



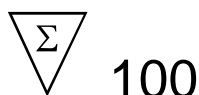
ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

AVT-PML/RARA

НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЗЛИТОГО ТРАНСКРИПТУ PML/RARA



REF AVT-045



ТОВ «АСТРАВІР ТЕКНОЛОДЖІ»
61022, Україна, м. Харків,
вул. Полтавський шлях 6, оф.25
+380990325214
info@astravirtech.com.ua
www.astravirtech.com.ua

Редакція 1 від 10.12.2020 р.

1. Призначення

Цей набір призначено для клінічної ПЛР-діагностики злитого транскрипту PML/RAR α t(15;17) (q24;q21). Набір дозволяє проводити *in vitro* детекцію послідовностей, характерних для хворих на гостру промієлоцитарну лейкемію, у зразках кісткового мозку або клітин периферійної крові пацієнта. Сфера використання реagentного набору включає *in vitro* діагностику (IVD), епідеміологічний скринінг і науково-дослідні роботи.

2. Принцип аналізу

Виявлення РНК злитого транскрипту здійснюється шляхом постановки однокрокової RT-ПЛР зі зворотною транскрипцією. З цією метою до набору включені ревертаза вірусу мишачої лейкемії M-MLV і термостійка ДНК-полімераза Taq. Валідність отриманих результатів забезпечується наявністю внутрішнього контролю (IC) та позитивного контрольного зразка (PC).

3. Специфікації

Склад: 100 реакцій / набір

Чутливість: 96.5%

Специфічність: 98.0 %

Нижня межа аналітичної чутливості: 10 копій / реакцію

Час ампліфікації / повного проходження процедури: 1 год. 15 хв. / 2 год. 25 хв.

4. Склад набору

Назва реагенту	Наклейка на пробірці	Об'єм	Примітка
ПЛР Мастер Мікс	5X червона	400 μ l	Базовий розчин для проведення ПЛР, містить суміш дНТФ, Mg ²⁺ і т.д.
Суміш праймерів	жовта	400 μ l	Містить праймери, специфічні до цільових послідовностей
Внутрішній контроль (IC)	IC біла	400 μ l	Дозволяє контролювати якість екстракції та ампліфікації ДНК
Позитивний контрольний зразок (PC)	PC чорна	100 μ l	Слугує для загального контролю постановки
TE буферний розчин	TE біла	500 μ l	Ультра-чистий, вільний від нуклеаз розчин
Суміш ензимів	EN зелена	100 μ l	Містить ДНК-полімеразу Taq та ревертазу M-MLV

5. Запобіжні заходи

Всі реагенти, що входять до складу набору, призначені для діагностики «in vitro».

Робота повинна проводитися в лабораторії, що виконує молекулярно-біологічні (ПЛР) дослідження клінічного матеріалу на наявність збудників інфекційних хвороб, з дотриманням державних санітарних норм і правил ДСП №9.9.5-080-2003 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю», ДСанПіН 9.9.5-153–2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

При роботі завжди слід виконувати наступні загальні вимоги:

- Розглядати всі досліджувані зразки як інфекційно-небезпечні.
- Прибирати і дезінфікувати розлиті зразки або реактиви, використовуючи відповідні дезінфікуючі засоби.
- Лабораторний процес має проводитись в одному напрямку (виділення → детекція). Аналіз проводиться в окремих приміщеннях (зонах). Роботу слід починати в Зоні Виділення, продовжувати в Зоні Ампліфікації і Детекції. Не повертати зразки, устаткування і реактиви в зону, в якій була проведена попередня стадія процесу.



УВАГА! При видаленні відходів після ампліфікації (пробірок, що містять продукти ПЛР) неприпустимо відкривання пробірок і розбризування вмісту, оскільки це може привести до контамінації продуктами ПЛР лабораторної зони, устаткування і реагентів.

- Застосовувати набір суворо за призначенням, згідно цієї інструкції.
- Допускати до роботи з набором тільки спеціально навчений персонал.
- Не використовувати набір після закінчення терміну придатності.
- Використовувати всі необхідні ЗІЗ.
- Уникати контакту реагентів даного набору зі шкірою, очима і слизовими оболонками. При контакті негайно промити уражене місце водою і звернутися за медичною допомогою.

