программой амплификации) (таблица 4). Созданный файл будет сохранен в модуле «Library».

Примечание - Более подробное описание оформления протокола содержится в инструкции к прибору («Руководство пользователя» для iCycler iQ).

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

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo					
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	05:00	94,0	
2	10				
		1	00:20	94,0	
		2	00:20	58,0	
		3	00:10	64,0	
3	2				
		1	00:20	85,0	Real Time
Программа амплификации					
4	40				
		1	00:10	94,0	
		2	00:10	58,0	
		3	00:30	58,0	Real Time
		4	00:20	64,0	
5		10,0	storage

8.3. Для прибора iQ5:

- 8.3.1. Откройте программное обеспечение Bio-Rad iQ5. Выберите «Производственный модуль» («Workshop») в левой части окна программы (при запуске программы открывается автоматически).
- 8.3.2. Нажмите кнопку «Protocol» для активации окна «Selected protocol» («Выбранный протокол»).
- 8.3.3. В окне «Selected protocol» нажмите кнопку «Create new» для создания нового протокола (файла с программой амплификации). Откроется окно «Editing Protocol» («Редактирование протокола»).
- 8.3.4. В поле «Editing protocol» введите название протокола.
- 8.3.5. Убедитесь, что все кнопки в области «Show Options» («Показать параметры») неактивны (то есть выключены).
- 8.3.6. Создайте протокол в электронной таблице, расположенной в нижней части окна «Editing Protocol» (таблица 5).

Таблица 5 - Программа амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ5 (при использовании Persistent Well Factor)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
1	1				
		1	05:00	94,0	
2	50				
		1	00:10	94,0	
		2	00:25	58,0	Real Time
		3	00:15	64,0	
3	1				
		1	01:00	10,0	

- 8.3.7. Сохраните протокол, для этого нажмите на кнопку «Save & Exit Protocol Editing» («Сохранить и покинуть редактирование протокола»). Проверьте название протокола в диалоговом окне «Save As» («Сохранить как»), затем нажмите кнопку «Save» («Сохранить»).

Примечание - Вы можете выйти из Редактора протокола, нажав кнопку «Save & Exit Protocol Editing» или «Cancel & Exit Protocol Editing» («Отменить и выйти из редактирования протокола»).

Более подробное описание оформления протокола содержится в инструкции к прибору («Руководство пользователя» для iCycler iQ5).

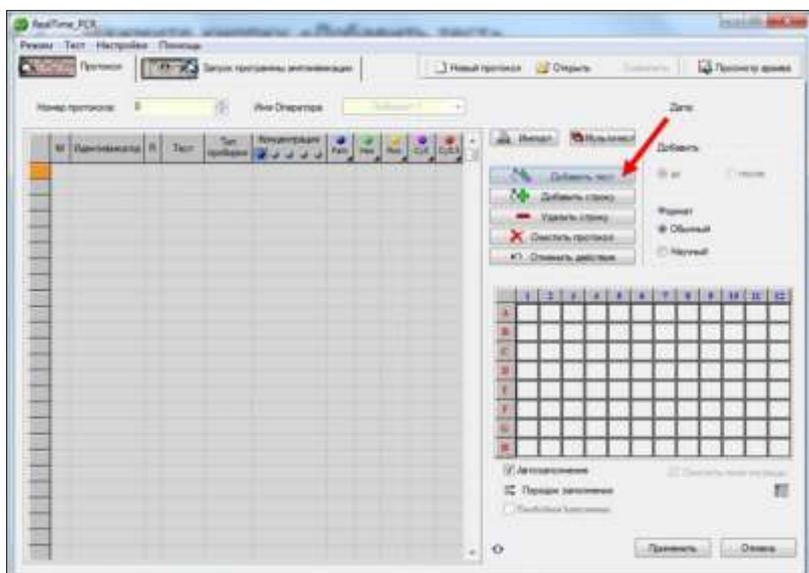
ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

9. ЕЖЕДНЕВНАЯ РАБОТА С ТЕСТОМ (ПРОТОКОЛОМ)

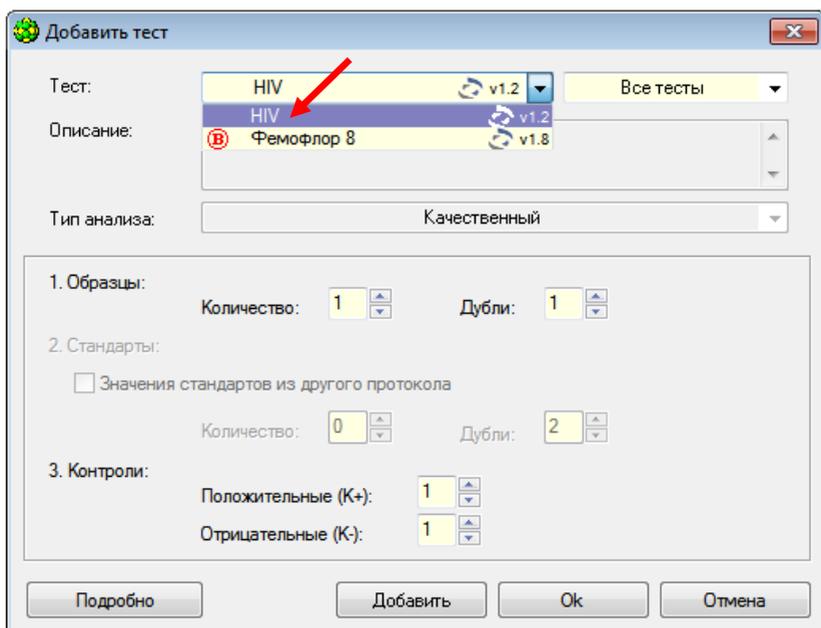
- 9.1. Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

9.1.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого сохранили тест (8.1.1), выберите режим «Работа с прибором».

