

RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents

**Количественная диагностика *in vitro*
для применения с аппаратом *LightCycler®*
(Roche Diagnostics)**

Руководство по эксплуатации

Август 2003 г.

Содержание

- 1. Состав**
- 2. Хранение**
- 3. Необходимые дополнительные материалы и оборудование**
- 4. Основные предосторожности при проведении ПЦР**
- 5. Информация о патогенах**
- 6. Принципы проведения ПЦР в реальном времени**
- 7. Описание продукта**
- 8. Протокол**
 - Предварительный этап: Сбор, хранение и перевозка образцов материала
 - Сбор образцов
 - Хранение образцов
 - Перевозка образцов
 - Выделение РНК
 - Внутренний контроль
 - Количественная оценка
 - Подготовка к ПЦР
 - Программирование аппарата *LightCycler®*
- 9. Анализ результатов исследования**
- 10. Неисправности и методы их устранения**
- 11. Характеристики**
 - Чувствительность
 - Специфичность
 - Точность измерения
 - Надежность
 - Воспроизводимость
 - Диагностическое значение
- 12. Ограничения использования тест-системы**
- 13. Обозначение символов**

Тест-система реагентов **RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents** для использования с аппаратом **LightCycler®**

1. Состав

	Обозначения и содержание	Art. No. 5601-01 24 реакции	Art. No. 5601-02 48 реакций	Art. No. 5601-03 96 реакций
Голубой:	HPACoronavirus: LC Master:	2 x 12 rxns	4 x 12 rxns	8 x 12 rxns
Желтый:	HPACoronavirus: LC Mg-Sol:	1 x 400 мкл	1 x 400 мкл	1 x 400 мкл
Красный	HPACoronavirus: LC QS 1 _в : 1 x 10E ₄ копий на мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл
Красный	HPACoronavirus: LC QS 1 _в : 1 x 10E ₃ копий на мкл:	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл
Красный	HPACoronavirus: LC QS 1 _в : 1 x 10E ₂ копий на мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл
Красный	HPACoronavirus: LC QS 1 _в : 1 x 10E ₁ копий на мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл	1 x 200 мкл
Зеленый	HPACoronavirus: LC IC _в :	1 x 1000 мкл	1 x 1000 мкл	1 x 1000 мкл
Белый	Вода: (калибровка ПЦР)	1 x 1000 мкл	1 x 1000 мкл	1 x 1000 мкл

QS – стандарт количественной оценки








IC - внутренний контроль





LightCycler® - торговая марка компании Roche Group. Технология LightCycler® лицензирована компанией Roche Diagnostics GmbH. компанией Idaho Technology Inc.

2. Хранение

Компоненты набора следует хранить при температуре -20°C; они сохраняют годность в течение срока хранения, указанного на упаковке. Повторные размораживания и замораживания (более двух раз) не рекомендуются, поскольку снижают чувствительность системы. Если тест-систему планируется использовать только периодически, реагенты рекомендуется разаликвотить и хранить по частям. Срок хранения при температуре +4°C не должен превышать пяти часов.






3. Необходимые дополнительные материалы и оборудование

-  Сменные перчатки, не обработанные тальком
-  Набор для выделения РНК (см. раздел 8.1)
-  Физиологический раствор (0.9 % NaCl), содержащий 1% N-ацетилцистеин
-  Пипетки (переменной емкости от 1 до 20 мкл)
-  Стерильные наконечники для пипеток, имеющие проивоаэрозольный фильтр
-  Вортекс
-  Настольная центрифуга с ячейками для реакционных пробирок емкостью 2 мл

-  Набор *Colour Compensation Set* (Roche Diagnostics, номер по каталогу 2 158 850) для установки устройства *Crosstalk Colour Compensation*
-  Капилляры *LightCycler®*, Roche Diagnostics
-  Охладитель *LightCycler®*, Roche Diagnostics
-  Прибор *LightCycler®*, Roche Diagnostics

4. Основные предосторожности при проведении ПЦР

Исследователь должен всегда обращать внимание на следующие предосторожности:

-  использовать наконечники пипеток с фильтром
-  Хранить инфицированные материалы (образцы, контроли, ампликоны) отдельно от других реагентов и добавлять их в реакционную смесь с помощью специальных устройств, хранимых отдельно
-  Размораживать все компоненты при комнатной температуре, соблюдая осторожность, до начала исследования
-  При размораживании смешивать и центрифугировать компоненты кратковременно
-  Работать с препаратами, находящимися на льду или в охладителе (Cooling Block), быстро.

5. Информация о возбудителе

Коронавирусы, один из видов рода *Coronaviridae* --- крупные, покрытые оболочкой вирусы, содержащие РНК с позитивной полярностью, вызывающие высоковирулентные заболевания у человека и домашних животных. Известно, что для человека патогенны два коронавируса, которые вызывают до 2/3 случаев ОРЗ, а также нозокомиальные инфекции верхних дыхательных путей у недоношенных.



Считается, что еще один недавно открытый коронавирус вызывает Тяжелый Острый Респираторный синдром (SARS). Однако этот вирус до настоящего времени не классифицирован. В литературе он получил название коронавируса, вызывающего пневмонию — Human Pneumonia- Associated Coronavirus (HPA-CoV). Часть предполагаемого гена полимеразы коронавируса была идентифицирована с помощью ПЦР у больного SARS в институте Тропической медицины в Гамбурге (Bernhard- Nocht-Institute for Tropical Medicine) с помощью ряда сотрудничающих с ним лабораторий. Это исследование послужило основой для разработки промышленной тест системы для ПЦР в реальном времени, предназначенной для диагностики этого недавно обнаруженного коронавируса. ПЦР позволяет выявить генетический материал HPA-CoV в различном материале (крови, каловых массах, секрете дыхательных путей, тканях организма).

Оценка результатов исследования

Внимание: Следуйте официальным рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), которые можно найти в Интернете по адресу: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

Положительные результаты исследования: Положительные результаты исследования на HPA-CoV свидетельствуют, что пациент инфицирован HPA-CoV, даже если симптомов SARS у него не выявлено.

Отрицательные результаты исследования: Отрицательные результаты исследования на HPA-CoV не исключают SARS. Отрицательный результат исследования при наличии SARS может быть обусловлен следующими причинами:

-  Во время сбора образцов вирус в исследуемом материале отсутствовал (в настоящее время неизвестно, на каких стадиях патогенез инфекции HPA-CoV вирус может быть выявлен в различных типах клинического материала).
-  У больного выявлены симптомы SARS, которые обусловлены действием другого инфекционного агента.

