ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для выявления ДНК
вируса простого герпеса 1 и 2 типов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«ROSSAmed Herpes Simplex Virus ½»

Назначение и характеристика
Набор реагентов «ROSSAmed Herpes Simplex Virus ½» предназначен для выявления ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов в биологическом материале: соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротовой полости, отделяемого пузырьковых высыпаний (везикул) и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек, цельной крови и ликворе, секрете простаты, эякуляте, первой порции утренней мочи, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
Комплектация набора «ROSSAmed Herpes Simplex Virus ½» рассчитана на проведение 100 реакций, включая контрольные образцы.

Таблица 1. Состав набора реагентов

Состав	Комплектация
1. Праймер микс	1 пробирка - 1,0 мл
2. ПЦР-реагент	1 пробирка - 1,0 мл
3. ПКО	1 пробирка - 0,2 мл
4. ОКО	1 пробирка - 1,0 мл
5. ВКО	1 пробирка - 1,0 мл

Меры предосторожности
К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.
Подготовку и проведение исследования с использованием набора реагентов следует выполнять в ПЦР-боксах.
Дозаторы, используемые при работе с набором, должны быть соответствующим образом проверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.
Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.
Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов.
При использовании набора в диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями.
Не использовать набор реагентов:
– при нарушении условий транспортировки и хранения;
– при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
– по истечении срока годности набора.

Оборудование и материалы
- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
- ламинарный бокс/ПЦР-бокс;
- центрифуга/вортекс типа MICROSPIN FV-2400;
- набор дозаторов переменного объема (до 10 мкл, до 200 мкл, до 1000 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема (10 мкл, 200 мкл, 1000 мкл);
- пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл;
- оптические пробирки или стрипы для ПЦР 0.2 мл;
- соответствующие штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

Проведение анализа
Выделение ДНК.
Выделение производится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения ДНК.
Рекомендуемый комплект для выделения ДНК из биологического материала - MagSorbNA, SilicSorbNA (производства компании ООО «ROSSA»).
! Добавить 10 мкл ВКО в каждую пробирку на этапе выделения в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения.

Подготовка ПЦР-смеси
1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, перемешать на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.
2. Приготовить и промаркировать необходимое количество пробирок по 0,2 мл. В каждую постановку

амплификации, помимо исследуемых образцов, должны входить контрольные образцы: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).
3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер-микс» по формуле:
10 ×(N+1) мкл ПЦР-реагента и 10 ×(N+1) мкл Праймер микс;
где N – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.
Перемешать «Мастер микс» на вортексе и осадить капли со стенок и крышек пробирок с помощью кратковременного центрифугирования.
4. Внести по **20 мкл Мастер-микса** в подготовленные пробирки для проведения ПЦР.
5. Добавить по **10 мкл ДНК** исследуемых образцов, в пробирку К- внести **10 мкл ОКО**, в пробирку К+ **10 мкл ПКО**, в пробирку ОКЭ внести **10 мкл ОКЭ.**
6. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации
1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам FAM, HEX	63	15 сек	
Элонгация	67	10 сек	

3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать расположение пробирок в амплификаторе, запустить амплификацию и сохранить файл с результатами эксперимента.

Анализ результатов
! Результат амплификации **внутреннего контрольного образца** регистрируется по каналу **FAM**, результат амплификации **ДНК возбудителя** регистрируется по каналу флуоресценции **HEX**.
1. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору, установить «*Пороговый* Метод *(Ct)*», при необходимости установить значение параметра пороговой линии, выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня. Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).
2. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналу «HEX» (ДНК возбудителя)
ОКЭ*	+	-
К-**	-	-
К+	+	+

***В случае несоответствия контрольной точки ОКЭ необходимо провести повторное исследование всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
****В случае несоответствия контрольных точек К- необходимо провести повторное исследование всех образцов, начиная с этапа амплификации.

3. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов анализа

Результат образца	Значение «Ct» по каналу «FAM» (Внутренний контрольный образец)	Значение «Ct» по каналу «HEX» (ДНК возбудителя)
Положительный	+/-	+
Отрицательный	+	-
Не валидный*	-	-

«-» - значения «Ct» отсутствует, график амплификации не пересекает пороговую линию;
«+» - наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию;
«+/-» - значение «Ct» для данного канала не анализируется;
*В случае не валидного результата требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа взятия биологического материала.

Проблемы при работе и методы их устранения.

Проблема	Возможная причина	Варианты решения
Нет сигнала по всем каналам	Использование неподходящих расходных материалов	Используйте оптические пробирки для постановки ПЦР с прозрачными крышками, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора, либо адаптированные для используемого прибора
	ПЦР ингибирование	Разведите образец в 5 раз в воде, повторите анализ
		Повторить ПЦР-анализ, начиная с этапа взятия биологического материала.
Нет сигнала в К+	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	Аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	Установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2.
	Некорректные условия хранения наборов	Используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по каналу «HEX» в К- и/или ОКЭ	Контаминация	Проведите деконтаминационные процедуры

Транспортировка
Транспортировка набора реагентов осуществляется при температуре от 2 ℃ до 8 ℃, не более 3 суток, или при температуре 20 ℃ в течение суток. Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность наборов, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Хранение
Компоненты набора реагентов хранят в упаковке изготовителя при температуре от минус 24 ℃ до минус 16 ℃. Допускается заморозка/оттаивание компонентов не более 10 раз. Срок годности набора реагентов - 12 месяцев с даты изготовления, при соблюдении условий хранения набора реагентов.

Производитель

ООО «ROSSA», Узбекистан, г. Нурафшан, посёлок Дегантепа, улица Рохат дом 93 Tel.: +99870 202 60 60 •E-mail: info@rossa.uz

Служба поддержки клиентов: +99899 353 37 87

Дополнительные рекомендации к настройкам «Порога» при программировании наиболее распространённых амплификаторов в РУз при работе с наборами реагентов компании ООО «ROSSA».

Вид ПЦР-амплификатора	Стандартные параметры пороговой линии	Диапазоны ручного выставления параметров	Дополнительные настройки
ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ДНК-Технология)	Установить «Пороговый (Ct)» - 5% от флюоресценции ПКО на последнем цикле амплификации.	«Пороговый (Ct)» – 0-20%.	
CFX96 (Bio-Rad)	«Single Threshold» - 50.	«Single Threshold» - 25-500.	Активировать «Apply Fluorescence Drift Correction» и «Baseline Subtracted Curve fit».
Rotor Gene 3000, 6000 (Corbett Research) и Rotor-Gene Q (QIAGEN)	До амплификации включить функцию: «Perform Optimization Before 1st Acquisition. Для всех каналов установить параметры «Min Reading» – 5Fl и «Max Reading» – 10Fl. После амплификации установить «Threshold/Порог» – 0,02. «NTC threshold/Порог Фона» - 5%.	«Threshold/Порог» - 0,02-0,2 «NTC threshold/Порог Фона» – 0-30%	Активировать «Dynamic tube/Динамич.фон» и «Slope Correct/Кор-рек. Уклона».
qTOWER (Analytik Jena)	«Threshold» – 5	«Threshold» 5-20	