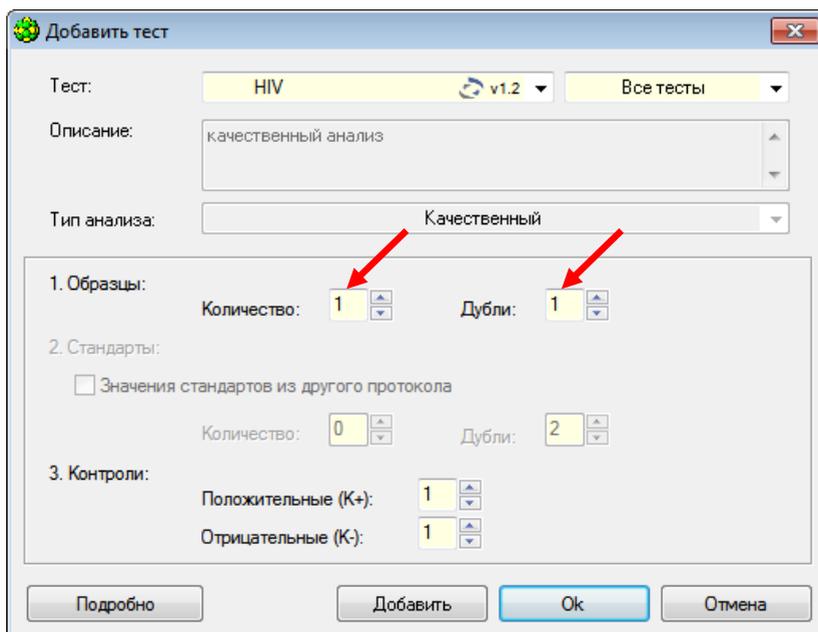
9.1.2. Нажмите кнопку «Добавить тест».



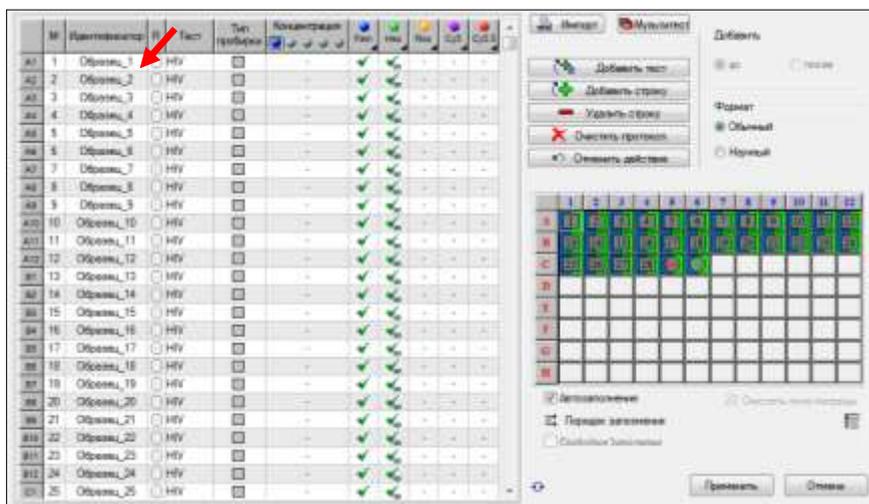
9.1.3. Выберите из списка тест «HIV».



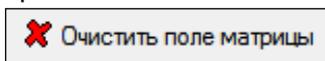
9.1.4. Укажите количество исследуемых образцов (в графе «Дубли» поставьте цифру 1), нажмите кнопку «Ок».



9.1.5. Укажите идентификаторы пробирок.



9.1.6. Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (при ошибочном заполнении протокола нажмите кнопки «Очистить поле матрицы» -

