МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель
Министра здравоохранения
Республики Беларусь
_____И.Г. Лосицкий
«17» 12 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

тест-системы для обнаружения и количественного определения ДНК парвовируса (PVB19) в сыворотке крови методом REAL-TIME PCR ТУ BY 391360704.010– 2015.

Производства ООО «СИВитал» Беларусь
№ _____от _____ 20__

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
_____С.И. Зинченко
16 12 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»
_____В.А. Горбунов
14 12 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ООО «СИВитал»
_____А.М. Азолин
14 12 2015 г.

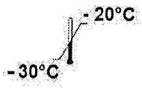
СОГЛАСОВАНО
Ректор УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»
д.м.н., профессор
_____А.Т. Щастный
12 12 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
_____В.А. Синкевич
10 12 2015 г.

2015 г.

КОПИЯ ВЕРНА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Предназначен для количественного определения фрагментов генома PVB19 в биологических субстратах на 50 исследований	
	Универсальный формат Предназначен для использования с блочными и карусельными термоциклерами, способными работать с пробами объёмом 25 мкл и регистрировать FAM/ROX флуоресценцию, например, CFX96™, Rotor-Gene	ТУ BY 391360704.010-2015 (50 тестов включая контроли)
	Рекомендованная температура хранения	
	ООО «СИВитал» 210017, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. Гагарина, 11 В	Tel.: +375-212-43-63-07 Fax: +375-212-43-64-48 E-mail: info@sivital.by

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. Содержимое тест системы

Тест-система комплектуется всеми необходимыми ингредиентами для проведения ПЦР-исследований для обнаружения и количественного определения ДНК PVB19 **(таблица 1).**

Таблица 1: Компоненты тест-системы

Маркировка	Упаковка (50 тестов)	Вид упаковки	Описание
PVB19-Олиго-нуклеотидный микст	2 пробирки	Янтарная пробирка, янтарная крышка	Лиофилизированная смесь реагентов, содержащая специфические праймеры PVB19, зонды.
PVB19-стандарт	3 стрипа	–	Пробирки со стандартами, покрытые различным количеством синтетической *PVB19*
Вода для PCR-исследований	2×1.5 мл	бесцветный флакон, бесцветная крышка	Очищенная вода для ПЦР
Пробирки для выделения ДНК с внутренним стандартом	50 шт.	-	-
Taq-полимераза	1×135 U	бесцветный флакон, бесцветная крышка	(5 U/мкл)
Буферная смесь2	1×0.5 мл	бесцветный флакон, оранжевая крышка	10× концентрат, содержащий хлорид магния, буферную смесь
Комплект для выделения НК	50	Коробка с компонентами набора	1 комплект
	1	Инструкция	

2. Условия хранения, стабильность

Тест-система может транспортироваться при комнатной температуре, за исключением обратной транскриптазы и 2× реагентного микста, которые должны перевозиться на сухом льду. Хранить тест-систему (включая обратную транскриптазу и 2× реагентный микст) необходимо в темном месте при –20...–30°С, куда его следует поместить сразу после доставки. Стабильность тест-системы гарантируется в течение всего срока хранения (при хранении в оговоренных выше условиях). Реагенты, не включенные в набор, должны храниться в условиях, рекомендованных их производителями.

Замечание. Необходимое количество реагентной смеси (PVB19-олигонуклеотидный микст) непосредственно перед употреблением необходимо растворить в воде для ПЦР-исследований. Остаток растворённой реагентной смеси может храниться при +2+8°С в течение, по крайней мере, 3 месяцев (не замораживать! всегда беречь от попадания света!)

3. Ограничения в использовании продукта

Очень высокая концентрация гепарина в образце может привести к критическому снижению коэффициента извлечения копий нуклеиновой кислоты PVB19. При использовании образцов иной природы возможно получение неправильных результатов. Тест-система может быть использована только с оговоренным ПЦР-оборудованием.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4. Сбор и обработка клинических образцов

Кровь (плазма, сыворотка)

- Соберите 5-10 мл периферической крови, используя стандартные пробирки для сбора образцов.
- Необходимо использовать пробирки для сбора крови, покрытые антикоагулянтом ЭДТА или цитратом.
- Допускается отобрать кровь в стандартные пробирки с предварительно добавленными 3% растворами вышеуказанных коагулянтов из расчета 10:1.
- Центрифугировать кровь при 1500 об/мин в течение 10 мин (получение плазмы).
- Для получения сыворотки крови забор кровь проводят без антикоагулянта

Химические взаимодействия

- Повышенный уровень билирубина (≤30 мг/100 мл), липидов (≤1.57 г/100 мл), гемоглобина (≤3.9 г/100 мл), ЭДТА (≤30 мМ) и цитрата (≤3.13%) не влияют на работу тест-системы.

