

Регистрационное удостоверение
№ФСР 2008/03503

Набор реагентов для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1-го типа в образцах плазмы крови методом обратной транскрипции с последующей амплификацией синтезированных фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Набор может быть использован в клинической практике для диагностики ВИЧ 1-го типа и для оценки эффективности антиретровирусной терапии.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией с детекцией результатов в режиме реального времени; количественный анализ.

Материал для исследования:

Плазма крови.

Выделение ДНК:

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

Особенности комплекта:

Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – необходим для оценки качества всех этапов исследования. Калибровочные образцы (СТ-1, СТ-2) - позволяют построить калибровочную прямую, при помощи которой можно определить концентрацию РНК ВИЧ в исследуемых образцах плазмы крови.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96; версия программного обеспечения не ниже 7.3, рекомендуемая версия 7.3.5.84³.

или
iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad)

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

Время проведения анализа:

5 ч.

Количество определений:

44 определения неизвестных образцов (в двух повторях каждый).

Условия хранения и эксплуатации

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

Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, калибровочные образцы, положительный контрольный образец и комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот следует хранить в темном месте при 2–8 °С в течение всего срока годности набора.

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

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

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

³ – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/support/>

Состав набора

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот		
<ul style="list-style-type: none"> • Лизирующий раствор • Реагент для преципитации • Промывочный раствор №1 • Промывочный раствор №2 • Буфер для растворения • Отрицательный контрольный образец («К-») • Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) 	30 мл 40 мл 50 мл 30 мл 1,25 мл 1,5 мл 1,0 мл	1 флакон 1 флакон 1 флакон 1 флакон 4 пробирки 2 пробирки 1 пробирка
Калибровочные образцы		
<ul style="list-style-type: none"> • ВИЧ-РНК-СТ1 (1 × 10⁶ копий/мл) • ВИЧ-РНК-СТ2 (3 × 10³ копий/мл) 	0,3 мл 0,3 мл	5 пробирок 5 пробирок
Комплект реагентов для обратной транскрипции		
<ul style="list-style-type: none"> • «Праймеры-ОТ-HAV-HCV-HDV-HGV-HIV+дНТФ» • Буферный раствор «ОТ-буфер» • Обратная транскриптаза 	100 мкл 200 мкл 50 мкл	1 пробирка 1 пробирка 1 пробирка
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации		
<ul style="list-style-type: none"> • Смесь для амплификации, запечатанная парафином • ПЦР-буфер • Полимераза ТехноТаq • Минеральное масло • Положительный контрольный образец («К+») 	20 мкл 500 мкл 50 мкл 1,0 мл 150 мкл	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок 2 пробирки 1 пробирка 2 пробирки 1 пробирка

Каналы детекции продуктов амплификации

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

Инструкция по применению

1. Выделение НК

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации должны использоваться только совместно с комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК. Для повышения достоверности получаемых результатов на этапе выделения РНК исследуемые образцы необходимо продублировать (для одного исследуемого образца провести две отдельные пробоподготовки).

- 1.1. Промаркируйте по две пробирки объемом 1,5 мл для каждого исследуемого образца, одну для отрицательного контрольного образца («К-») и по три пробирки для каждого из калибровочных образцов («СТ1» и «СТ2»).
- 1.2. Проведите пробоподготовку согласно полной инструкции к набору реагентов ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ.

2. Подготовка и проведение обратной транскрипции

- 2.1. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры-ОТ-HAV-HCV-HDV-HGV-HIV+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25 °С), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.
- 2.2. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 2,0 x (N + 1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры-ОТ-HAV-HCV-HDV-HGV-HIV+дНТФ»,
 - 0,5 x (N + 1) мкл обратной транскриптазы,
 где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-», «СТ-1», «СТ2». Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 27. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 28 (27+1) пробирок, т.е. 56 мкл ОТ-буфера + 28 мкл праймеров + 14 мкл обратной транскриптазы.

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

- 2.3. Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).
- 2.4. Добавьте по 3,5 мкл ОТ-смеси во все промаркированные пробирки (включая «К-», «СТ1» и «СТ2»). Перемешайте пипетированием 5-7 раз.
- 2.5. Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.
- 2.6. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 3.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для исследуемых образцов плазмы крови, положительного контрольного образца ДНК «К+», отрицательного контрольного образца «К-» и по три пробирки для калибровочных образцов («СТ1» и «СТ2»).
- 3.2. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq на микроцентрифуге/вортексе в течение 3–5 сек, затем центрифугируйте при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).
- 3.3. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq,
- где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-», «СТ-1», «СТ2», «К+».
- 3.4. Перемешайте смесь на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).
- 3.5. Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq.
- 3.6. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 3.7. Встряхните пробирки с препаратом кДНК на микроцентрифуге/вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 3.8. Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов и предварительно перемешанного препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (2 шт. для каждого образца).

- 3.9. Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл предварительно перемешанного отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и реакцию обратной транскрипции, в пробирку, промаркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл предварительно перемешанного положительного контрольного образца ДНК, в пробирку, промаркированную «К+».
- 3.10. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл кДНК соответствующего калибровочного образца в пробирку, маркированные «СТ1» и «СТ2» (3 шт. для каждого образца).
- 3.11. Центрифугируйте пробирки при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек при комнатной температуре (18–25 °С).
- 3.12. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего.
- 3.13. 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_RQ». При последующих постановках добавьте в протокол тест «HIV_RQ», укажите количество исследуемых образцов в дублях и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (п.3.12) и проведите ПЦР.

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. При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию плашки (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в плашке) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 1,2).

Таблица 1

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	

Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ

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

4. **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для амплификаторов детектирующих. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3

Интерпретация результатов ПЦР

Выбранный флуорофор		Интерпретация результата
Fam, значение в диапазоне (SD Mean для iQ), копий/мл	Hex, значение C _p (C _t для iQ5)*	
Анализируемые образцы		
5,0x10 ² – 1x10 ⁸	Не учитывается	Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (копий/мл)
Менее 5,0x10 ²	Не учитывается	Положительный результат с указанием «менее 500 копий/мл» (без указания точного значения!)
Более 1x10 ⁸	Не учитывается	Положительный результат с указанием «более 10 ⁸ копий/мл» (без указания точного значения!)
Не указано (для iQ N/A)	C _p (для iQ5 C _t) 29-34	Результат отрицательный
Не указано (для iQ N/A)	Не указано (для iQ N/A)	Результат недостоверный
Положительный контрольный образец		
2,5x10 ⁵ – 8,0x10 ^{5**}	Не указано (для iQ N/A)	Положительный результат с указанием вирусной нагрузки в образце (копий/мл)
Отрицательный контрольный образец		
Не указано (для iQ N/A)	C _p (для iQ5 C _t) 29-34	Результат отрицательный

* – если значение C_p (C_t) по каналу Hex больше указанного, результат недостоверный!

** – если в положительном контрольном образце определяемая концентрация ДНК выходит за рамки диапазона 2,5x10⁵ – 8,0x10⁵ копий/мл, необходимо повторить исследование.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (ВИЧ-ГЕН КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

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

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