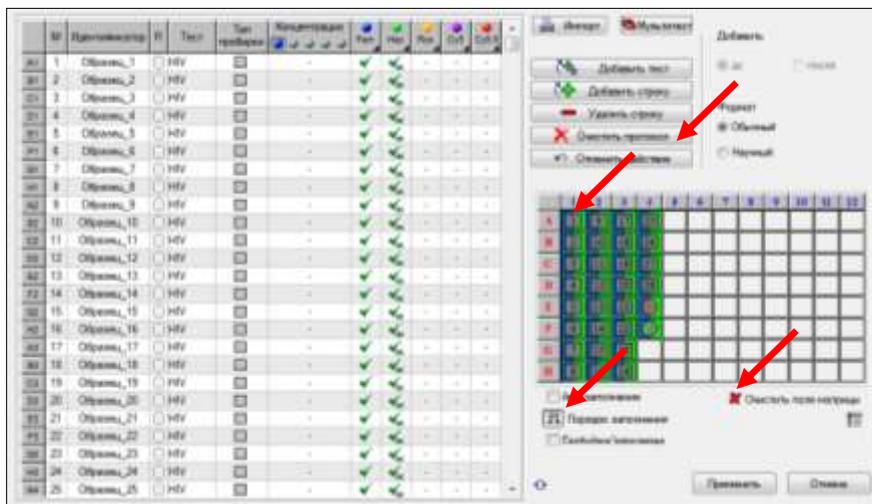


или «Очистить протокол» -

 Очистить протокол

и «Порядок заполнения» -

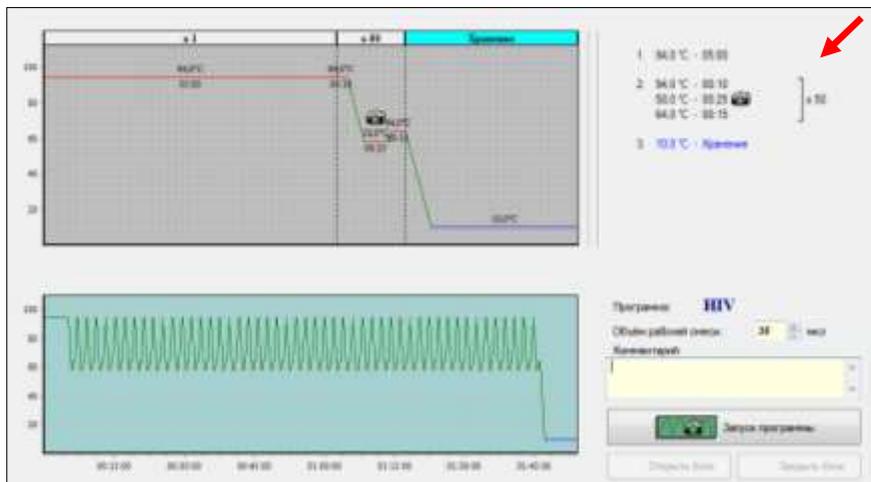
 Порядок заполнения



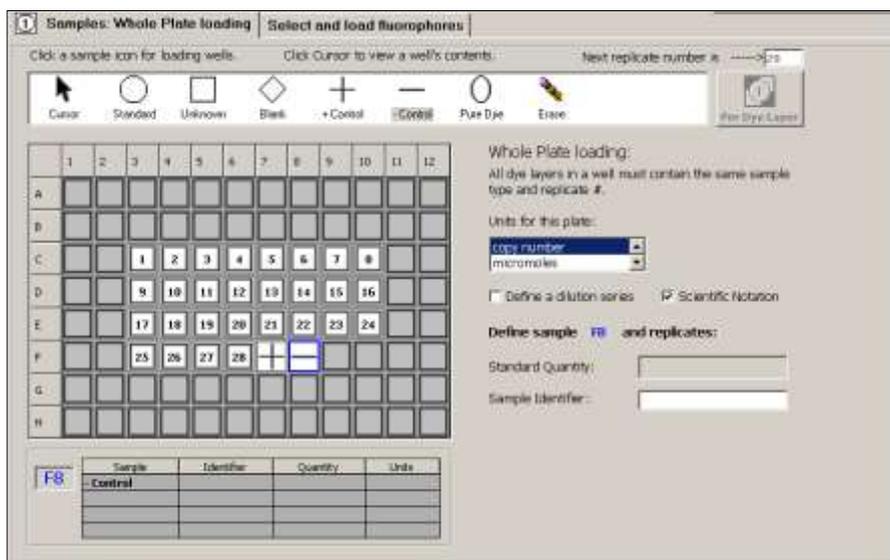
Если термоблок не заполнен полностью, рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой термоблока.



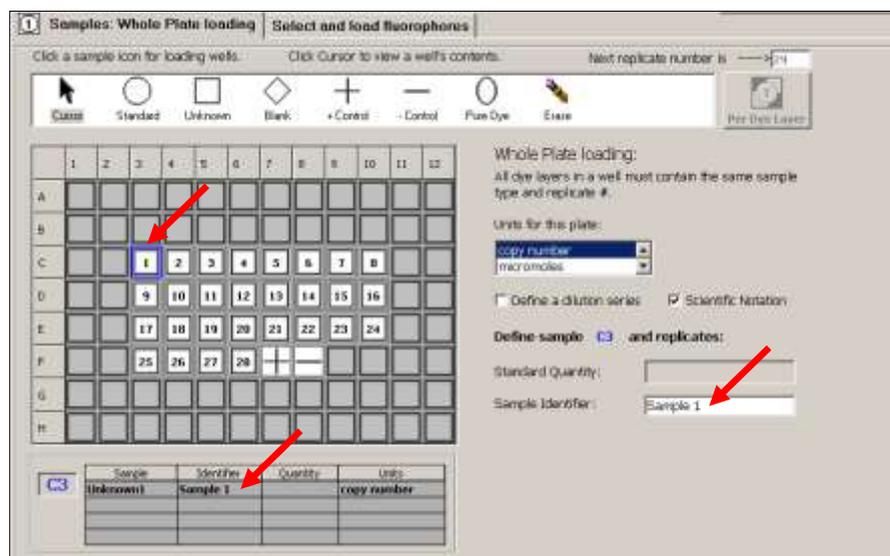
- 9.1.7. Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».
- 9.1.8. В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации.