 Гепарин (40 мг/дл) ингибирует ПЦР.

5. Реагенты и оборудование, предоставляемые пользователем

- Термоциклер для Real-Time PCR.
- Программное обеспечение термоциклера для анализа и протоколирования данных.
- Пластиковые расходные материалы для термоциклера (свободные от РНК-аз).
- Пипетки, стерильные наконечники для них с аэрозольным барьером (свободные от РНК-аз).
- Микроцентрифуга скоростная, пригодная для пробирок объёмом 0.2 мл, 1.5 мл и 2.0 мл, а также для 96-луночных планшет.
- Твердотельный термостат, пригодный для пробирок объёмом 0.2 мл, 1.5 мл и 2.0 мл, а также для 96-луночных планшет.
- Вортекс.
- Пробирки 1,5 мл.
- Перчатки, лабораторный халат.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК из биологического материала осуществляют с применением комплекта для выделения нуклеиновых кислот (НК), входящего в состав тест-системы **(таблица 2).**

Таблица 2: Компоненты комплекта.

Наименование	Количество на 50 проб	Описание
Лизирующий буфер	35 мл	
Промывочный буфер 1	30 мл	
Промывочный буфер 2 (концентрат)	12 мл	
Вода для PCR-исследований	13 мл	pH около 7 – 8
Элюент	13 мл	pH 8.5
РНК-переносчик	1 мг	Лиофилизировано
Протеиназный буфер	1.8 мл	
Протеиназа К	30 мг	Лиофилизировано
Колонка фильтр	50	Тёмно-синие кольца
Пробирки для отбора НК	4x50	Пробирки для сбора (2 мл) прилагаются
Пробирки для образцов	50	Пробирки для образцов (2.0 мл) содержащие стабилизированные внутренние контроли прилагаются с тест-системой
Пробирки для элюирования	50	Пробирки для элюирования (1.5 мл)

6.1. Необходимые реагенты и оборудование

- 96-100 % этанол (для улучшения осаждения нуклеиновых кислот и для приготовления промывочного буфера 2)
- Одноразовые наконечники (рекомендуются наконечники с фильтром и лабораторный пластик свободные от РНК-аз)
- Пипетки
- Центрифуга для маленьких пробирок высокоскоростная
- Вортекс
- Термостат для инкубации при 70 °С
- Средства личной защиты (например, лабораторный халат, перчатки, очки)

6.2. Протокол очистки вирусных нуклеиновых кислот

Перед началом протокола необходимо приготовить рабочие растворы **(таблица 3).**

Таблица 3: Приготовление рабочих растворов.

Компонент	50 проб
Лизирующий буфер	Добавьте 1 мл Лизирующего буфера во флакон с РНК-переносчиком, пипетируйте раствор обратно во флакон
Промывочный буфер 2 (концентрат)	12 мл Добавьте 48 мл этанола (96-100 %)
Протеиназа К	30 мг Добавьте 1.35 мл Протеиназного буфера

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.3. Хранение и стабильность

До момента доставки необходимо хранить набор при комнатной температуре (18-25 °С). Лиофилизированная Протеиназа К может храниться при комнатной температуре (18-25 °С) до истечения срока годности без ухудшения качества. Перед первым использованием набора, добавьте указанный объём Протеиназного буфера, чтобы растворить лиофилизированную Протеиназу К **(таблица 4).** Растворенную Протеиназу К следует хранить при -20 °С до 6 месяцев, но не дольше установленного срока годности. При дискретном использовании тест-системы рекомендуется Протеиназу К разлить на аликвоты.
Лиофилизированный РНК-переносчик может храниться при комнатной температуре (18-25°С) до истечения срока годности без ухудшения качества. Добавьте 1 мл Лизирующего буфера к флакону с РНК-переносчиком перед первым использованием. Растворите РНК-переносчик и пипетируйте раствор обратно во флакон. РНК-переносчик имеет ограниченный срок хранения в Лизирующем буфере. Буфер с РНК-переносчиком может храниться при 4°С до 4 недель; при -20°С растворенный РНК-переносчик стабилен на протяжении одного года. Хранение при 4 °С или ниже может вызывать преципитацию солей. Если присутствует видимый осадок, перед использованием следует его растворить нагреванием до 40-60 °С не более 5 минут. Не нагревайте Лизирующий буфер, содержащий РНК-переносчик более 4 раз! Частое нагревание (температура >80 °С), продолжительное термостатирование ускорят деградацию РНК-переносчика.
Промывочный буфер 2: Добавьте указанный объём (смотрите таблицу выше или на флаконе) этанола (96-100 %) к концентрированному Промывочному буферу 2. Отметьте на этикетке, что этанол уже добавлен. Храните промывочный буфер 2 при комнатной температуре. В этих условиях Промывочный буфер2 может храниться до одного года, но только до истечения срока годности.