6. Матеріали та обладнання, необхідні для використання набору

- RT-термоциклер (планшетний, напр. Bio-Rad CFX-96; роторний, напр. Rotor-Gene 6000; їхні аналоги).
- Центрифуга з прискоренням не менше 13,000 g.
- Вортекс будь-якої моделі.
- ПЛР бокс з УФ-лампю.
- Рукавички одноразові без тальку (латексні або нітрилові).
- Дозатори на 1-20, 20-200 і 200-1000 μ L .
- Стерильні наконечники з фільтрами на 20, 200 і 1000 μ L.
- Мікроцентрифужні пробірки 1,5 mL.

- Мікропробірки з прозорими кришками 0,2 mL.
- Транспортне середовище для протекції ДНК/РНК.
- Набір для виділення нуклеїнових кислот (на сорбенті або афінних мембранах).

7. Вимоги до забору зразків та пробопідготовки

7.1. Клінічний матеріал. Отримання зразків з організму пацієнта проводиться згідно Методичних рекомендацій «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції» МОЗ України, (Наказ МОЗ №662 від 30.07.2013, див. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0662282-13/card2#Card>).

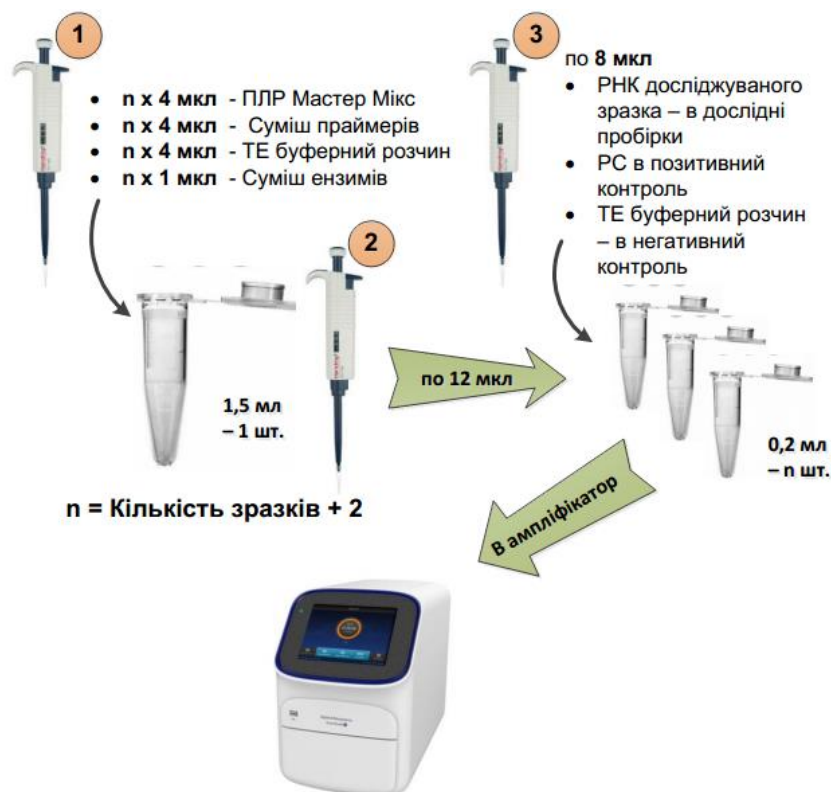
Після забору біологічний матеріал має зберігатися за температури, вказаної в Методичних рекомендаціях МОЗ щодо цього типу клінічного матеріалу, у стерильному й ретельно закритому лабораторному посуді. Транспортування клінічного зразка має проводитись у **лізуючому транспортному середовищі**.

7.2. Екстракція РНК. Процедуру лізису біологічного зразка, виділення з нього тотальної РНК та її очистки проводять за допомогою відповідних комерційних наборів реагентів. В усі зразки, **окрім негативного контролю (NC)**, одразу після відбору матеріалу для процедури виділення РНК повинно бути внесено по **4 μ L внутрішнього контролю (IC)**. Після цього кожен пробірник слід ретельно перемішати на вортексі й відцентрифугувати впродовж **2-3 сек.**



ПРИМІТКА. Додавання IC у зразок є необхідним кроком в тому разі, якщо немає гарантії якісного забору власного клітинного матеріалу пацієнта.

8. Підготовка до проведення RT-ПЛР.



УВАГА! Внесення ТЕ буфера в пробірку з негативним контролем є обов'язковою умовою коректної роботи NC.

а) Повільно, за кімнатної температури (18-23° C) розморозити реагенти набору і розчин РНК з клінічних зразків. Перемішати вміст кожної мікроцентрифужної пробірки на вортексі та відцентрифугувати протягом 2-3 с для усунення крапель і бульбашок.