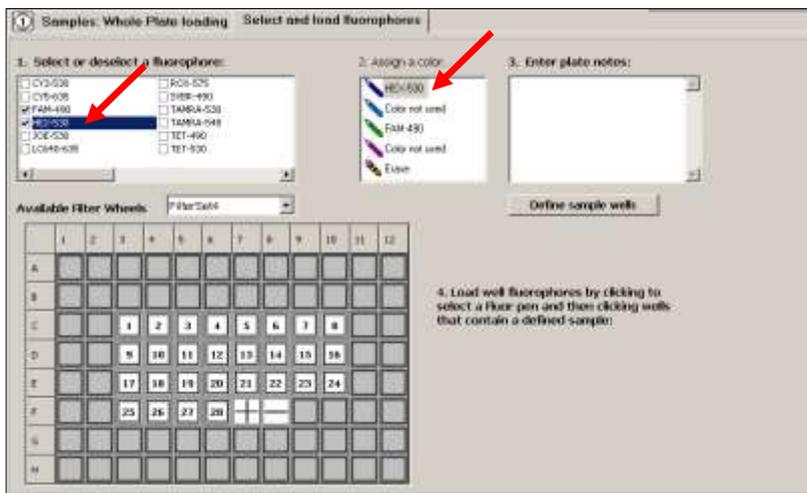
- 9.1.9. Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.
- 9.1.10. Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора (8.1.1)).
- 9.2.** Для прибора iQ:
- 9.2.1. Откройте программное обеспечение iCycler. Для постановки ПЦР необходимо создать новый файл настройки плашки. Для этого нажмите на вкладку «View Plate Setup» в «Workshop» и создайте или отредактируйте файл конфигурации плашки.
- 9.2.2. Выберите вкладку «Samples: Whole plate loading», укажите расположение пробирок в термоблоке (исследуемые образцы, положительный и отрицательный контрольные образцы).



9.2.3. Укажите идентификаторы образцов. Идентификаторы можно указывать после заполнения плашки, выделив курсором нужный образец.



9.2.4. Нажмите на вкладку «Select and load fluorophores». Выберите флуорофоры FAM-490 и HEX-530. В окне «2. Assign a color» выберите соответствующие флуорофорам цвета.



9.2.5. Заполните плашку, отметив оба флуорофора.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green		
D			Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green		
E			Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green		
F			Blue	Green	Blue	Green	Blue	Green				
G												
H												

9.2.6. Сохраните конфигурацию плашки, введя название файла настройки плашки в поле «Plate Setup Filename» и нажав «Save this plate setup». Созданный файл будет сохранен в модуле «Library».

Примечание - Для последующих постановок можно редактировать сохраненный файл настройки плашки, а не создавать его заново.

9.2.7. Выберите в модуле «Library» сохраненный ранее протокол, нажав вкладку «View Protocol». Затем перейдите во вкладку «View Plate Setup», выберите созданный файл настройки плашки. Нажмите кнопку «Run with selected protocol». Будет отображено окно «Run Prep» («Подготовка запуска»).

9.2.8. В меню «Select Well factor Source» выберите «Experimental Plate». Проверьте имена файлов протокола амплификации и настроек плашки, убедитесь, что файлы выбраны правильно. Укажите объём реакционной смеси - 35 мкл, нажмите «Begin Run» и сохраните в выбранной директории файл сбора и сохранения данных.

Примечание - Более подробное описание работы с прибором содержится в инструкции к прибору («Руководство пользователя» для iCycler).

9.3. Для прибора iQ5:

9.3.1. Откройте программное обеспечение Bio-Rad iQ5. Выберите «Производственный модуль» («Workshop») в левой части окна программы. Нажмите кнопку «Protocol» для активации окна «Selected protocol» («Выбранный протокол»).

9.3.2. Выберите необходимый каталог в левой части области просмотра файлов. Выберите необходимый файл с протоколом в правой части области просмотра файлов.

После выбора необходимого протокола его графическое и табличное представление отобразится в нижней части окна.

9.3.3. После выбора протокола перейдите к настройке конфигурации плашки. В «Производственном модуле» нажмите кнопку «Plate» для активации «Окна конфигурации плашки» («Selected Plate Setup»).

9.3.4. Нажмите кнопку «Create New» («Создать новую»), расположенную в нижнем правом окне исходного экрана в «Производственном модуле». Откроется окно «Editing Plate» («Редактирование плашки»).

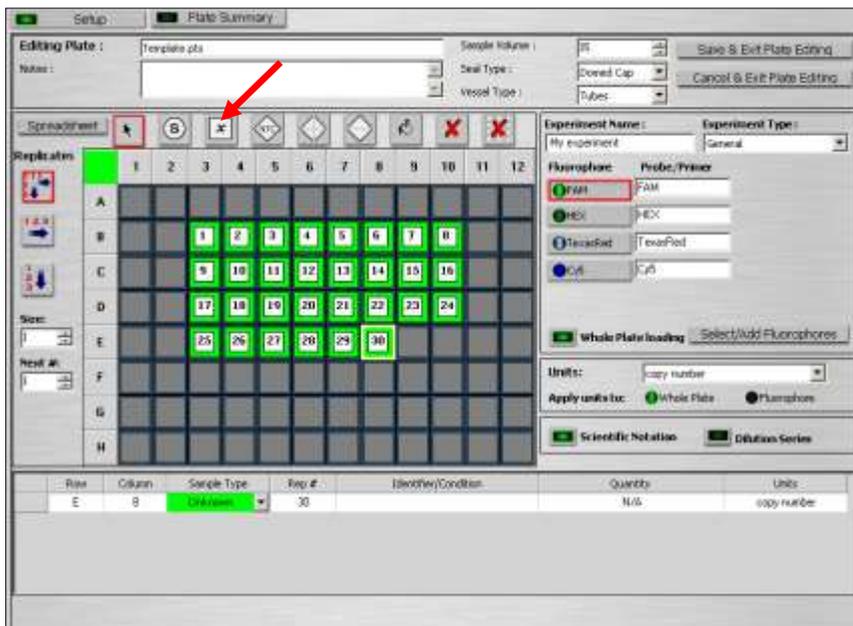
9.3.5. В поле «Editing Plate» введите название файла настройки плашки. Введите объём в поле «Sample Volume» - «35», выберите способ герметизации в поле «Seal Type» и тип пластика в поле «Vessel Type».