Таблица 4: Выделение вирусной нуклеиновой кислоты

Шаг	***Замечания и комментарии***
1. Добавьте 600 мкл Лизирующего буфера содержащего РНК-переносчик в пробирку для образцов с внутренним контролем, содержащихся в наборе.	*Встряхните пробирки на максимальной скорости, перед тем как открыть их убедитесь в том, что лиофилизированная пеллета находится на дне пробирки и не будет просыпана при открытии пробирки*
2. Поместите 150 мкл образца в пробирку для образцов содержащую Лизирующий буфер и РНК-переносчик.	
3. Добавьте 20 мкл раствора Протеиназы К в пробирку для образцов.	*Протеиназа К необходима для лизиса ДНК/РНК вирусов. Добавляйте Протеиназу К только после того как Лизирующий буфер 1 и образец уже находятся в пробирке.*
4. Пипетируйте полученную смесь вверх и вниз и тщательно перемешайте её на вортексе.	*Проследите, чтобы смесь находилась, по крайней мере, 1 минуту при комнатной температуре перед термостатированием.*
5. Инкубируйте 5 минут при 70 °С.	
6. Слегка центрифугируйте пробирку для образцов (~1 сек. при 2,000 x *g*) чтобы удалить капли с крышки	*Кратковременно*
7. Добавьте 600 мкл этанола (96-100 %) чтобы очистить лизат.	*Перемешать на вортексе 10 – 15 сек*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Продолжение таблицы 4

8. Осторожно загрузите 680 мкл лизата на колонку фильтр, поместите её в пробирку для отбора НК и закройте крышку.	*Центрифугировать 1 мин при 11,000 x g*
9. Поместите колонку фильтр в новую пробирку для отбора НК (2 мл, прилагается) и избавитесь от пробирки с жидкостью, полученной на предыдущем этапе.	
10. Загрузите оставшийся лизат (около 680 мкл) на колонку для фильтрации, и закройте крышку.	*Центрифугировать 1 мин при 11,000 x g*
11. Поместите колонку фильтр в новую пробирку для отбора НК (2 мл, прилагается) и избавитесь от пробирки с жидкостью, полученной на предыдущем этапе.	
12. Добавьте 500 мкл Промывочного буфера 1 на колонку для фильтрации.	*Центрифугировать 1 мин при 11,000 x g*
13. Поместите колонку фильтр в новую пробирку для отбора НК (2 мл, прилагается) и избавитесь от пробирки с жидкостью, полученной на предыдущем этапе.	
14. Добавьте 600 мкл Промывочного буфера2 на колонку для фильтрации.	*Центрифугировать 1 мин при 11,000 x g*
15. Поместите колонку для фильтрации в новую пробирку для сбора (2 мл, прилагается) и избавитесь от пробирки с жидкостью, полученной на предыдущем этапе.	
16. Добавьте 200 мкл Промывочного буфера 2 на колонку для фильтрации.	*Центрифугировать 3 мин при 11,000 x g*
17. Поместите колонку для фильтрации в пробирку для элюирования (1.5 мл) и избавитесь от пробирки с жидкостью, полученной до этого.	
18. Добавьте 50 мкл Элюента (предварительно нагретого до 70 °С) и инкубируйте 1-2 мин при 70°С.	*Центрифугировать 1 мин при 11,000 x g*

6.4. Хранение ДНК

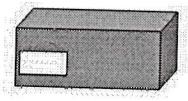
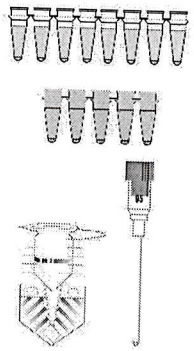
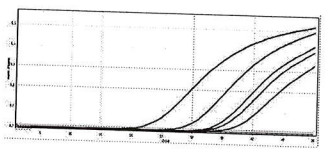
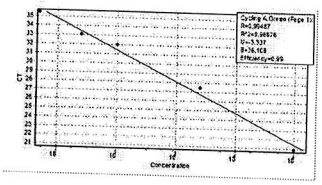
Очищенная ДНК может храниться при -80 ° С и стабильна в течение нескольких месяцев и лет.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. Принцип действия набора для определения PVB19

Набор для определения *PVB19* – это тест-система, основанная на полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR). Набор разработан для определения фрагментов генома *PVB19*. Стандарты количественного определения состоят из синтетической НК *PVB19*, которые должны амплифицироваться вместе с анализируемыми образцами **(рисунок 1).**

Рисунок 1: набор для определения *PVB19*: краткий обзор протокола эксперимента. Реагенты и расходные материалы, необходимые для стадий 1-2, входят в набор.