б) Встановити у штативі в попередньо стерилізованому ПЛР боксі порожні пробірки:

- **1 шт.** об'ємом **1.5 mL** – для приготування загального стоку реакційної суміші.
- **n** мікроцентрифужних пробірок об'ємом **0.2 mL** з прозорими кришками – для подальшого завантаження у термоциклер, де n – кількість лунок, які будуть зайняті в термоциклері, тобто: загальна кількість зразків, а також 2 додаткові пробірки, призначені для негативного контролю (NC) та позитивного контролю (PC).



УВАГА! Для завантаження в термоциклер **iCycler iQ5** BioRad рекомендується використовувати мікропробірки з білого непрозорого пластику з прозорими кришками, а для завантаження в інші термоциклери – з прозорого пластику.

в) Розрахувати необхідний об'єм реакційної суміші, виходячи з того, що для проведення 1 реакції потрібно взяти **4 μL розчину з праймерами, 4 μL суміші Мастер Мікс, 4 μL ТЕ буферу і 1 μL суміші ензимів**, враховуючи загальну кількість клінічних зразків, 1 позитивний контроль (PC) і 1 негативний контроль (NC). Виготовити загальний сток реакційної суміші згідно з цим прописом, ретельно перемішати його на вортексі й відцентрифугувати впродовж **2-3 сек** для усунення крапель і бульбашок.

г) Розподілити реакційну суміш порціями по **12 μL** по підготовлених раніше пробірках об'ємом **0.2 mL**. Промаркувати, **не затуляючи написом прозорої кришки** (напр. на згинах кришок).



ПРИМІТКА. Об'єм суміші, яка переноситься у тестову пробірку (**12 μL**), є меншим за сумарний об'єм окремих компонентів, які змішуються в стоковій пробірці (**по 13 μL на реакцію**). Це зроблено для того, аби компенсувати можливі втрати реагентів внаслідок похибок дозаторів, впливу поверхневого натягу і т.д.

д) Внести у пробірки об'ємом **0.2 mL** по **8 μL розчину очищеної РНК** з клінічних зразків після екстракції. В дві окремі пробірки, залишені під контролі постановки, внести **8 μL позитивного контрольного зразка (PC)** і **8 μL ультрачистого ТЕ буферу** в якості негативного контролю (NC).



УВАГА! Робота з РНК має проводитися швидко для уникнення її деградації.

е) Встановити пробірки в лунки термоциклера. Закрити кришку приладу.

9. Налаштування термоциклера.

9.1. Загальний протокол ампліфікації. При використанні будь-якої моделі термоциклера слід дотримуватися наступного температурного режиму при проведенні зворотної транскрипції / ампліфікації цільових фрагментів кДНК:

Стадія 1 (зворотня транскрипція): **50° C** впродовж **8:30 хв.**

Стадія 2 («гарячий старт» ДНК-полімерази): **95° C** впродовж **12 хв.**

Стадія 3 (ампліфікація цільової послідовності), **45 циклів:**

Крок 1: **95° C** впродовж **10 сек.**

Крок 2: **60° C** впродовж **10 сек** (*детекція відбувається на цьому етапі*).

Крок 3: **72° C** впродовж **20 сек.**



Детекція флуоресцентного сигналу відбувається за температури **60° C** за двома каналами, зокрема:

- за каналом **FAM** виявляють специфічні послідовності транслокації PML/RAR α ;
- за каналом **Sy5** – внутрішній контроль.

Детальні інструкції щодо налаштування обладнання від різних виробників під наведений вище протокол описано далі.

9.2. Налаштування устаткування Bio-Rad CFX-96.

а) Після увімкнення приладу запустити програму «**CFX Manager**»

б) Натиснути кнопку «**Create a new run**».

в) У вікні, що відкрилося, вибрати вкладку «**Protocol**» і натиснути «**Create new**». Відкриється вікно «**Protocol Editor**», у якому необхідно задати об'єм реакційної суміші (**Sample volume**) як **20 µL** і прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 7.1.



ПРИМІТКА. У випадку, якщо обладнання вже використовувалося з цією реагентною системою, слід перейти за директорією **File > Repeat an Experiment** і вибрати файл останньої постановки.

г) Перейти на вкладку «**Plate**» й натиснути кнопку «**Create New**». Відкриється вікно «**Plate Editor**», де необхідно в полі «**Load**» обрати канали детекції флуоресцентного сигналу **FAM**, **HEX** та **Cy5**, а також внести у відповідні лунки номери і/або назви зразків, в т.ч. контрольних.