9.3.6. Включите метку «Whole Plate loading» (активная метка подсвечивается зелёным цветом), нажмите кнопку «Select/Add Fluorophores» («Выбрать/добавить флуорофоры»).

9.3.7. В открывшемся окне «Fluor Selector» отметьте флуорофоры FAM и HEX (поставьте галочки в поле «Selected» напротив указанных флуорофоров). Нажмите кнопку «OK» для возврата в окно «Editing Plate».

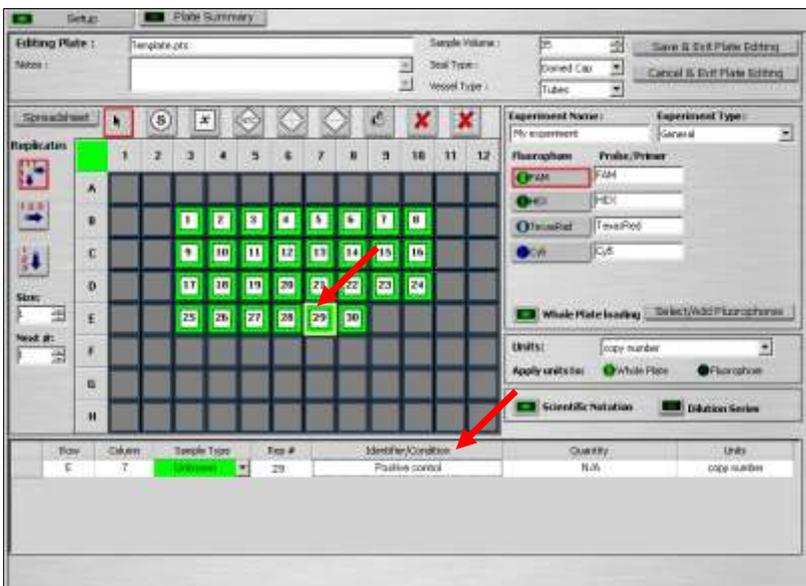
9.3.8. Активируйте кнопку FAM.

9.3.9. Укажите расположение неизвестных (исследуемых) образцов, положительного и отрицательного контрольных образцов. Для этого щелкните по пиктограмме типа образца (неизвестный образец).



ВНИМАНИЕ! Положительный и отрицательный контрольные образцы необходимо указать как неизвестные!

9.3.10. Последовательно выделите нужные ячейки курсором и введите в появившуюся внизу таблицу соответствующее обозначение для каждого контрольного образца («Positive control» и «Negative control»).

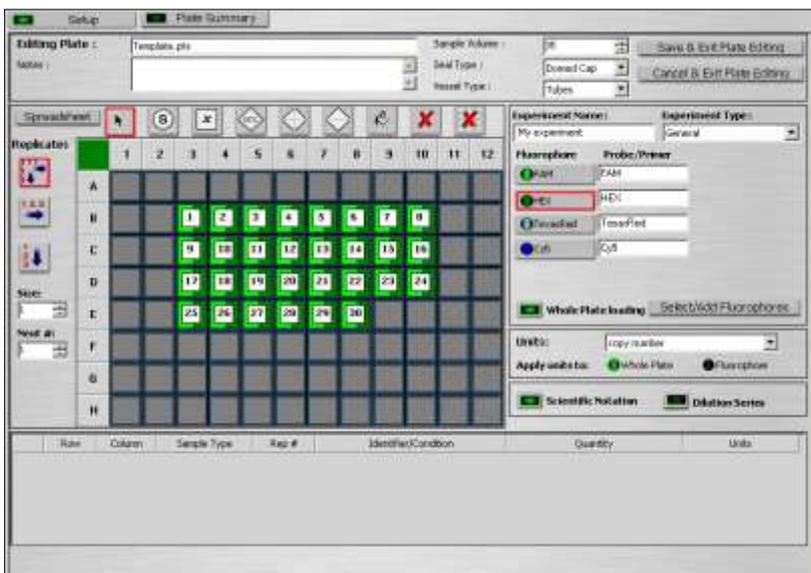


9.3.11. Активируйте кнопку HEX.



9.3.12. Выберите пиктограмму заливки плашки , щелкните по темно-зелёному квадрату в левом верхнем углу плашки.

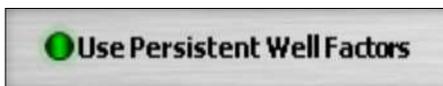
Каждая заполненная ячейка в плашке должна быть окрашена в два цвета.



- 9.3.13. Сохраните настройки плашки, для этого щелкните по кнопке «Save & Exit Plate Editing» («Сохранить и покинуть редактирование плашки») в верхнем правом углу окна.
- 9.3.14. Проверьте название файла плашки в диалоговом окне «Save As» («Сохранить как»), затем нажмите кнопку «Save» («Сохранить»).