1. Выполнить выделение вирусной НК из биологического материала, с использованием рекомендованного набора для экстракции	 Выполнить выделение в соответствии с инструкцией.
2. Приготовить 25× PVB19_олигонуклеотидную смесь	 Добавить 35 мкл очищенной воды, перемешать на вортексе в течение 3 секунд.  5 сек, 10,000g
3. Приготовить и разлить по пробиркам 1× рабочий раствор реагентной смеси, добавить образцы	 Добавить 15 мкл 1× реагентной смеси во все пробирки с испытуемыми образцами и в пробирки со стандартами. Добавить по 10 мкл проб в пробирки для испытуемых образцов. Добавить по 10 мкл очищенной воды в пробирки с *контролями контаминации*, а также по 10 мкл каждого из растворённых стандартов в пробирки со стандартами количественного определения.  5 сек, 1,500g
4. Закрыть пробирки, установить их в термоциклер, настроить и запустить РТ-ПЦР	
5. Анализ данных **Анализ кривых роста в испытуемых образцах, контрольных пробах и стандартах количественного определения**	Кривые роста концентрации НК  Калибровочная кривая 

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Универсальный протокол для устройств, поддерживающих детекцию FAM/ROX флуоресценции

Описанные примеры приведены для Real-Time PCR системы RotorGene и BioRad CFX96™ **(таблица 5).**

Важно! *Включайте в состав проб, по крайней мере, один положительный контроль НК PVB19, отрицательный контроль Вода для ПЦР-исследований, а также контроли контаминации реагентов, содержащие вместо исследуемых образцов воду для PCR-исследований.* Контрольный образец входит в состав данного набора. Отрицательные контроли и контроли контаминации, в которых произошла амплификация, указывают на контаминацию проб экзогенным генетическим материалом. В этом случае необходимо повторить РТ-ПЦР, используя свежеприготовленные реагенты, и образцы необходимо исследовать как минимум два (лучше – три) раза подряд.

Таблица 5: Подготовка амплификационной смеси и контролей

Этап работы	Замечания и комментарии
Проведение ПЦР	
1. *Приготовление 25× концентрата смеси реагентов из лиофилизированного PVB19-олигонуклеотидного микста.* Центрифугируйте пробирки с олиго микстом на центрифуге-вортекс перед тем, как их открыть, чтобы порошок лиофилизированных олигонуклеотидов гарантированно переместился со стенок пробирок на дно и не разлетелся при открывании пробирки. Добавьте 35 мкл очищенной воды во флакон, содержащий лиофилизированный олиго микст. Закройте флакон и перемешайте на вортексе в течение 3 секунд, затем центрифугируйте в течение 5 секунд на центрифуге-вортекс.	Растворённая смесь реагентов может храниться при +2-8°С в защищённом от света месте в течение минимум 3 месяцев (не замораживать!).
2. Приготовление рабочего раствора основной реагентной смеси (**Таблица 6**). Подсчёт общего количества проб, подвергаемых ПЦР (испытуемые пробы + все контрольные образцы). Перемешайте подготовленную смесь на вортексе в течение 3 секунд, затем центрифугируйте в течение 5 секунд на центрифуге-вортекс.	Мы рекомендуем добавлять в расчёт 1-2 дополнительных пробы, чтобы компенсировать неточности при дозировании и потери при пипетировании.
Приготовление стандартов	
3. Разморозить стандарты количественного определения до комнатной температуры. Встряхните и центрифугируйте на центрифуге-вортекс.	При работе с испытуемыми образцами и стандартными пробами всегда одевайте перчатки.
4. Добавьте 20 мкл очищенной воды для ПЦР в пробирки со стандартами, инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре, встряхните на вортексе, потом центрифугируйте, чтобы жидкость опустилась на дно пробирок.	Обращайте внимание на правильное расположение стандартов. Наибольшее количество НК содержится в пробирке №1 (маркировка на верхней поверхности стрипа), наименьшее количество – в пробирке №5. (**Таблица 7**)
5. Для качественного обнаружения фрагментов генома PVB19 используйте в качестве положительного контроля	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Стандарт №3	