6. Принципы проведения ПЦР в реальном времени

Выявление патогена с помощью ПЦР основано на амплификации определенных участков генома патогена. При ПЦР в реальном времени продукт амплификации выявляют с помощью флуоресцентных красителей. Обычно они соединены с олигонуклеотидными участками, которые специфически связываются с амплифицированным продуктом. Определение интенсивности флуоресценции по мере проведения ПЦР (т.е. в реальном времени) позволяет выявить и количественно определить накопление продукта без необходимости вскрывать реакционную пробирку после начала ПЦР.

7. Описание продукта

Тест-система RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents представляет собой готовую для применения систему, предназначенную для выявления HPA-CoV с помощью ПЦР, проводимой на аппарате LightCycler® (Roche Diagnostics). Набор HPA-Coronavirus LC Master содержит реагенты и ферменты для специфической амплификации участка 92 bp генома HPA-CoV, а также для непосредственного определения специфического ампликона в канале флуоресценции F1/F2 аппарата LightCycler®. Кроме того, в тест-систему RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents входит вторая гетерологическая система амплификации, позволяющая оценить возможное ингибирование ПЦР. Она используется в качестве внутреннего контроля (IC), выявляется в канале флуориметра F3/Back-F1 и не влияет на аналитическую ПЦР для выявления HPA-CoV. Кроме того, в набор входят внешние положительные контроли (HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4), которые позволяют оценить вирусную нагрузку инфекционным агентом. За более подробной информацией обращайтесь к разделу 8.3.

8. Протокол

Предварительный этап: Сбор, хранение и перевозка образцов материала

Меры предосторожности: Все образцы следует считать потенциально инфицированными.

Внимание: В настоящее время наиболее удобным для исследования материалом считают мокроту; описанные исследования проведены с ней. Мы рекомендуем исследовать с RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents мокроту.

Испытания и регистрацию системы RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents проводили на образцах сыворотки. Для других материалов (БАЛ, смывы из носоглотки, мазки, каловые массы, ткани) тест-система в настоящее время не утверждена. Следует использовать только рекомендуемые наборы для выделения нуклеиновых кислот (см. 8.2).

Рекомендуется внимательно изучить правила применения материалов для исследования, в особенности правила их получения, перевозки и хранения.

Внимание: Следуйте официальным рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), которые можно найти в Интернете по адресу: <http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>.

8.1.1 Получение образцов материала для исследования

Для получения мазков используйте следующее оборудование: Применяйте только дакроновые, вязкие или пластиковые (покрытые альгинатом кальция), но не алюминиевые шпатели.

Не применяйте алюминиевые и деревянные шпатели!

8.1.2 Хранение материала

Чувствительность исследования может снижаться при хранении образцов более 12 часов при температуре 4°C.

Мокроту и мазки можно перевозить в лабораторию для исследования при температуре 18-25°C, если общее время хранения и перевозки не превышает одного часа. Если срок перевозки в лабораторию превышает один час после получения материала, материал следует перевозить в замороженном состоянии.

8.1.3 Перевозка материала


Образцы мокроты и мазки следует доставлять в лабораторию как можно скорее, согласно инструкциям лаборатории по перевозке замороженного материала. Материал следует перевозить согласно региональным и общенациональным инструкциям по перевозке опасных биологических материалов.


8.2 Выделение РНК


Наборы для выделения РНК предлагает ряд производителей. Объем материала для выделения РНК зависит от используемого протокола. Выделение РНК следует проводить согласно инструкциям производителя. Рекомендуется использование следующих наборов для выделения РНК:

Образцы крови и сыворотки:	Набор для изоляции нуклеиновых кислот	Номер по каталогу	Производитель	Переносчик ДНК/РНК
мокрота, сыворотка, БАЛ, смывы из носоглотки, мазки	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52 904	QIAGEN	входит в набор
ткань	RNeasy Mini Kit (50)	74 104	QIAGEN	не входит в набор
каловые массы	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	51 504	QIAGEN	не входит в набор

При использовании в качестве материала мокроты следуйте следующим правилам: Для подготовки образца смешайте одинаковые объемы (1 : 1) материала и физраствора (0,9% NaCl), содержащего 1% N-ацетилсцистеина (номер по каталогу Sigma No.: A 8199) в пробирке; например, 300 мкл мокроты + 300 мкл физраствора с ацетилсцистеином. После инкубации при комнатной температуре в течение 30 минут для очищения РНК с помощью набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) берут 140 мкл лизата и далее проводят обработку по протоколу выделения РНК вируса.

 Если в выбранном наборе для изоляции нет **переносчика ДНК/РНК**, к смеси материала и лизирующего буфера для выделения нуклеиновых кислот от бесклеточных биологических жидкостей и материала, содержащего небольшое количество ДНК/РНК, настоятельно рекомендуется добавление тРНК (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences) в концентрации 10 мкл/мл лизирующего буфера.

 При работе по протоколам изоляции с использованием **этанолсодержащих** буферов для промывания перед выделением РНК рекомендуется провести дополнительное центрифугирование для удаления остатков этанола. Это позволяет предотвратить ингибирование ПЦР.

 Тест-систему *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR* нельзя использовать в сочетании с методами выделения, включающими использование **фенола**.

Примечание: Тест-систему *Internal Control of the RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* можно использовать непосредственно во время процедуры выделения (см. Раздел 8.3).

8.3 Внутренний контрольный образец

Внутренний контроль поставляется в комплекте набора (*HPA-Coronavirus LC IC*). Это позволяет **как контролировать процедуру выделения РНК, так и выявить возможное ингибирование ПЦР**. Добавьте внутренний контроль *IC* к смеси для изоляции в соотношении 0,1 мкл на 1 мкл смеси. Например, при использовании набора QIAamp Viral RNA Mini Kit РНК вымывают с помощью 60 мкл буфера АЕ. Следовательно, вначале следует добавить 6 мкл раствора *IC*. Если проводится элюция, например, с помощью 100 мкл, следует добавить 10 мкл. Объем используемого *IC* определяется **только** объемом раствора для элюции РНК. *IC* следует добавлять после первого этапа лизиса. **Не допускается** добавление *IC* непосредственно к буферу для лизиса или к исследуемому материалу!