Примечания

1. Вы можете выйти из Редактора плашки, щелкнув по кнопке «Save & Exit Plate Editing» или по кнопке «Cancel & Exit Plate Editing» («Отменить и выйти из редактирования плашки»).
 2. Для последующих постановок можно редактировать сохраненный файл настройки плашки, а не создавать его заново.
- 9.3.15. После выбора необходимого протокола и файла настройки плашки запустите выполнение протокола. Для этого нажмите кнопку «Run» в правом верхнем углу окна «Setup». Программа перейдет в модуль «Run-Time Central» («Модуль отображения текущего процесса»).
- 9.3.16. Отметьте окошко «Use Persistent Well Factors» в левой верхней области окна.



- 9.3.17. Проверьте условия постановки амплификации. Протокол, который будет выполняться, находится в нижнем левом углу окна, а настройка плашки, которая будет использоваться - в нижнем правом углу окна.
- 9.3.18. При необходимости внесите дополнительную информацию об исследовании в окно «Notes» («Примечания»). Эти примечания будут вставлены в экспериментальный файл. Нажмите кнопку «Begin Run» для запуска прогона. Откроется диалоговое окно «Save».
- 9.3.19. Наберите имя для файла оптических данных. iQ5 автоматически сохраняет данные во время эксперимента.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

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



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

10.2. Регистрация результатов амплификации (формат «Real-time»)

Регистрация сигнала проводится прибором во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

Анализ проводится программным обеспечением.

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

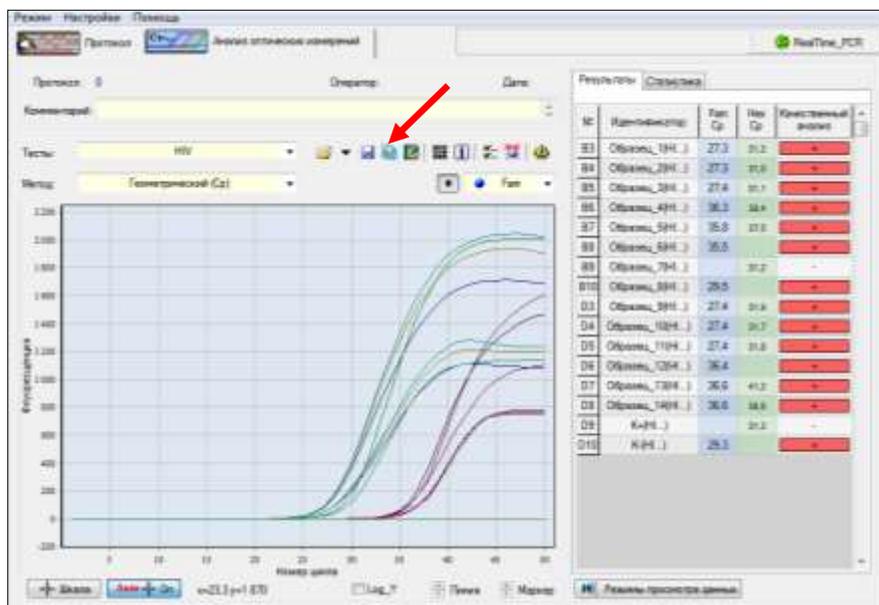
После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца и индикаторный цикл (Cp) для каналов Fam и Hex.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания лабораторного отчёта необходимо нажать

кнопку «Отчет» .

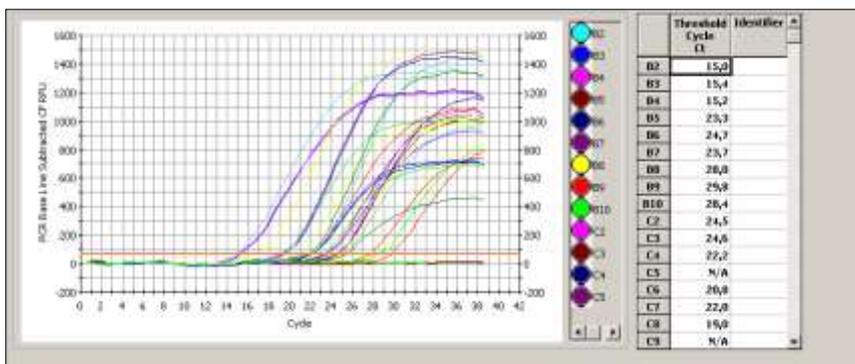


10.2.2. Для прибора iQ:

Анализ и представление результатов осуществляется в модуле «Data Analysis» («Анализ данных»).

Закладка «PCR Quantification» включает в себя два окна:

- график амплификации;
- таблицу с показателями Ct и идентификаторами образцов.



По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания отчета необходимо:

1. Нажать кнопку «Reports». Откроется окно «Report Viewer» («Просмотр отчётов»).
2. Выбрать в поле «Select Report» («Выбор отчёта») пункт «Std Curve with Amp Cycle».
3. Выбрать в поле «Sort Data By» («Сортировка данных по...») пункт «Well» («Лунки»).
4. Выбрать метку «Ascending Order» («Сортировка по возрастанию»).