Продолжение таблицы 5

Этап работы	Замечания и комментарии
6. Приготовьте пробирки в количестве, достаточном для амплификации контролей (ОКО, К+, К-) и испытуемых образцов, поместите их в охлаждаемый штатив.	⚠ При работе с образцами и стандартами всегда одевайте перчатки.
7. Добавьте 15 мкл рабочего раствора основной реагентной смеси (**см. табл. 5**) во все пробы.	
8. Перенесите по 10 мкл воды для PCR-исследований в пробирки с отрицательными контролями, не содержащими образцов (т.н. *контроли контаминации – К-*) и 10 мкл стандарта каждой концентрации в пробирку со стандартом.	⚠ Итоговый объём реакционной смеси не должен превышать 25 мкл.
9. Добавьте 10 мкл проб в соответствующие пробирки с испытуемыми образцами.	⚠ Итоговый объём реакционной смеси не должен превышать 25 мкл.
10. Закройте пробирки с пробами соответствующими крышечками, стрипами крышечек либо оптической плёнкой.	
11. Сбросьте жидкость на дно пробирок центрифугированием на центрифуге-вортекс в течение 5 секунд.	
12. Аккуратно поместите подготовленные пробирки в термоциклер, закройте крышку.	

Таблица 6: Перечень и объёмы реагентов для приготовления рабочего раствора основной реагентной смеси. Готовую смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки на центрифуге-вортекс.

Реагент	мкл в 1 пробе	Окончательная концентрация
Вода для PCR-исследований	11.1	-
10х Буферная смесь2	2.5	1х, 5 mM магния хлорида
PVB19-олигонуклеотидный микст	1.0	1х
Taq-полимераза (5 U/µl)	0.4	2.0 U на 1 реакцию

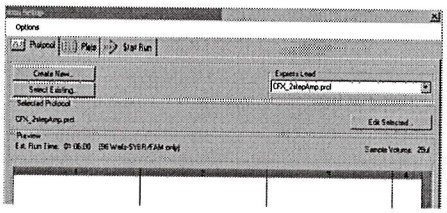
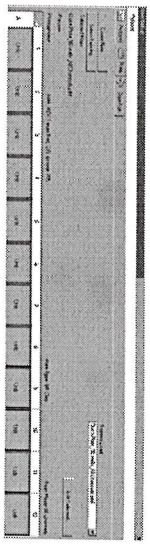
Таблица 7: Содержание синтетической НК в стандартах для количественного анализа (копий в пробирке / моль в пробирке)

Контрольная пробирка №	Стандартная концентрация PVB19 (копий/пробу)
1	1,000,000
2	10,000
3	1,000
4	50
5	10

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

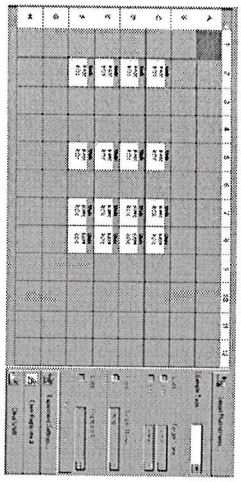
Для проведения амплификации фрагментов генома **PVB19** и регистрации детекции флюоресцентного сигнала необходимо проводить настройку оборудования согласно **таблице 8.**

Таблица 8: Настройка оборудования и проведения амплификации

BIO RAD CFX 96	
13. Запустите настройку протокола ПЦР: a. Включите инструмент нажатием на кнопку питания, затем запустите программу CFX Manager. b. Для создания нового протокола выберите «Create New» («создать новый»): откроется редактор протоколов; в противном случае выберите «Select Existing» («выбрать существующий»): запустится файловый менеджер, где можно будет выбрать для использования или редактирования существующий файл протокола. Можно также использовать выпадающее меню «Express Load» («экспресс-загрузка»).	 ⚠ Если вы используете ПЦР-оборудование, отличающееся от описываемого, строго следуйте рекомендациям производителя, принимая во внимание отличия в настройках своего инструмента.
c. Редактор протокола Создайте новый протокол или запустите существующий. Выберите любой этап протокола на графическом либо текстовом экране. Нажмите «Add plate read to Step» («добавить к этапу считывание с планшеты»), чтобы задать момент считывания данных флуоресценции. Задайте момент считывания данных с планшеты **на этапе отжига/ элонгации** при 59°C. Кликните на количество повторов (этап «GOTO»), установите количество циклов в петле равным 45.	
14. Перейдите на вкладку «Setup Plate» («настройка планшеты»). a. Нажмите «Create New» («создать новый»), чтобы открыть редактор планшет и создать новую схему эксперимента. Иначе, кликните на «Select Existing» («выбрать существующий»), чтобы запустить файловый менеджер и выбрать существующий файл со схемой эксперимента для использования или редактирования. b. Используя выпадающее меню «Express Load» («экспресс-загрузка»), выберите файл по умолчанию «QuickPlate_96wells_AllChannels.pltd». c. Перейдите на вкладку «Start Run» («запустить»), чтобы запустить ПЦР с имеющейся схемой эксперимента.	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15. Редактор планшет: используется для создания новой схемы эксперимента или редактирования существующей.
   a. Используя панель инструментов редактора планшет, укажите режим сбора данных, который планируете использовать.
   b. Кликните на кнопку «Select Fluorophores» («выбор флюорохромов») и укажите, что в данном эксперименте нужно использовать FAM и ROX.
   c. На схеме планшеты укажите используемые ячейки.
   d. выберите в выпадающем меню «Sample Type» («тип проб»).
   e. Установите необходимый флажок (или несколько), чтобы задать красители, соответствующие выбранным ячейкам.
   f. Впечатайте в каждую ячейку название соответствующей пробы, нажмите «Enter».