д) Натиснути кнопку **OK**, зберегти файл і запустити процес ампліфікації.

9.3. Налаштування устаткування Corbett Rotor-Gene 6000.

а) У основному меню програми натиснути кнопку «**New**», після чого обрати шаблон «**Advanced**», виділити **Dual Labeled Probe / Hydrolysis Probes (TaqMan)** і натиснути кнопку «**New**».

б) У вікні, що відкрилося, вибрати використовуваний ротор (на 36 / 72 лунки), натиснути кнопку «**Next**».

в) У вікні, що відкрилося, вибрати чи завдати оператора, вказати об'єм реакційної суміші (**Sample volume**) як **20 µL**, натиснути кнопку «**Next**».

г) У вікні, що відкрилося, прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 9.1.

д) У розділі «**Channel Setup**» натиснути кнопку **Gain Optimization**, обрати канали **Green** (відп. FAM), **Yellow** (відп. HEX) та **Red** (відп. Cy5), призначити для них калібрування перед першим вимірюванням (кнопка «**Perform Calibration Before 1st Acquisition / Perform Optimisation Before 1st Acquisition**»). Натиснути кнопку «**Close**», а після цього – кнопку «**Next**».

е) Запустити ампліфікацію кнопкою «**Start run**», зберегти файл експерименту на диску, заповнити таблицю зразків.

9.4. Налаштування устаткування ABI Prism 7500.

а) Відкрити вікно «**Settings**», пов'язати виставлені в приладі зразки із відповідними категоріями в програмному забезпеченні.

б) Виставити канали детекції **FAM**, **HEX** та **Cy5** у полях **«Reporter»**, поля **«Quencher»** можна лишити незаповненими або прописати **BHQ**. Поле **«Passive reference»** лишити незаповненим.

в) Відкрити вікно **«Instrument»** і прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 7.1.

г) Зберегти файл на диску й запустити процес ампліфікації.

9.5. Налаштування устаткування BioRad IQ-5.

а) Ввімкнути прилад, запустити програму **iCycler iQ5**.



УВАГА! Перед початком роботи прилад має бути прогрітий не менше **15 хв.**

б) Увійти в режим створення нового протоколу ампліфікації за допомогою кнопки **«Create new»** в модулі **«Workshop»**.

в) У вікні, що відкрилося, задати параметри ампліфікації.



УВАГА! Критичною особливістю роботи цієї реагентної системи з приладом IQ-5 є **подовжений період детекції сигналу** (Стадія 3, Крок 2) під час гібридизації праймерів за температури 58° С. На відміну від інших моделей термоциклерів, на цьому устаткуванні даний етап має тривати не 10 сек, а **25 сек**. У протилежному випадку збір даних не відбудеться.

г) Створити новий планшет зразків (**«Plate Setup»**). Задати схему розташування пробірок в планшеті.

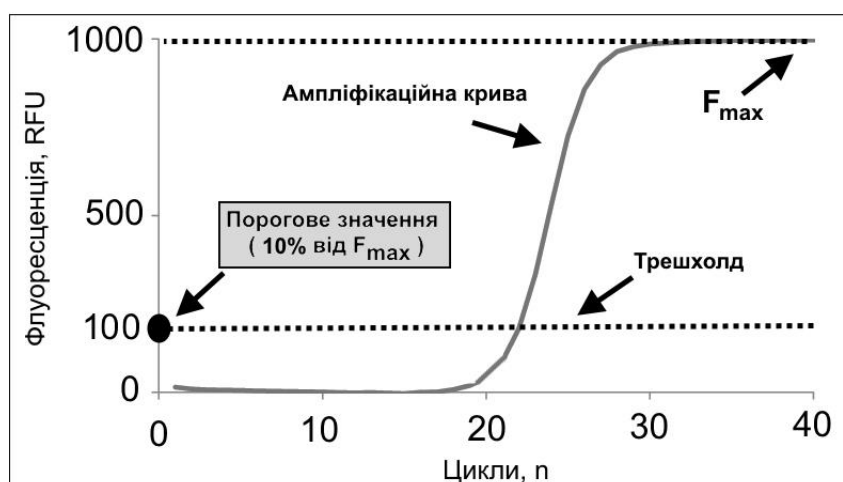
д) У вікні, що відкрилося, всі клінічні зразки позначити як **«Unknown»**, для всіх зразків задати вимір флюоресценції по каналах **FAM/Green** та **Cy5/Red**.