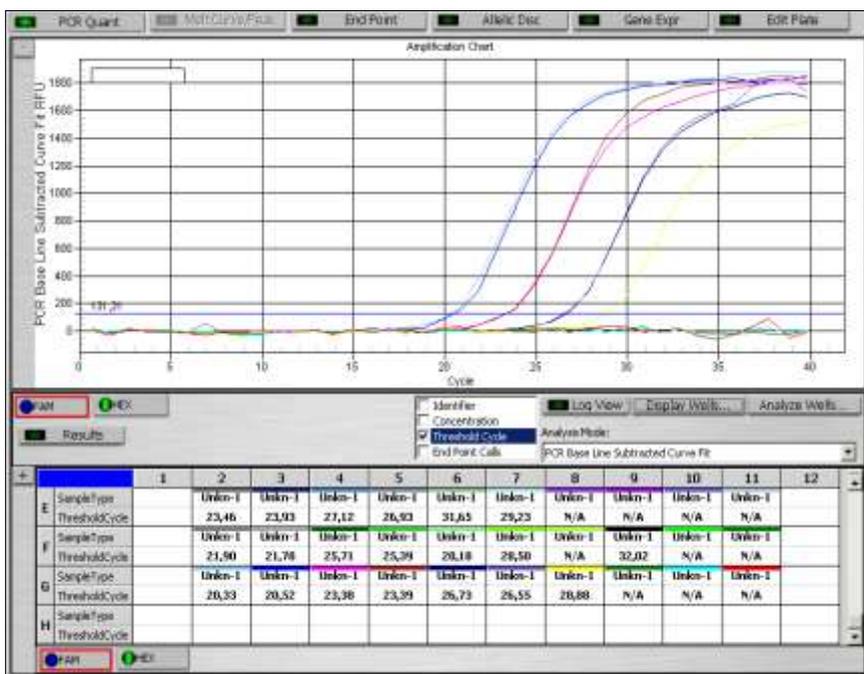
10.2.3. Для прибора iQ5:

Анализ и представление результатов осуществляется в модуле «Data Analysis» («Анализ данных»).

Нажмите кнопку «PCR Quant» («Количественный анализ ПЦР») для выбора закладки «PCR Quant».

Закладка PCR Quant включает в себя два окна:

- график амплификации;
- таблицу результатов.



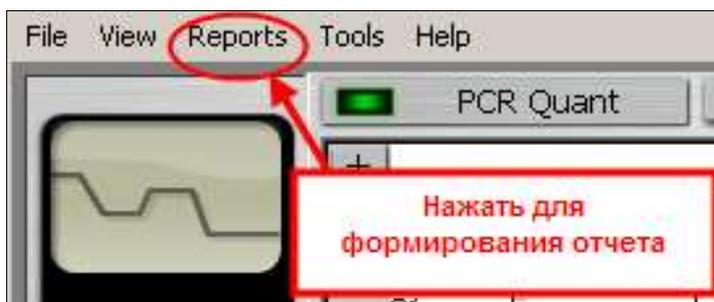
По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

Для создания отчета необходимо:

1. Выбрать оба флуорофора **FAM** и **HEX**. Выбранные флуорофоры выделены красной рамкой.

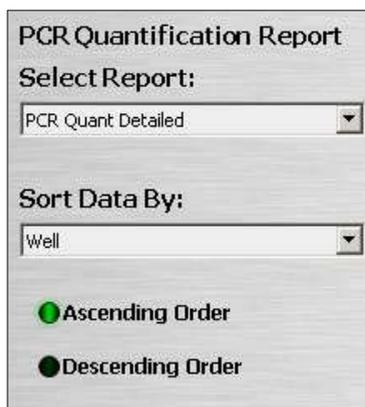


2. Щелкнуть по пункту «**Reports**» в меню программы.



Откроется окно «Report Viewer» («Просмотр отчётов»).

3. Выбрать в поле «Select Report» («Выбор отчёта») пункт «PCR Quant Detailed» («Детализированный отчёт о количественной ПЦР»).
4. Выбрать в поле «Sort Data By» («Сортировка данных по...») пункт «Well» («Лунки»).
5. Выбрать метку «Ascending Order» («Сортировка по возрастанию»).



PCR Quantification Report

Select Report:

PCR Quant Detailed

Sort Data By:

Well

Ascending Order

Descending Order

Результаты анализа представлены в разделе «**Standard Curve Spreadsheet Data**».

В таблице отображается следующая необходимая информация:

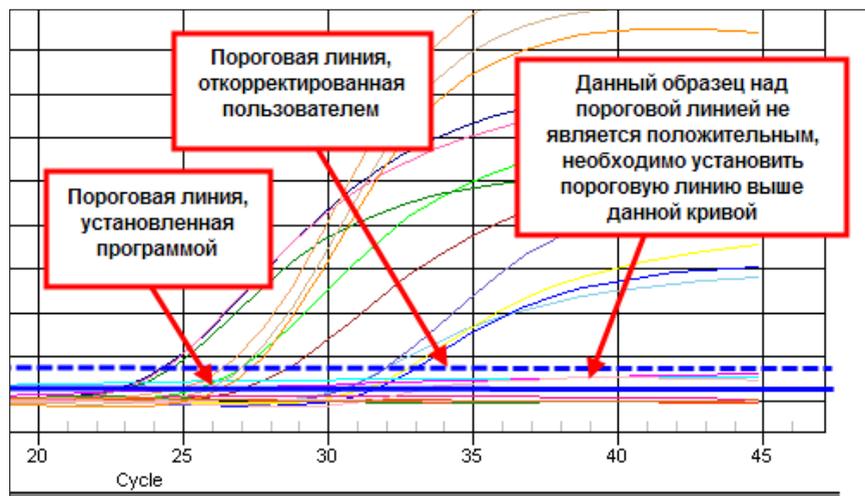
- **Fluor** – флуорофор;
- **Well** – номер лунки;
- **Type** – тип образца:
 - **Unkn** (Unknown)– неизвестные образцы,
- **Ident** – идентификатор пробирки;
- **Rep** – номер образца в плашке;
- **Ct** – пороговый цикл в данной пробирке;
- **Ct Mean** – средняя величина порогового цикла в дублях.