Rotor-Gene

16. Для создания шаблона следует выбрать в окне ***Новый тест (New Run)*** режим ***Детальный мастер (Advanced)***. Выбрать любой шаблон (например, ***Двухшаговый цикл (Dual Labeled Probe***)) для редактирования и нажать кнопку ***Новый (New)***.

a. В следующем окне выбрать тип ротора: ***36-луночный ротор (36-Well Rotor)***, установить галочку в строке *Кольцо* ***закреплено (No Domed Tubes / Locking Ring Attached.)***

b. В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси равный **25** ***(µL)*** в строке ***Объем реакции (Reaction Volume) (µL)***.

c. Установить галочку в боксе в строке ***15 µL с добав. воска (15 µL oil layer volume)***, если нужно активировать эту опцию.

d. В окне ***Редактор профиля (Edit Profile)*** следует задать программу согласно **таблице 6**.

e. Измерение флуоресценции по каналам FAM (*Зеленый/ Green*) и ROX/ JOE (*Оранжевый /Orange*) проводят при 59°C

f. Задав программу амплификации и детекции, нажать кнопку ***OK***.

g. Задать автоматическую калибровку для выбора параметра *Уровень сигнала* ***(gain)***. Для этого в окне ***Установки каналов (Channel Setup)*** нажать кнопку ***Опт.уровня сигн. (Calibrate/Gain Optimisation)***. В открывшемся окне ***Авто-оптимизация уровня сигнала (Auto Gain Calibration Setup)*** нажать кнопку ***Опт. Детек-мых (Calibrate Acquiring/Optimize Acquiring)***. В строке ***Нужный диапазон стартового сигнала*** для канала *FAM/Green* нужно указать минимальный сигнал ***(Min Reading)*** - **5**, а максимальный сигнал ***(Max Reading)*** - **10**. Для каналов *JOE/Yellow, ROX/Orange,* Cy5/*Red* и *Cy5.5/Crimson* нужно указать минимальный сигнал***(Min Reading)*** - **5**, а максимальный сигнал***(Max Reading)*** - **10**. В графе ***Позиция пробирки Tube position*** должен быть указан номер пробирки - **1**, по сигналу которой будет автоматически выбран параметр ***Уровень сигнала*** (***gain***). Пометить галочкой бокс в строке ***Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции (Perform Optimisation Before 1-st Acquisition)***. Закрыть окно ***Авто-оптимизация уровня сигнала (Auto Gain Calibration Setup)***.

h. Перейти в следующее окно. Сохранить запрограммированный шаблон выполнения теста. Для этого нажать кнопку ***Сохр.шаблон (Save Template)***. Задать имя для файла шаблона, соответствующее заданной в нем программе. Сохранить файл в предлагаемую папку: ***Templates|Quick Start Templates***; закрыть окно ***Мастер Нового Теста (New Run Wizard)***. После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне ***Новый тест (New Run)***.

i. Проведение амплификации и детекции с использованием готового шаблона

j. Установить пробирки в ротор. При этом в первой позиции должна быть установлена одна из подготовленных для анализа пробирок с реакционной смесью. Установить фиксирующее кольцо, прикрепить ротор, совместив отверстие для фиксатора с фиксатором, закрыть крышку прибора.

k. Для запуска с использованием готового шаблона выбрать в меню ***Новый (New Run)***, вверху окна ***Новый тест(New Run Wizard)*** выбрать вкладку ***Детальный мастер (Advanced)***, затем в списке шаблонов в этом окне выбрать нужный шаблон с программой амплификации и детекции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

l. В окне выбора ротора выбрать тип ротора: ***36-луночный ротор(36-Well Rotor)*** или ***72-луночный ротор(72-Well Rotor)***. Поставить галочку в боксе ***Кольцо закреплено (No Domed Tubes / Locking Ring Attached).*** Перейти в следующее окно, нажав кнопку ***Далее.***

m. В следующем окне нужно проверить, что указан объем реакционной смеси *Объем реакции* равный **25** и в боксе ***15 µL с добав. Воска(15 µL oil layer volume)*** *не* установлена галочка, активирующая эту опцию. Перейти в следующее окно, нажав кнопку ***Далее.***

n. В последнем перед стартом окне запустить выполнение программы прибором с помощью кнопки ***Старт (Start)*** в нижней части окна. При этом ротор должен быть уже прикреплен и крышка прибора закрыта. Задать имя файла, в котором будут сохранены результаты, и нажать кнопку ***Сохранить (Save)***.

o. После окончания выполнения программы амплификации приступить к учету результатов.