е) Задати об'єм реакційної суміші (**«Sample Volume»**) як **20 мкл**, тип кришок (**«Seal Type»**), тип пробірок (**«Vessel Type»**). Ампліфікацію необхідно проводити з використанням такого ж типу пластику, в якому проводилося калібрування приладу. Зберегти схему планшета.

є) Запустити термоциклер у роботу за допомогою кнопки **«Run»**. У вікні, що відкрилося, зазначити **«Use Persistent Well Factors»**, натиснути кнопку **«Begin Run»** і зберегти експеримент.

10. Інтерпретація результатів

10.1. Визначення трешхолда. Процедура аналізу даних, отриманих за допомогою цієї діагностичної системи, передбачає визначення порогового значення флуоресценції (**threshold**), спираючись на максимальне значення флуоресценції (F_{max}), яке спостерігається на фазі плато ампліфікаційної кривої **для позитивного контрольного зразка**.



Зокрема, трешхолд має бути заданий як **10% від чисельного значення F_{max} у РС** для всієї відповідної постановки, але окремо по кожному з каналів детекції **FAM** і **Sy5**. Значення трешхолда має бути розраховане за допомогою програмного забезпечення, яке використовується в лабораторії, згідно з інструкціями виробника.

10.2. Контроль постановки РТ-ПЛР. Перед початком аналізу основного масиву даних, отриманих в постановці, необхідно оцінити загальну якість її проведення по позитивному (РС) та негативному (NC) контрольним зразкам. Значення C_t , які свідчать про валідність отриманих результатів, мають бути наступними:

	FAM	Sy5
РС	≤ 35	≤ 35
NC	Відсутній	Відсутній



УВАГА! Важливим критерієм якості проведення реакції також слугує S-подібна форма кривих ампліфікації. Ті криві, які не відповідають цьому критерію, мають бути визнані **невалідними**. Це стосується як контрольних, так і дослідних зразків.

10.3. Контроль проходження ампліфікації. Критерієм валідності даних, отриманих по кожному зразку, є наявність у ньому **амплікону внутрішнього контролю**, який детектується по каналу **Сy5**. Відсічне значення (cut-off value) C_t для ІС дорівнює **35 циклам**.



УВАГА! Якщо продукт, який детектується по каналу **Сy5**, відсутній або має **$C_t > 35$ циклів**, результат має бути визнаний невалідним і постановку з цим зразком необхідно повторити, починаючи з етапу виділення. Винятком є результат, коли по каналу **FAM** детектується висока копійність цільової РНК (див. нижче).

10.4. Аналіз даних від клінічних зразків. Інтерпретацію даних, отриманих за допомогою цієї реагентної системи, слід проводити згідно з відсічними значеннями C_t , наведеними у таблиці:



УВАГА! Результати ПЛР-аналізу є лише частиною даних, які слугують за основу для постановки остаточного діагнозу. Після їх отримання вони мають бути передані лікарю, який використовує їх разом з іншими клінічними даними для винесення комплексного висновку.

FAM	Сy5	Інтерпретація
≤ 40	Будь-які дані	Зразок позитивний , ІС може бути відсутній через високу копійність послідовності мішені
Відсутні або > 40	≤ 35	Зразок негативний
Відсутні або > 40	> 35	Результат невалідний , необхідне повторення процедури, починаючи з екстракції РНК

11. Транспортування і зберігання

Реагенти набору мають зберігатися та транспортуватись за температури **мінус 20±5°C**. Всі компоненти лишаються стабільними до закінчення терміну придатності, що складає **12 місяців** з дати виготовлення, в разі дотримання рекомендованих умов зберігання.



УВАГА! Для уникнення пошкодження ферментів, які входять до складу набору **категорично забороняється** транспортування та зберігання набору за температури **нижчої за мінус 25 °C**.




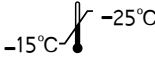






12. Технічна підтримка

У разі виникнення будь-яких технічних проблем при використанні набору звертайтеся до спеціалістів підприємства-виробника – компанії ТОВ «АСТРАВІР ТЕХНОЛОДЖІ».

Рекламації на якість наборів надсилайте підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки аналізу з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.

13. Пояснення до символів

	Виробник
	Кількість досліджень
	Медичний виріб для діагностики IN VITRO
	Температурне обмеження
	Дата виробництва (формат РРРР-ММ-ДД)
	Використати до (формат РРРР-ММ-ДД)
	Номер серії
	Номер за каталогом
	Ознайомлення з інструкціями для використання
	Засторога