При выполнении пункта 10.2.3 рекомендуется обратить внимание на высоту пороговой линии.

Графики кривых **положительных образцов** должны находиться **выше пороговой линии**, начиная с порогового цикла.

Графики кривых **отрицательных образцов** должны находиться **ниже пороговой линии**.

При необходимости скорректируйте пороговую линию.



11. УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

11.1. Учёт результатов реакции с помощью детектора флуоресценции или детектирующего амплификатора

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 - Интерпретация результатов ПЦР

Формат «FLASH»	Формат «Real-time»		Интерпретация ⁷
Результат, выданный флуоресцентным детектором «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Результат по каналу детекции Fam (искомая РНК)	Результат по каналу детекции Hex (внутренний контроль) ⁸	
Анализируемые образцы			
«+»	Ср/Ct указан	Не учитывается	Обнаружена РНК ВИЧ («+»)
«-»	Ср не указан (для iQ N/A)	Ср (для iQ5 Ct) 29-34	Не обнаружена РНК ВИЧ («-»)
«нд»	Ср не указан (для iQ N/A)	Ср не указан (для iQ N/A)	Недостовверный результат («нд»)
Положительный контрольный образец			
«+»	Ср (для iQ5 Ct) <33	Не учитывается	Положительный результат («+»)
Отрицательный контрольный образец			
«-»	Ср не указан (для iQ N/A)	Ср (для iQ5 Ct) 29-34	Отрицательный результат («-»)

11.2. Недостовверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В

⁷ - в скобках представлен результат в графе «Качественный анализ» для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96.

⁸ - если значение Ср (Ct) по каналу Hex больше указанного, результат недостоверный!

этом случае необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение РНК и постановку обратной транскрипции и ПЦР для этого образца, либо повторное взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

- 11.3.** При получении недостоверного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.
- 11.4.** При получении положительного результата на наличие РНК ВИЧ в отрицательном контрольном образце, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

12. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 12.1.** Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 12.2.** Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительного контрольного образца, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора. Допускается многократное замораживание/оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла.
- 12.3.** Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, положительный контрольный образец и комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.
- 12.4.** Набор должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.
- 12.5.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 12.6.** Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

13. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 13.1** Наборы с истекшим сроком годности и неиспользованные реактивы утилизируют в соответствии с требованиями Сан-ПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 13.2** непригодные для использования наборы реагентов, упаковка набора реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

14. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 14.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 14.2** Срок годности набора – 9 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления нуклеиновых кислот (НК) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (ВИЧ-ГЕН), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г.Москва, Варшавское ш.,д.125Ж, корпус 6, этаж 5, комн.14,тел./факс +7 (495) 640-17-71

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

Адрес производителя и место производства:

ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

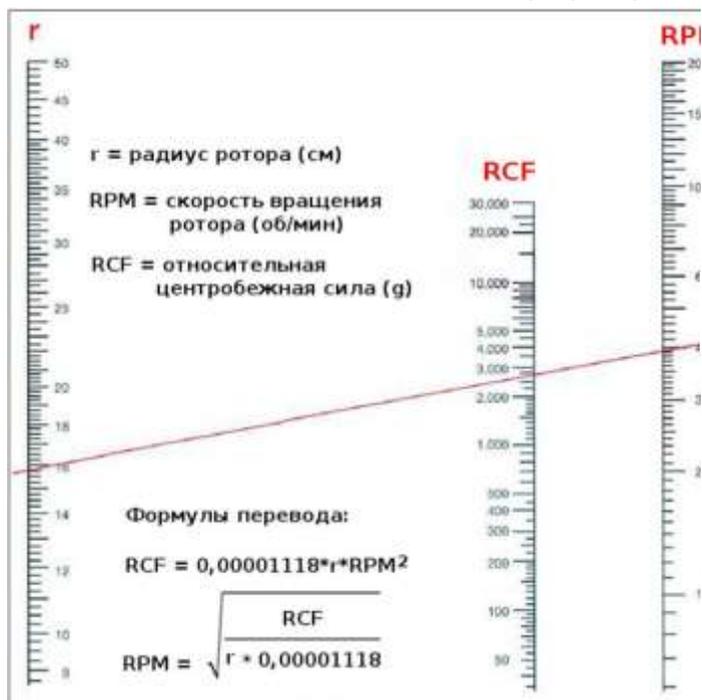
Приложение А
(справочное)

Символы, используемые при маркировке набора

	Только для in vitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

Приложение Б (справочное)

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



ДНК-Технология

117587, Москва, Варшавское ш., д. 125ж, корп. 6, 5 этаж, комн.14

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный)

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный)

E-mail: hotline@dna-technology.ru