17. **Анализ результатов, полученных при использовании приборов Rotor-Gene 3000/6000 и Rotor-Gene Q**

a. Выбрать в главном меню значок меню **Анализ (Analysis)**, в ниспадающем меню выбрать вкладку Количественный (**Quantitation**). Выполнить операцию для данных канала **FAM/Green**, выбрав в поле «Cycling A Green» (**Cycling A FAM/Cycling A Green**), затем для данных канала ROX/Orange, выбрав в поле «Cycling A Orange» (**Cycling A ROX/Cycling A Orange**).

b. Анализ результатов амплификации ДНК ВКО, регистрируемых по каналу **ROX/Orange**.

c. Выбрать окно нормализованных графиков флуоресценции по каналу ROX/Orange. В меню над графиками должна быть включена кнопка **Динамич.фон** (**Dynamic Tube**) (включена по умолчанию). Включить кнопку Устранение выбросов (**More Settings/Outlier Removal**) и ввести в текстовом поле значение 5 (5 %). Задать уровень пороговой линии - в меню Вычисление Ct (CT Calculation) ввести в текстовом поле Порог (Threshold) значение 0,01-0,04. В таблице результатов по каналу ROX/Orange будут указаны значения порогового цикла Ct для каждой пробы (окно Количественные результаты – Cycling A. Orange (Quant. Results – Cycling A. ROX/Quant. Results – Cycling A. Orange) под окном графиков).

d. Анализ результатов амплификации фрагмента ДНК **PVB19**, регистрируемых по каналу **FAM/Green**.

e. Выбрать окно нормализованных графиков флуоресценции по каналу **FAM/Green**. В меню над графиками должна быть включена кнопка Динамич. фон(Dynamic Tube) (включена по умолчанию). Нажать кнопку Устранение выбросов(More Settings/Outlier Removal) и ввести в текстовом поле значение 5 (5 %). Задать уровень пороговой линии: в меню Вычисление Ct(CT Calculation) ввести в текстовом поле Порог значение 0,01-0,04. В таблице результатов по каналу FAM/Green будут указаны значения порогового цикла Ct для каждой пробы (окно Количественные результаты – Cycling A. Green (**Quant. Results – Cycling A FAM/Quant. Results – Cycling A. Green**) под окном графиков).

Программы амплификации фрагментов генома PVB19 для всех вышеперечисленных термоциклеров представлены в таблице 9.

Таблица 9: Условия амплификации для количественного определения *PVB19 (универсальная для всех термоциклеров, кроме ROTOR-GENE)*

Этап	Температура	Время	Число повторов
Активация Taq-полимеразы	95°C	4:00 мин	1
Плавление (денатурация)	95°C	0:30 мин	45
Отжиг/элонгация/детекция флуоресцентного сигнала (FAM/ROX)	59°C	1:00 мин	

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. Анализ данных

Каждый цикл амплификации НК приводит к генерации флуоресцентного сигнала, измеряемого в «Зелёном» (**FAM**) канале для **мишени**, что приводит к формированию сигмовидной кривой роста (в логарифмической шкале). Следует выполнять анализ данных в соответствии с рекомендациями производителя оборудования (см., например, руководство по использованию термоциклера Rotor-Gene 6000/Q или CFX96™ Real Time PCR Detection System, Bio-Rad) с использованием соответствующего программного обеспечения и учитывая рекомендации, приведённые в **Таблице 10** (а также нижеследующие замечания). Определение *PVB19* в испытуемых пробах основано на значениях C_T *(порогового цикла)* кривых роста, полученных при амплификации испытуемых образцов с учетом калибровочной кривой.

