



ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ СИНДРОМУ ЖИЛЬБЕРА

IVD



REF



100



ТОВ «АСТРАВІР ТЕКНОЛОДЖІ»
61011, Україна, м. Харків,
вул. Полтавський шлях 6, оф.25
+380990325214
info@astravirtech.com.ua
www.astravirtech.com.ua

Редакція 2 від 06.10.2021 р.

1. Призначення

Цей набір призначено для клінічної ПЛР-діагностики синдрому Жильбера. Набір дозволяє проводити *in vitro* детекцію кількості ТА повторів в гені UGT1A1, у таких зразках із організму пацієнта, як кров, букальний мазок. Сфера використання реагентного набору включає *in vitro* діагностику (IVD), епідеміологічний скринінг і науково-дослідні роботи.

2. Принцип аналізу

Виявлення нуклеїнової кислоти здійснюється шляхом постановки RT-ПЛР. З цією метою до набору включено термостійку ДНК-полімераза Таq. Валідність отриманих результатів забезпечується мультитаргетністю суміші праймерів, а також наявністю внутрішнього контролю (IC) та позитивного контрольного зразка (PC).

3. Специфікації

Склад: 100 реакцій / набір

Чутливість: 95.5 %

Специфічність: 96.1 %

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	4X червона	500 µl	Базовий розчин для проведення ПЛР, містить суміш дНТФ, Mg ²⁺ і т.д.
Суміш праймерів	жовта	500 µl	Містить праймери та зонди, специфічні до цільових послідовностей у послідовності гену UGT1A1
Позитивний контрольний зразок PC	PC чорна	100 µl	Слугує для загального контролю постановки
ТЕ буферний розчин	ТЕ біла	500 µl	Ультра-чистий, вільний від нуклеаз розчин

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 розбрикування 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).

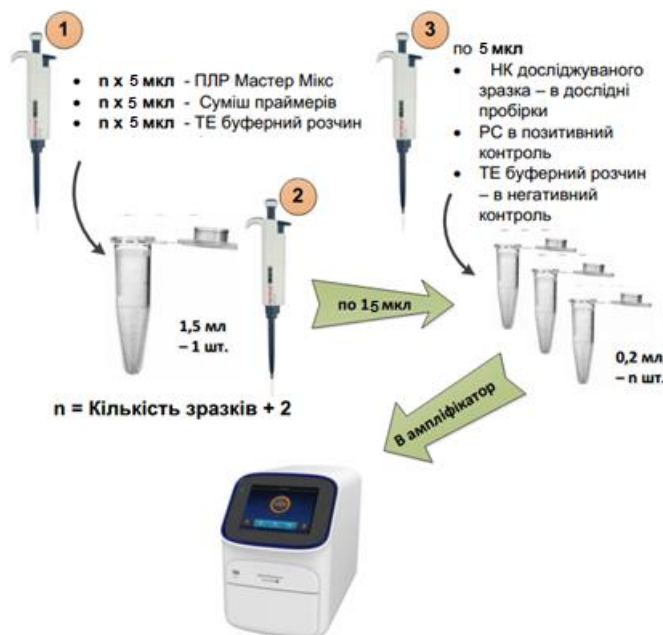
7. Вимоги до забору зразків та пробопідготовки

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.

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 НК. Процедуру лізису біологічного зразка, виділення з нього тотальної НК та її очистки проводять за допомогою відповідних комерційних наборів реагентів.

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 ДНК 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.
- **$n+2$** мікроцентрифужних пробірок об'ємом **0.2 mL** з прозорими кришками – для подальшого завантаження у термоциклер, де n – 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 **5 µL розчину з праймерами**, **5 µL суміші Мастер Мікс** та **5 µL ТЕ буферу**, враховуючи загальну кількість клінічних зразків,

1 позитивний контроль (PC) і 1 негативний контроль (NC). Виготовлений загальний сток реакційної суміші ретельно перемішати на вортексі й відцентрифугувати впродовж **2-3 сек** для усунення крапель і бульбашок.

Готова реакційна суміш може зберігатися протягом 12 години за температури +4°C

г) Розподілити реакційну суміш порціями по **15 µL** по підготовлених раніше пробірках об'ємом **0.2 mL**. Промаркувати, **не затуляючи написом прозорої кришки** (напр. на згинах кришок).

д) Внести у пробірки об'ємом **0.2 mL** по **5 µL розчину очищеної НК** з клінічних зразків після екстракції. В дві окремі пробірки, залишені під контролі постановки, внести **5 µL позитивного контрольного зразка (PC)** і **5 µL ультрачистого ТЕ буферу** в якості негативного контролю (NC).



УВАГА! Робота з ДНК 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:

Стадія 1 («гарячий старт» ДНК-полімерази): 95° C впродовж 12 хв.

Стадія 2 (вирівнювання сигналу), 5 циклів:

Крок 1: **95° C** впродовж **15 сек.**

Крок 2: **60° C** впродовж **30 сек**

Крок 3: **72° C** впродовж **30 сек**

Стадія 3 (ампліфікація цільової послідовності), 40 циклів:

Крок 1: **95° C** впродовж **5 сек.**

Крок 2: **60° C** впродовж **20 сек** (*детекція відбувається на цьому етапі*).

Крок 3: **72° C** впродовж **20 сек** (*детекція відбувається на цьому етапі*)



Детекція флуоресцентного сигналу відбувається за трьома каналами, зокрема:

- за каналом **FAM** виявляють 6 повторів ТА
- за каналом **HEX** виявляють 7 повторів ТА
- 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, ROX, та Cy5**, а також внести у відповідні лунки номери і/або назви зразків, в т.ч. контрольних.

) 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** (HEX), **Orange** (ROX), 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, ROX 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.

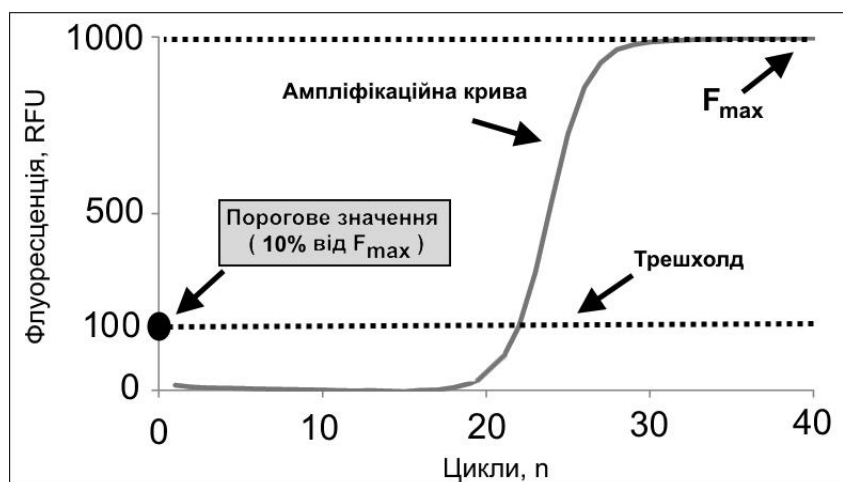
д) У вікні, що відкрилося, всі клінічні зразки позначити як **«Unknown»**, для всіх зразків задати вимір флуоресценції по каналах **FAM/Green** та **Cy5/Red**.

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.

Після проведення трешхолду необхідно перейти на вкладку алельної дискримінації, в програмному забезпеченні CFX Manager – “Allelic discrimination” – алель 1 відповідає нормальній алелі, алель 2 - мутантній алелі. При цьому включеними в аналіз мають бути лише канали FAM та HEX.

Будь ласка, зверніть увагу, що всі розраховані значення мають бути позитивними. Якщо хоч один зразок із вибірки хоч за одним каналом має негативне значення, то такий зразок має бути виключеним із аналізу, інакше отримані результати будуть некоректними.

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

	FAM	HEX	ROX	Sy5
PC	≤ 35	≤ 35	≤ 35	≤ 35
NC	Відсутній	Відсутній	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 **Cy5**. Відсічне значення (cut-off value) C_t для ІС дорівнює **35 циклам**.



УВАГА! Якщо продукт, який детектується по каналу **Cy5**, 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 вірусної 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 / HEX / ROX	Cy5	Інтерпретація
≤ 40	Будь-які дані	Зразок позитивний , ІС може бути відсутній через високе вірусне навантаження
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 $20 \pm 5^\circ\text{C}$** . 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** .




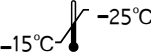






12. Технічна підтримка

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

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