IC допускается использовать **только для выявления возможного ингибирования ПЦР**. Для этого следует добавить 0,5 мкл *IC* и 3 мкл *HPA-Coronavirus LC Mg-Sol* непосредственно к 12 мкл раствора *HPA-Coronavirus LC Master*. Для каждой реакции ПЦР применяют по 15 мкл

раствора Master Mix, получаемого описанным выше способом и затем добавляют 5 мкл очищенного исследуемого материала. Если проводится подготовка к ПЦР для нескольких образцов, рекомендуется увеличить объем растворов HPA-Coronavirus LC Master, HPA-Coronavirus LC Mg-Sol, Internal Control в соответствии с количеством образцов (см. раздел 8.4). Увеличение объема раствора вследствие добавления IC при подготовке к ПЦР не имеет значения. Чувствительность исследования от этого не изменяется.

8.4 Количественная оценка результатов исследования

Прилагаемые стандарты количественной оценки (HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4) были откалиброваны по стандартам, предоставленным Институтом Роберта Коха, Берлин, Германия. Их обрабатывают аналогично ранее очищенным образцам и применяют в тех же объемах (5 мкл). Для получения стандартной кривой на аппарате LightCycler® следует использовать все 4 стандарта и указать в Sample Loading Screen, что применяются стандарты определенной концентрации (см. руководство по эксплуатации LightCycler® Operator's Manual, версия 3.5, глава В 2.4, Ввод данных по образцам). Полученные описанным выше способом стандартные кривые можно использовать также и для последующих исследований, при условии, что для отдельных определений учитывается только один стандарт в данной концентрации (возможны повторные измерения). Для этих целей следует импортировать ранее построенные стандартные кривые (см. руководство по эксплуатации LightCycler® Operator's Manual, версия 3.5, глава В 4.2.5, Количественные определения с помощью внешних стандартных кривых). Однако этот метод количественного анализа может приводить к смещению результатов вследствие неоднородности данных различных исследований ПЦР. Внимание: Стандарты количественной оценки определены в размерности "копии/мкл". Для преобразования полученных с помощью стандартных кривых значений в копии/мл материала образца следует применять приведенную ниже формулу:

Результат (копии/мл)=

Результат (копии /мкл) × Объем элюирующего раствора (мл) / Объем образца (мл)

Примечание: Руководство по количественному анализу с помощью систем RealArt™ и аппарата LightCycler® можно получить в Интернете по адресу www.artus-biotech.com (Технические примечания по количественному анализу с помощью аппарата LightCycler®).

Подготовка к ПЦР

Убедитесь, что охладитель (Cooling Block) и капиллярные адаптеры (относящиеся к аппарату LightCycler®) предварительно охлаждены до +4°C. Поместите необходимое количество капилляров LightCycler® в адаптеры охладителя (Cooling Block). Убедитесь, что для каждого исследования ПЦР имеется как минимум один стандарт количественный оценки и не менее одного отрицательного контроля (Воды для калибровки ПЦР). Для получения стандартной кривой для каждого исследования ПЦР следует использовать прилагаемые к тест-системе стандарты (HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4). Перед каждым исследованием все реагенты необходимо полностью разморозить и тщательно перемешать (с помощью пипетирования) и кратковременно центрифугировать. Если Internal Control планируется использовать **не только для выявления возможного подавления ПЦР, но и для процедуры выделения РНК**, к смеси для изоляции можно добавить Internal Control (см. раздел 8.2). В этом случае следует использовать следующую схему раскапывания (см. Рис. 1).

	Количество образцов	1	12
1. Подготовка Master Mix	HPA-Coronavirus LC Master	12 мкл	144 мкл
	HPA-Coronavirus LC Mg-Sol	3 мкл	36 мкл
	HPA-Coronavirus LC IC	0 мкл	0 мкл
	Общий объем	15 мкл	180 мкл
2. Подготовка к исследованию ПЦР	Master Mix	15 мкл	по 15 мкл каждый
	Образец	5 мкл	по 5 мкл каждый
	Общий объем	20 мкл	по 20 мкл каждый

Если планируется использовать IC **только для оценки ингибирования ПЦР**, его следует добавлять непосредственно к раствору *HPA-Coronavirus LC Master*. В этом случае следует использовать следующую схему раскапывания (см. Рис. 2).

	Количество образцов	1	12
1. Подготовка Master Mix	<i>HPA-Coronavirus LC Master</i>	12 мкл	144 мкл
	<i>HPA-Coronavirus LC Mg-Sol</i>	3 мкл	36 мкл
	<i>HPA-Coronavirus LC IC</i>	0,5 мкл	6 мкл
	Общий объем	15,5 мкл	186 мкл
2. Подготовка к исследованию ПЦР	Master Mix	15 мкл	по 15 мкл каждый
	Образец	5 мкл	по 5 мкл каждый
	Общий объем	20 мкл	по 20 мкл каждый

*Увеличение объема раствора вследствие добавления IC при подготовке к ПЦР не имеет значения. Чувствительность исследования от этого не изменяется.

С помощью пипетки перенесите по 15 мкл раствора Master Mix в пластиковый резервуар каждого капилляра. Затем добавьте в каждую пробирку по 5 мкл выделенной РНК образца. Для положительного контроля следует использовать 5 мкл по крайней мере одного стандарта (*HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4*), для отрицательного контроля — по 5 мл воды для калибровки ПЦР. Закройте капилляры. Для переноса смеси из пластикового резервуара в капилляр центрифугируйте адаптеры, содержащие капилляры, на настольной центрифуге в течение 10 секунд с максимумом оборотов $400 \times g$ (2000 оборотов в минуту).

Применение раствора *Internal Control* при процедуре очистки

3 µl	3 мкл
Mg-Sol*	Mg-Sol
Purification	Очистка
+ 0.1 µl IC per 1 µl	+ 0.1 мкл IC на 1 мкл
Elution Volume	Объем вымывающего раствора
5 µl Purified Sample*	5 мкл очищенного образца*
15 µl Master Mix*	15 мкл раствора Master Mix*
Glass Capillary	Стекланный капилляр
<i>LightCycler</i> ®	<i>LightCycler</i> ®
12 µl	12 мкл
RealArt™ Master*	раствора RealArt™ Master*

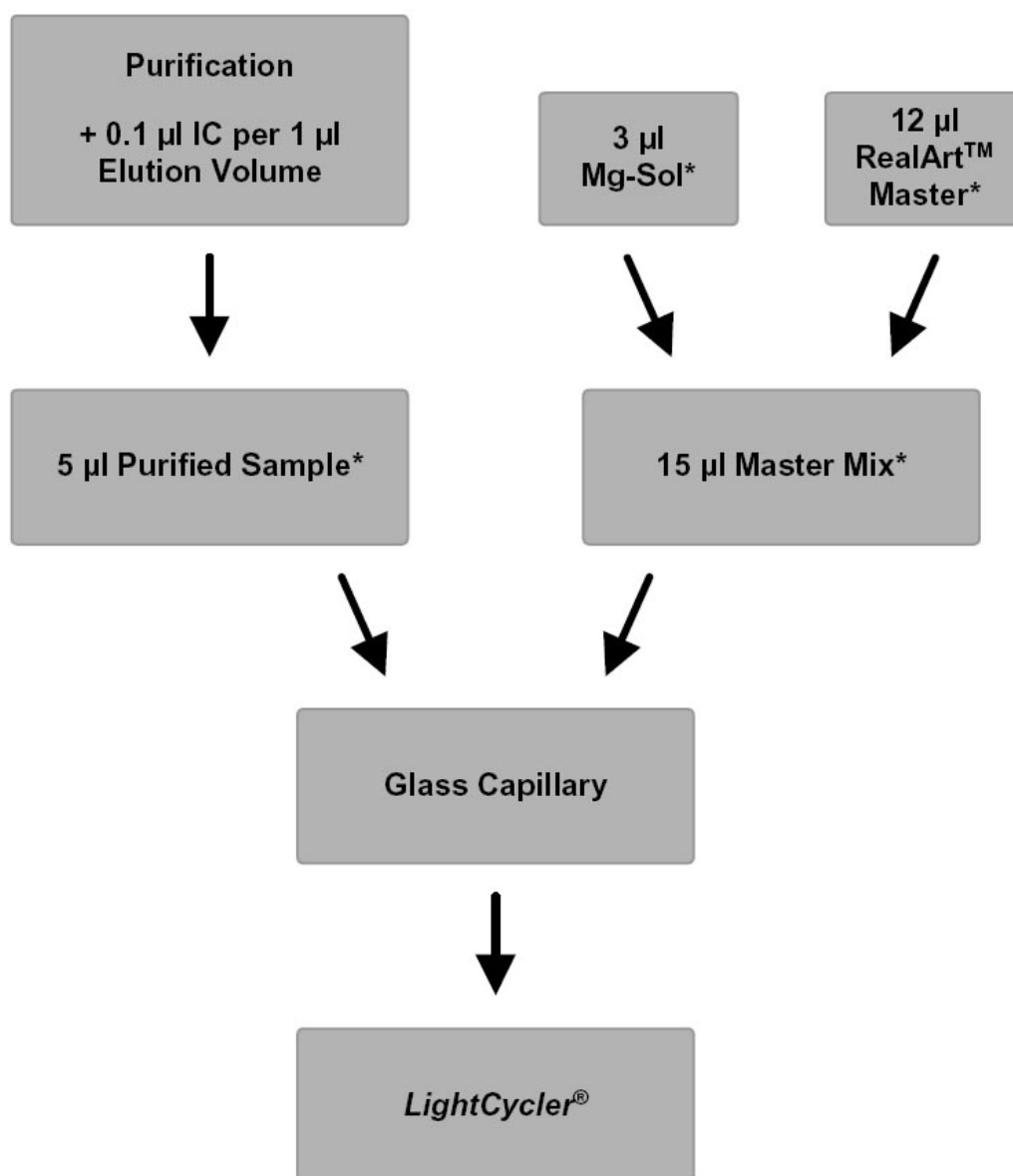


Рис. 1: Схема контроля процедуры очистки и ингибирования ПЦР.

* Обратите внимание, что растворы необходимо полностью прогреть, тщательно перемешать и кратковременно центрифугировать.

Добавление раствора *Internal Control* к раствору RealArt™ Master

3 µl Mg-Sol*	3 мкл Mg-Sol*
Purification	Очистка
5 µl Purified Sample*	5 мкл очищенного образца*
15 µl Master Mix*	15 мкл раствора Master Mix*
Glass Capillary	Стеклянный капилляр
LightCycler®	LightCycler®
12 µl RealArt™ Master*	12 мкл раствора RealArt™ Master*
15.5 µl Master Mix*	15,5 мкл раствора Master Mix*
0.5 µl IC*	0,5 мкл раствора IC*

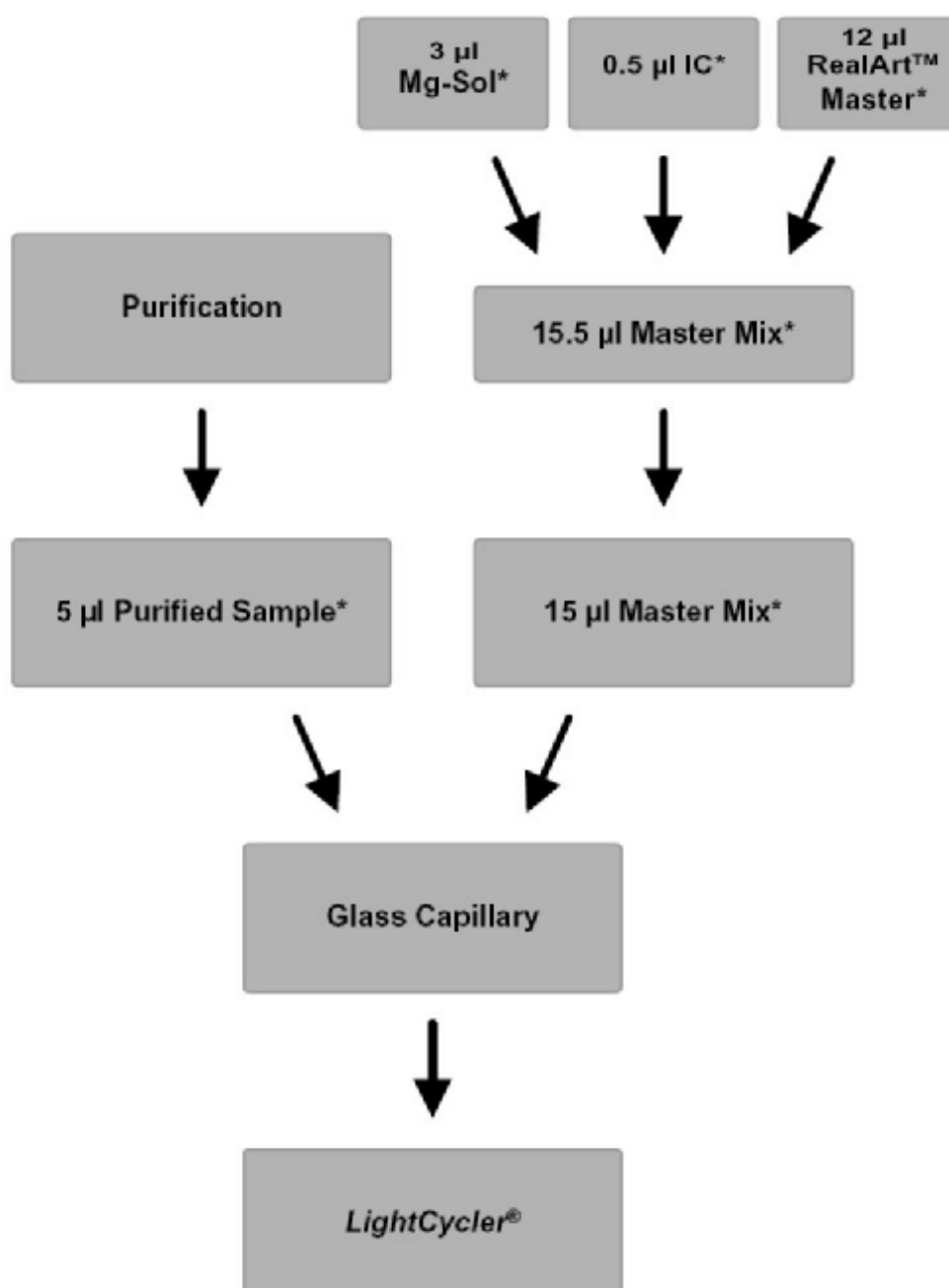


Рис. 2: Схема контроля ингибирования ПЦР.

* Обратите внимание, что растворы необходимо полностью прогреть, тщательно перемешать и кратковременно центрифугировать.

Программирование аппарата *LightCycler*®

Программу проведения ПЦР на аппарате *LightCycler*® для определения РНК НРА-CoV можно разделить на 4 этапа:

Обратная транскрипция РНК (Рис. 3).

Начальная активация фермента (Рис. 4).

Амплификация кДНК (Рис. 5).

Охлаждение (Рис. 6).

Запрограммируйте аппарат *LightCycler*® для выполнения этих четырех этапов, согласно параметрам, представленным на рисунках 3–6. Особенно внимание обратите на установки. *Analysis Mode*, *Cycle Program Data*, *Temperature Targets*. На иллюстрациях эти установки выделены жирными рамками. За дополнительной информацией по программированию аппарата *LightCycler*® обращайтесь к руководству по эксплуатации.

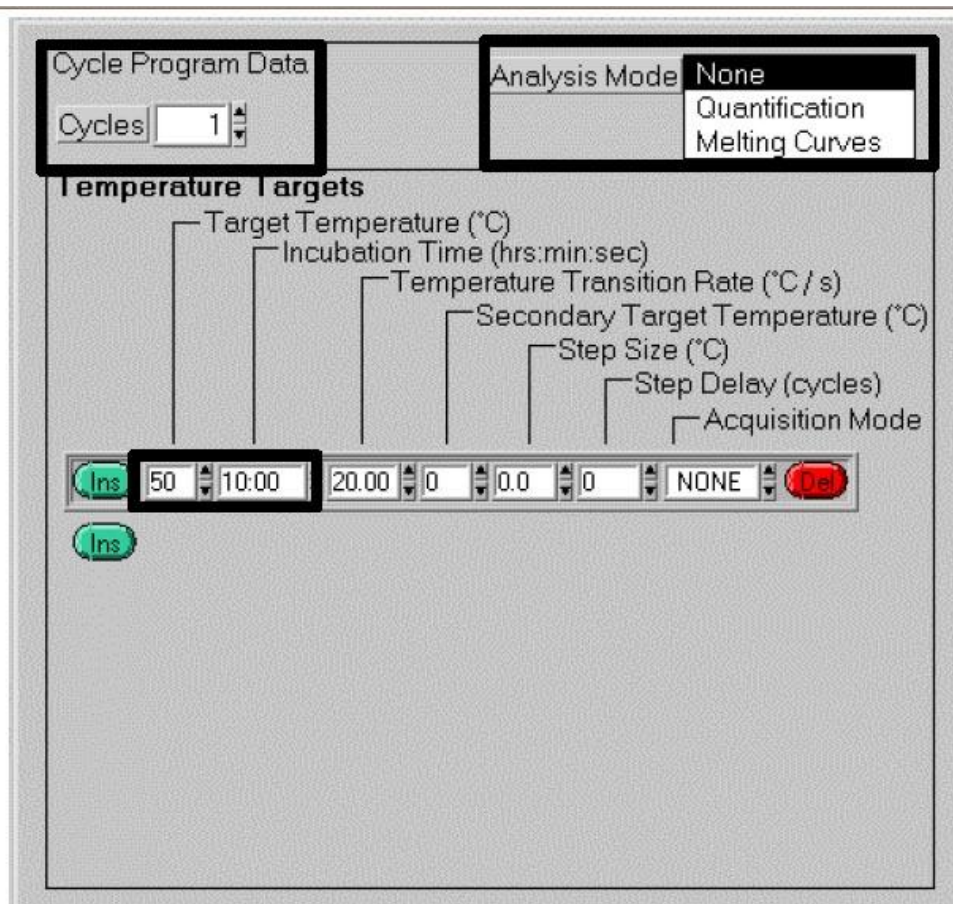


Рис. 3: Обратная транскрипция РНК.

Cycle Program Data		Analysis Mode	
Cycles	1	None	
		Quantification	
		Melting Curves	

Temperature Targets

Target Temperature (°C)
 Incubation Time (hrs:min:sec)
 Temperature Transition Rate (°C / s)
 Secondary Target Temperature (°C)
 Step Size (°C)
 Step Delay (cycles)
 Acquisition Mode

Ins	95	10	20.00	0	0.0	0	NONE	Del
Ins								

Рис. 4: Активация фермента.

Cycle Program Data		Analysis Mode	
Cycles	50	None	
		Quantification	
		Melting Curves	

Temperature Targets

Target Temperature (°C)
 Incubation Time (hrs:min:sec)
 Temperature Transition Rate (°C / s)
 Secondary Target Temperature (°C)
 Step Size (°C)
 Step Delay (cycles)
 Acquisition Mode

Ins	95	2	20.00	0	0.0	0	NONE	Del
Ins	55	12	20.00	0	0.0	0	SINGLE	Del
Ins	72	10	20.00	0	0.0	0	NONE	Del
Ins								

Рис. 5: Амплификация кДНК.

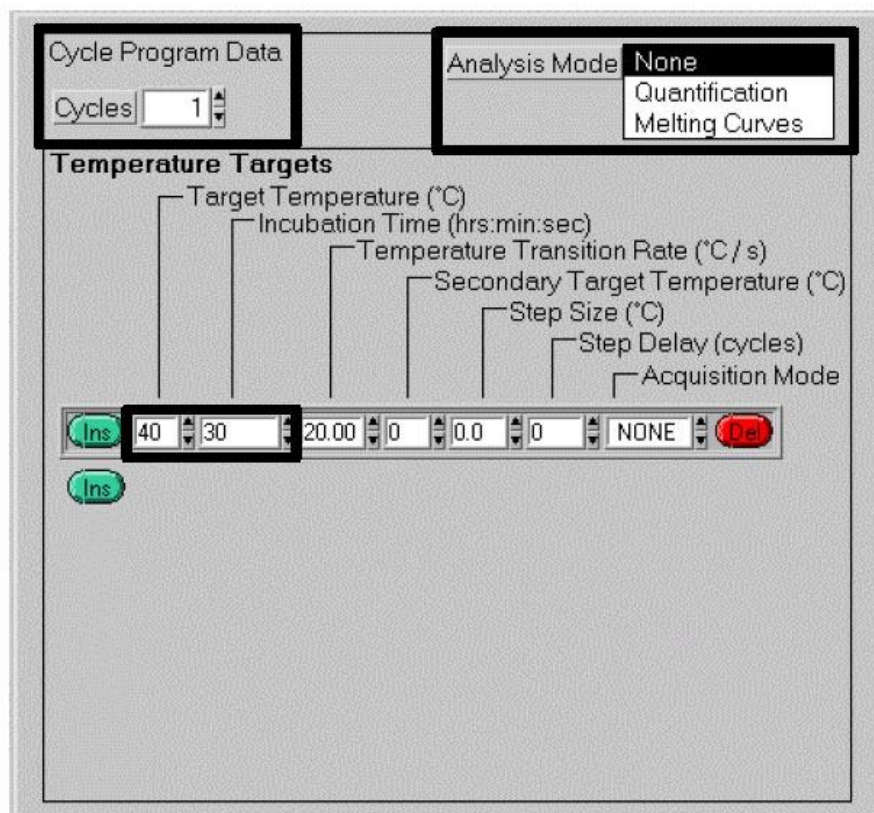


Рис. 6: Охлаждение.

9. Анализ данных

При многоцветном анализе между каналами флуориметра происходит интерференция. В программном обеспечении аппарата *LightCycler®* содержится файл *Colour Compensation File*, позволяющий скомпенсировать эту интерференцию. Откройте этот файл во время или после завершения ПЦР, активировав кнопку *Choose CCC File* или *Select CC Data*. Если файл *Colour Compensation File* не установлен, создайте его согласно инструкциям руководства по эксплуатации аппарата *LightCycler®*. После активации файла *Colour Compensation File* разделите сигналы от аналитической ПРЦ для определения НРА-CoV (каналы F1/F2) и каналов внутреннего контроля *Internal Control* (каналы F3 и F1). Для количественного анализа следуйте инструкциям пункта 8.3 и **Указаний по количественному анализу на аппарате LightCycler® (Technical Note about quantitation on the LightCycler® Instrument)** на странице интернета www.artus-biotech.com

*При использовании предыдущих версий (3,3 и более ранних) программного обеспечения кнопка F3/Back-F1 недоступна. В этом случае для отображения внутреннего контроля используйте кнопку F3/F1.

Возможны следующие результаты:

1. Сигнал выявляется в канале флуориметра F1/F2.

Результаты исследования положительные: в образце содержится РНК НРА-CoV.

В этом случае выявление сигнала в канале F3/Back-F1 незначительно, поскольку высокая начальная концентрация НРА-CoV RNA (положительный сигнал в канале F1/F2) может приводить к снижению или отсутствию флуоресценции внутреннего контроля в канале F3/Back-F1 (конкурентные отношения).

2. В канале флуориметра F1/F2 сигнал не выявляется. В то же время сигнал от внутреннего контроля в канале F3/Back-F1 имеется.

В образце не выявлено РНК НРА-CoV. Результат исследования можно считать отрицательным.

В случае отрицательного результата ПЦР на НРА-CoV выявление сигнала от внутреннего контроля исключает возможность ингибирования ПЦР.

3. Сигнал в каналах F1/F2 и F3/Back-F1 не выявляется.

К диагностическому заключению прийти невозможно.

Информацию о причинах ошибок и их устранении можно найти в разделе 10.

Примеры положительных и отрицательных результатов ПЦР приведены на Рис. 7 и 8.

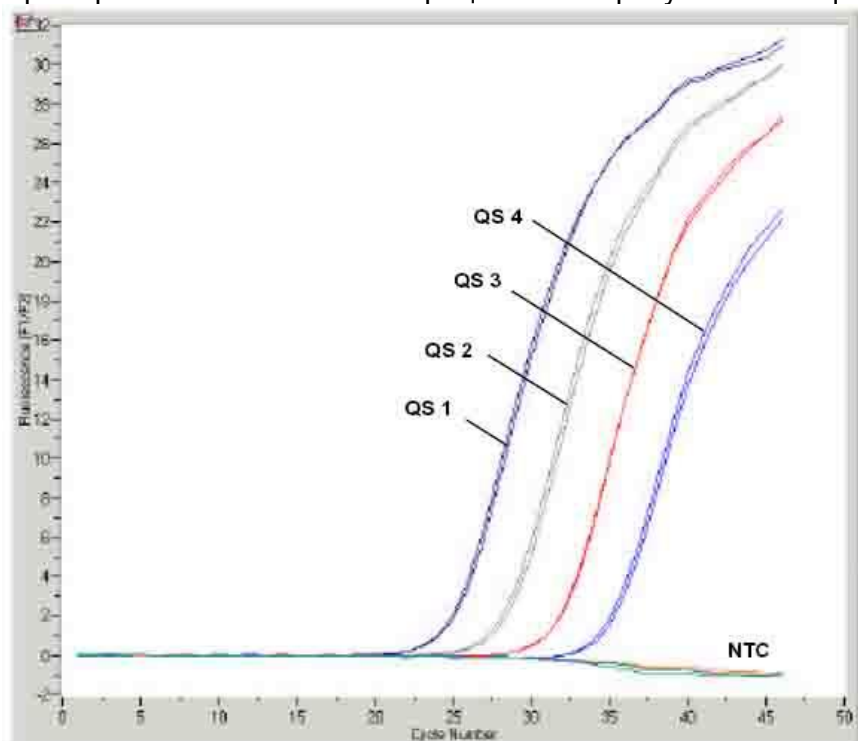


Рис. 7: Определение стандартов количественного определения РНК (*HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4*) в каналах флуориметра F1/F2. NTC: отрицательный контроль, не содержащий ДНК.

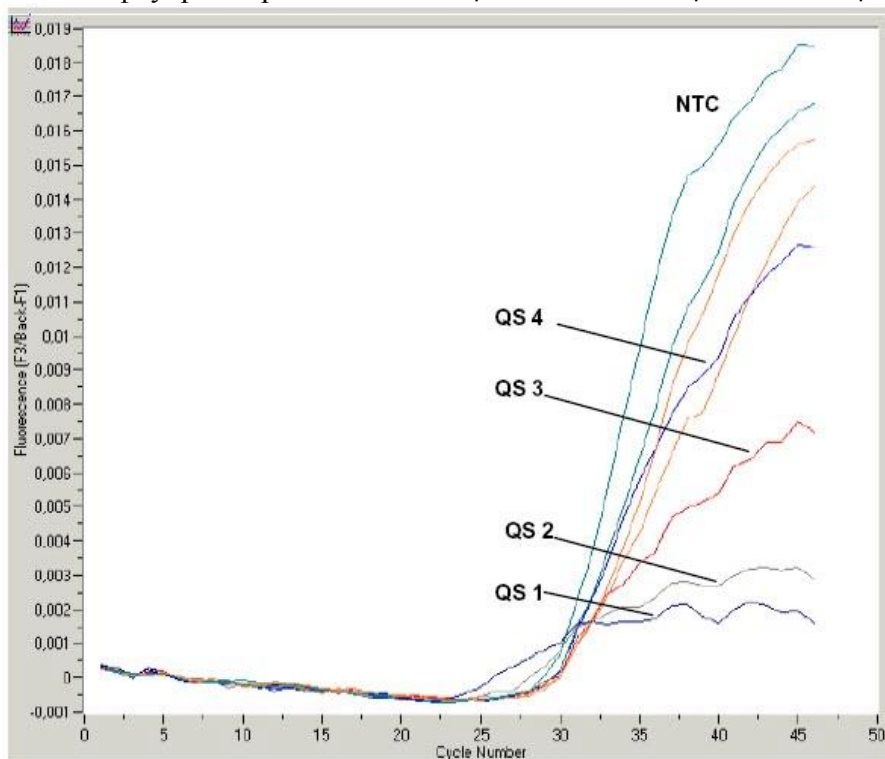


Рис. 8: Определение внутреннего контроля (IC) в канале флуориметра F3/Back-F1 одновременно с амплификацией стандартов количественного определения РНК (*HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4*). NTC: отрицательный контроль, не содержащий ДНК.

10. Неисправности и методы их устранения

Отсутствие сигналов стандартов количественного определения РНК (*HPA-Coronavirus LC QS 1 - 4*) в каналах флуориметра F1/F2.

☞ Неверное программирование аппарата *LightCycler®*.

Повторите ПЦР в правильно настроенном аппарате.

Сигнал внутреннего контроля в канале F3/Back-F1 флуориметра слабый или отсутствует; одновременно отсутствует сигнал в канале F1/F2:

☞ ПЦР проведена в условиях, не соответствующих протоколу.

Повторите ПЦР в правильно настроенном аппарате.

☞ Слишком частые замораживания и оттаивания реактива *HPA-Coronavirus LC Master*.

☞ Реактив *HPA-Coronavirus LC Master* хранился при температуре +4°C более пяти часов.

Уточните соответствие условий хранения положениям пункта 2. Повторите ПЦР с новым реактивом *HPA-Coronavirus LC Master*.

☞ Слишком частые замораживания и оттаивания реактива *HPA-Coronavirus LC IC*.

☞ Ингибирование ПЦР.

Убедитесь, что применяемый Вами метод выделения РНК соответствует рекомендациям (см. раздел 8.1) и строго следуйте инструкциям изготовителя.

Если у Вас остались вопросы или затруднения, свяжитесь с нашей службой технической поддержки по адресу techsupport@artus-biotech.com

11. Характеристики

Чувствительность

Для определения чувствительности тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* было проведено исследование серии разведений от 1,56 до 0,0049 номинального количества копий/мкл ампликонов транскрибированной РНК коронавируса HPA с последующим анализом с помощью тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents*. Исследование было проведено в течение трех различных дней в восьми повторах. Результаты были определены с помощью пробит анализа. Графический анализ представлен на Рис. 9. Предел чувствительности тест-системы *RealArt™ HPACoronavirus LC RT PCR Reagents* устойчиво находился на уровне 0,1 копия/мкл ($p=0,05$). Это означает, что 0,1 копия/мкл будет выявлена с вероятностью 95%.

Пробит анализ: *HPA-Coronavirus (LightCycler®)*

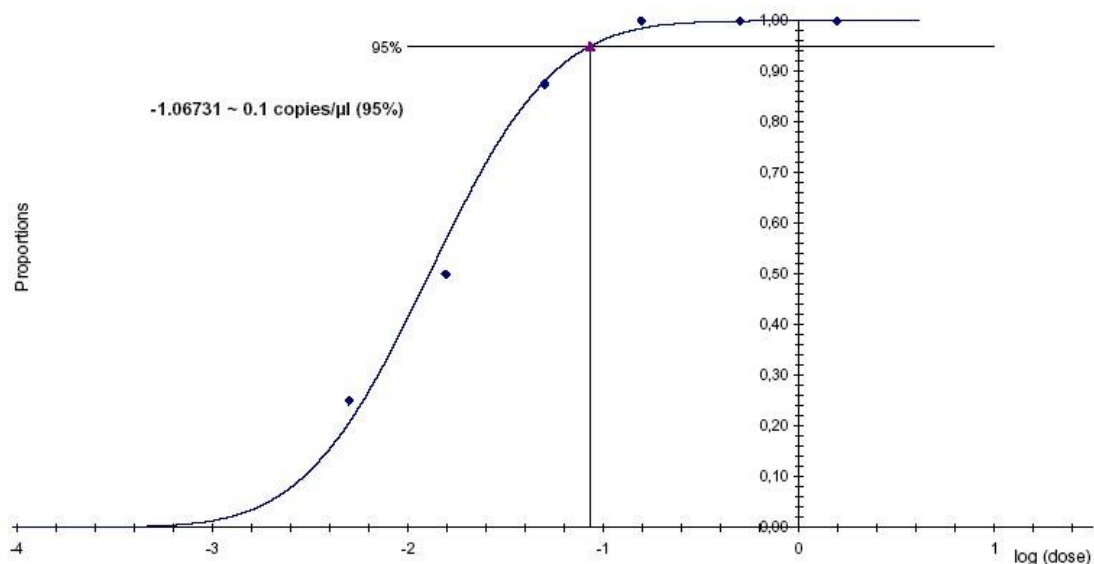


Рис. 9: Чувствительность ПЦР, проведенной с помощью тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT*

Специфичность

Специфичность тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* в первую очередь и главным образом определяется выбором праймеров и проб, а также выбором наиболее эффективных условий проведения реакции. Праймеры и пробы проверяли на наличие гомологии среди других известных нуклеотидных последовательностей с помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей. Таким образом была оценена возможность выявления всех соответствующих подтипов и генотипов. Специфичность была дополнительно оценена с 30 образцами сыворотки, не содержащей HPA-CoV. Они не вызывали сигнала со специфичными для HPA-CoV праймерами и пробами, которые поставляются с данной тест-системой. Для определения специфичности тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* была оценена перекрестная реактивность с близкородственными видами семейства *Coronaviridae* человека (контрольная группа в следующей таблице).

Контрольная группа	HPA-CoV (F1/F2)	IC (F3/Back-F1)
HCoV OC 43 ATCC (коронавирус человека OC 43)	-	+
HCoV OC 229 ATCC (коронавирус человека OC 229)	-	+
HCoV OC 1 ATCC (коронавирус человека OC 1)	-	+
HCoV OC 164 ATCC (коронавирус человека OC 164)	-	+
IBV Beaudelle (вирус инфекционного бронхита птиц Beaudelle)	-	+
BCV 212 (бычий CoV 212)	-	+
TGEV Perdue (Вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней Perdue)	-	+
TGEV Pur 46 C 188 (Вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней Pur)	-	+

Точность измерения

Данные о точности измерения с помощью тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* были получены путем определения общего разброса результатов исследования. Общая дисперсия состоит из внутренней изменчивости результатов (для одного образца), изменчивости между исследованиями (т.е. между множественными результатами исследований, проведенных на ряде аппаратов одного типа различными специалистами) и изменчивости между сериями (т.е. между множественными результатами исследований, проведенных с различными сериями реагентов). Полученные данные были использованы для определения стандартного отклонения, дисперсии и коэффициента вариации для специфических и внутренних контролей.

Данные по HPA-CoV получали с помощью стандартов количественного определения наименьших концентраций (QS 4, 10 копий/мкл). Исследование проводили при восьми репликациях QS4. Определение внутренней изменчивости проводили в рамках исследования на одной серии реагентов. Определение изменчивости между сериями проводили путем исследования с помощью одной серии реагентов тремя специалистами, использующими три различных аппарата одного типа. Определение изменчивости между сериями проводили с помощью исследования на трех сериях реагентов. Результаты оценки точности определения HPA-CoV представлены в таблице ниже. Согласно этим результатам, максимальная изменчивость между двумя образцами одной концентрации для определения HPA-CoV составляет 16,7%, для определения внутреннего контроля 3,26%. Все исследования оценивали с помощью алгоритма анализа Second Derivate Maximum Method (смотри руководство по эксплуатации аппарата *LightCycler®*).

HPA-CoV	Стандартное отклонение	Изменчивость	Коэффициент изменчивости [%]
Внутренняя изменчивость: HPA CoV LC QS 4	1.01	3.0	9.09
Внутренняя изменчивость: Внутренний контроль	0.06	0.01	0.21
Изменчивость между исследованиями: HPA CoV LC QS 4	2,11	4,46	16,43
Изменчивость между исследованиями: Внутренний контроль	0,34	0,12	1,21
Изменчивость между сериями: HPA CoV LC QS 4	1,93	3,73	13,43
Изменчивость между сериями: Внутренний контроль	1,25	1,56	4,36
Общая дисперсия: HPA CoV LC QS 4	2,14	4,56	16,72
Общая дисперсия: Внутренний контроль	0,92	0,84	3,26

Надежность

Оценка стойкости результатов позволяет оценить общую частоту неверных результатов исследования с помощью тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents*. В 30 образцов сыворотки (не содержащей HPA-CoV) был добавлен раствор контрольной РНК HPA-CoV в количестве 0,3 копии/мкл (концентрация, втрое превышающая предел чувствительности). После выделения с помощью набора реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN; см. раздел 8.1) эти образцы анализировали в тест-системе *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents*.

Для всех образцов HPA-CoV частота ложных реакций составила 0%.

Кроме того, с помощью очистки и анализа 30 образцов сыворотки, не содержащей HPA-CoV, оценивали стойкость внутреннего контроля. Общая частота ложных реакций составила 0%. Ингибирование не было выявлено. Таким образом, стойкость результатов для тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* составила 99%.


Воспроизводимость


Соответствие этому критерию достигается постоянным участием в квалификационных программах, позволяющих регулярно оценивать эффективность тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents* и сопоставить ее с результатами для других тест-систем.

Диагностическое значение


В настоящее время проводится ряд клинических испытаний тест-системы *RealArt™ HPA-Coronavirus LC RT PCR Reagents*.

12. Ограничения использования тест-системы

 Все реагенты могут быть использованы только для диагностических исследований *in vitro*.

 Тест-системой может пользоваться только специально обученный персонал и только для диагностических исследований *in vitro* (EN375).

 Необходимо соблюдение протокола использования тест-системы.

 Следует обращать внимание на сроки годности реагентов, указанные на упаковке тест-системы и на всех ее компонентах. Не используйте просроченные реагенты.

13. Описание символьных обозначений

Использовать с помощью

Код серии

Производитель

Номер по каталогу

Пределы температуры использования

Стандарт количественного определения

Внутренний контроль

artus GmbH | Königstr. 4a | 22767 Hamburg | Germany
Телефон:: +49 - 40 - 41 36 47-00 | Факс: +49 - 40 - 41 36 47-10
E-mail: info@artus-biotech.com | Webpage: www.artus-biotech.com

artus Biotech USA, Inc. | China Basin Landing | 185 Berry Street | Suite 6400
San Francisco | CA 94107 | USA
Телефон:: +1 - 415 - 512 7887 | Факс: +1 - 415 - 512 7884
E-mail: info-USA@artus-biotech.com

artus Malaysia Sdn. Bhd. | Level 13 | Wisma E & C | No. 2 Lorong Dungun Kiri
Damansara Heights | 50490 Kuala Lumpur | Malaysia
Телефон:: +603 - 2094 5170 | Факс: +603 - 2094 5171
E-mail: info-asia@artus-biotech.com