⚠ *В случае появления сомнительных положительных результатов возможна контаминация инструментов и рабочего места – следует провести деконтаминационные мероприятия в лаборатории.*

⚠ *Установленный пороговый уровень детекции может существенно повлиять на значения C_T. Устанавливайте величины пороговых уровней в соответствии с рекомендациями из* ***таблицы 10****.*

Таблица 10: Настройка канала детекции, а также других параметров оборудования

РТ-ПЦР-термоциклер	**Канал детекции**	**Прочие параметры оборудования**
Rotor-Gene™ 3000/6000, Rotor-Gene™ Q (Qiagen)	Green/ Orange	Rotor-Gene 3000: Dynamic tube: Yes Slope correction: Yes Ignore first: 4 No template control threshold: 5% Perform Calibration/Optimisation Before 1th Acquisition – Min Reading 5FI – Max Reading 10FI Threshold modus: manual PVB19: 0.01-0.04, на экспоненциальной части амплификационной кривой, выше фоновых значений, стремясь к минимальному значению
CFX96TM; iCycler IQ™; IQ5, MiniOpticon™, CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	FAM/ROX	CFX96: необходимо вручную установить пороговое значение в 100-300 относительных единиц флуоресценции (RFU).
SmartCycler II® (Cepheid)	FAM/ROX	Выбрать FTTC25 в свойствах каналов
Mx3000P, Mx3005P (Agilent/Stratagene)	FAM/ROX	Проверьте, чтобы не был установлен референсный краситель
LightCycler® 480II, LightCycler® 96 (Roche)	FAM/ROX	нет
Mastercycler® ep realplex (Eppendorf)	FAM/ROX	нет

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Решение проблем

При проведении исследования могут возникать ошибки, устранение которых необходимо проводить согласно **таблицы 11.**

Таблица 11: Возможные причины ошибок и как их устранить

Проблема	Возможная причина проблемы	Решение
Проблемы, связанные с подготовкой образцов		
Недостаточная степень чистоты экстрагированной НК или синтезированной НК	Контаминация образцов РНК/ДНК солями белков, углеводами и прочей органикой, ингибирующей ПЦР	Избегать методов фенольной и/или других методов экстракции, использовать только прилагаемый набор для экстракции нуклеиновых кислот.
Проблемы, связанные с пипетированием		
Получен флуоресцентный сигнал из проб, не содержащих *PVB19*, и/или из контролей контаминации реагентов	Контаминация негативных проб ампликонами *PVB19*	Повторить экстракцию и/или ПЦР с новыми реагентами; провести деконтаминацию инструментов и рабочего места.
Итоговый объём реакционной смеси отличается от 25 мкл	Ошибки пипетирования, например, пропуск либо повторная заливка ячеек	Используйте мультиканальные пипетки, автоматизированное пипетирование, либо развивайте внимание и концентрацию.
Проблемы, связанные с амплификацией		
Необычно большие значения C_T стандарта и/или завышенная концентрация НК *PVB19* в испытуемых образцах	Неверный протокол амплификации	Проверьте настройки оборудования, следуйте инструкциям из руководства по пользованию прибором.
	Нарушение условий и/или сроков хранения реагентов	Проверьте условия хранения и срок годности.
	Распад определяемой НК	Используйте расходные материалы и реагенты, не содержащие нуклеаз; немедленно после синтеза помещайте образцы НК на лёд.
Не сигмовидная форма кривых роста стандартов концентрации и испытуемых образцов	Частое размораживание/ оттаивание либо неправильное хранение смеси растворённых реагентов	Прочтите инструкцию, проверьте условия хранения, приготовьте свежую реагентную смесь.
	Условия хранения не соответствуют рекомендуемым, истёк срок хранения набора	Проверьте условия хранения и срок годности.
Отсутствует флуоресцентный сигнал	Измерение флуоресцентного сигнала отключено; камера неправильно установлена	Проверьте настройки оборудования.
	Выбран неправильный канал записи флуоресцентного сигнала	Для определения НК *PVB19* выберите канал FAM. Для внутреннего контроля выберите канал ROX
	Неверный протокол амплификации	Проверьте настройки оборудования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	Нарушение условий и/или сроков хранения набора	Проверьте условия хранения и срок годности.

Продолжение таблицы 11

Различный вид амплификации НК *PVB19* в испытуемых образцах, непараллельный рост кривых в экспоненциальной фазе реакции	Избыток ингибиторов ПЦР в пробе	Используйте рекомендованный набор для экстракции, точно следуйте инструкциям производителя. Разведение НК перед анализом может снизить содержание ингибиторов в образце (см. протокол, этап 7).
	Неправильно собранный материал (н-р, гепаринизированная кровь)	Используйте правильно собранные образцы.
Регистрируется низкий уровень флуоресцентного сигнала в ходе амплификации определяемой НК	Загрязнение оптических линз	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера; если позволяет конструкция – раз в месяц протирать линзы, используя абсолютный этиловый спирт и ватные палочки.
	Загрязнение системы охлаждения и/или матицы оптического сенсора	См. раздел «уход» инструкции по использованию соответствующего термоциклера; можно также заполнить каждую ячейку сенсора изопропанолом, инкубировать 10 минут при 50°С, удалить изопропанол и промыть бидистиллированной водой.
	Испарение из ячейки в ходе ПЦР	Крышки планшет, пробирок, стрипов должны быть герметичны.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru