

Набор TaqMan® Influenza A/H5 Detection Версия 1.0

Протокол

Данная продукция предназначена только
для исследований
Не использовать в диагностических целях

Содержание

Введение.....	3
Меры предосторожности.....	3
О РБИ.....	4
Как получить подробную информацию.....	6
Обзор продукта.....	6
Обзор химического состава.....	7
Предотвращение загрязнения.....	12
Обзор процедуры детекции.....	13
Приготовление образцов РНК.....	13
Подготовка ПЦР в реальном времени.....	14
Запуск анализа (Выполнение РТ-ПЦР).....	18
Просмотр результатов.....	19
Приложение А.....	23
Приложение В: Специфика и границы чувствительности.....	25
Литература.....	27

Введение

Данное введение содержит:

- Меры предосторожности
- Как получить подробную информацию
- Как получить поддержку

Меры предосторожности

Отметки, требующие особого внимания

Четыре отметки, требующие особого внимания, присутствуют в документации пользователя Applied Biosystems в местах, требующих особого внимания для того, чтобы избежать серьезной опасности. Каждая отметка – **Важно, Осторожно, Внимание, Опасно** – предполагает особый уровень наблюдения или действия, как описано ниже:

ВАЖНО! – отмечает информацию, которая необходима для правильной работы с инструментом, точного использования набора реагентов или их безопасного использования.



– Отмечает потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к легким или не очень серьезным повреждениям. Так же может быть использована для обозначения небезопасных действий.



– Отмечает потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к смерти или серьезным травмам.



– Отмечает неизбежно опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, приведет к смерти или серьезному повреждению. Данный знак используется для обозначения наиболее опасных ситуаций.

Предупреждение о химической опасности



ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Некоторые из химических соединений, используемых в приборах и наборах компании Applied Biosystems, представляют потенциальную опасность и могут стать причиной травмы, заболевания или смерти.

Руководство по химической безопасности

Во избежание каких-либо повреждений от химических реагентов:

- Внимательно прочтите руководство по безопасному использованию (РБИ), предоставляемое производителем с реагентами, перед тем как положить на хранение или работать с какими-либо реагентами или опасными материалами. (См. “О РБИ” на стр. 4)
- Сведите к минимуму контакт с реагентами. Используйте соответствующие средства личной защиты, когда работаете с реагентами (например, защитные очки, перчатки или лабораторную одежду). Для получения дополнительных указаний по безопасности, сверяйтесь с РБИ.
- Сведите к минимуму вдыхание реагентов. Не оставляйте емкости с реагентами открытыми. Работайте с реагентами только в хорошо вентилируемых помещениях (например, с капюшонной вытяжкой). Для получения дополнительных указаний по безопасности, сверяйтесь с РБИ.
- Постоянно проверяйте реагенты на предмет утечки или проливания. Если имело место проливание или утечка, выполните процедуру очистки, рекомендуемую производителем или РБИ.

- Выполняйте все местные, государственные или национальные законы и постановления, связанные с хранением реагентов, работой с ними и утилизации.

О РБИ

Производители реагентов предоставляют руководства по безопасному использованию (РБИ) при поставке реагентов, представляющих опасность новым пользователям. Они также предоставляют РБИ с первой поставкой реагентов представляющих опасность пользователю, после того, как РБИ было обновлено. РБИ содержит информацию о безопасном использовании, которая необходима для правильного хранения, использования, перевозки и соблюдения мер химической безопасности.

Каждый раз при получении нового РБИ в составе набора с химически опасными реагентами, позаботьтесь о замене соответствующего РБИ в ваших документах.

Получение РБИ

Вы можете получить РБИ от компании Applied Biosystems для любых реагентов, поставляемых компанией. Данная услуга является бесплатной и доступной круглосуточно.

Для того чтобы получить РБИ:

1. Введите адрес <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html>
2. В поле «Поиск» (Search) введите название реагента, каталожный номер или другую информацию, которая касается РБИ. Выберите необходимый вам язык, затем нажмите «Поиск» (Search).
3. Найдите интересующий вас документ, нажмите правую клавишу мышки, поместив курсор на название документа, затем выберите что-либо из приведенного ниже:
 - **Open** (Открыть) – для просмотра документа;
 - **Print Target** (Печать) – для того, чтобы распечатать документ;
 - **Save Target As** (Сохранить как) – для того, чтобы загрузить PDF версию в ту директорию, которую вы указали.
4. Для того, чтобы получить копию документа по факсу или e-mail, выберите **Fax** или **Email**, чтобы оставить название документа на странице Результатов Поиска, затем нажмите Извлечь Документ (**RETRIEVE DOCUMENTS**) в нижней части страницы списка документов.
5. После того, как вы ввели необходимую информацию, нажмите Просмотреть/Доставить Выбранный Документ Сейчас (**View/Deliver Selected Documents Now**).

Опасные химические отходы



ОПАСНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ ОТХОДЫ. Некоторые отходы, полученные в результате работы инструментов или систем, являются потенциально опасными и могут послужить причиной травм, заболеваний или смерти.

Руководство по безопасному обращению с отходами

Для того чтобы максимально снизить риск повреждений от химических отходов:

- Внимательно прочтите руководство по безопасному использованию (РБИ), предоставляемое производителем реагентов с контейнером для отходов, перед тем, как положить на хранение, использовать и утилизировать отходы.
- Позаботьтесь о первичном и вторичном контейнере для отходов. (Первичный контейнер для отходов содержит непосредственно сами отходы. Вторичный контейнер содержит отходы, которые пролились из первичного контейнера. Оба контейнера должны быть совместимы с компонентами отходов и соответствовать федеральным, государственным или местным требованиям, предъявляемым к контейнерам для хранения отходов.)

- Сведите к минимуму контакт с реагентами. Используйте соответствующие средства личной защиты, когда работаете с реагентами (например, защитные очки, перчатки, или лабораторную одежду). Для получения дополнительных указаний по безопасности, сверяйтесь с РБИ.
- Сведите к минимуму вдыхание реагентов. Не оставляйте емкости с реагентами открытыми. Работайте с реагентами только в хорошо вентилируемых помещениях (например, с капюшонной вытяжкой). Для получения дополнительных указаний по безопасности, сверяйтесь с РБИ.
- Работайте с химическими отходами под капюшонной вытяжкой.
- После того, как вы опорожните контейнер для отходов, закройте его крышкой, входящей в комплект.
- Утилизируйте содержимое поддона для отходов и емкости для отходов в соответствии с правилами хорошей лабораторной практики и местными, государственными или национальными законами об охране окружающей среды и здоровья.

Утилизация отходов

Если потенциально опасные отходы получены в результате вашей работы на оборудовании, вы должны:

- Охарактеризовать (если это необходимо, путем анализа) полученные отходы путем частного применения реагентов и субстратов, используемых в вашей лаборатории.
- Убедитесь в отсутствии угрозы здоровью всего персонала вашей лаборатории.
- Удостоверьтесь в том, что отходы хранятся, переносятся, транспортируются и утилизируются в соответствии со всеми местными, государственными и национальными правилами.

ВАЖНО! Радиоактивные или биологически опасные материалы могут требовать специальной обработки. Могут применяться ограничения при утилизации.

Работа с биологически опасными материалами



ВНИМАНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Образцы биологического происхождения, такие как ткани, жидкости тела, инфекционные агенты, кровь человека и других животных представляют потенциальную угрозу передачи инфекционных заболеваний. Соблюдайте все действующие местные, государственные и/или национальные распоряжения. Используйте подходящие средства защиты, в список которых входит, но не ограничивает: защитные очки, щиток для лица, лабораторную одежду и перчатки. Все работы следует выполнять в соответствующем образом подготовленном помещении, обеспечивающих безопасную работу (например, устройство физического содержания). Персонал должен пройти обучение в соответствии с требованиями, предъявляемыми компанией/учреждением, перед работой с потенциально инфицированными материалами. Прочтите и придерживайтесь рекомендаций следующих руководств и/или действующих требований:

- U.S. Department of Health and Human Services guidelines published in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (stock no. 017-040-00547-4; <http://bmbll.od.nih.gov>) (Руководство Департамента общественного здоровья США)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html) (Стандарты по безопасности и здоровью)
- Your company/institution's Biosafety Program protocols for working/handling potentially infectious materials. (Протоколы компании по работе с биологически опасными материалами)

Дополнительную информацию о работе с биологически опасными материалами можно получить по адресу: <http://www.cdc.gov>

Как получить подробную информацию

Документы-ссылки

Просмотрите следующие документы-ссылки для получения дополнительной информации по темам, приведенным в данном руководстве:

- Руководство пользователя к вашей Системе Определения Последовательности компании Applied Biosystems (СОП) или к системе ПЦР в реальном времени.

Пришлите нам свой комментарий

Компания Applied Biosystems будет рада получить от вас комментарии и мнения по улучшению документации для пользователя. Вы можете отсылать ваши комментарии по e-mail: techpubs@appliedbiosystems.com

Как получить поддержку

Для обслуживания и информационной поддержки для всех направлений, зайдите на сайт <http://www.appliedbiosystems.com>, затем активируйте ссылку SUPPORT (Поддержка)

На странице поддержки вы можете:

- Получить номер телефона/факса для контакта с представителями технической поддержки Applied Biosystems и службы продаж;
- Просмотреть раздел «Часто задаваемые вопросы» (FAQs);
- Отправить вопрос непосредственно представителю службы технической поддержки;
- Заказать руководство пользователя Applied Biosystems, РБИ, сертификаты анализа и другие документы;
- Загрузить документы в формате PDF;
- Получить информацию о программах обучения пользователей;
- Загрузить патчи и обновления программного обеспечения.

Обзор продукта

Набор TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit версии 1.0 предоставляет возможность проведения процедуры для быстрого определения наличия вирусных мишеней. В состав набора включены реагенты в количестве, необходимом для выполнения 100 тестов для определения гриппа А и 100 тестов для определения гриппа H5.

Набор TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Версия 1.0 используются для:

- обратной транскрипции для синтеза кДНК с вирусной РНК, использующуюся в качестве матрицы;
 - полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации вирусных мишеней;
 - тестов TaqMan для определения присутствия специфических штаммов вируса гриппа;
 - внутреннего позитивного контроля (IPC) для проверки присутствия ПЦР-ингибиторов.
- следующих инструментов производства компании Applied Biosystems для выполнения ПЦР и определения разделения проб:
- ABI PRISM® 7000 Система определения последовательностей;
 - Applied Biosystems 7900HT Быстрая система ПЦР в реальном времени (с использованием стандартного блока);
 - Applied Biosystems 7300 или 7500 Система ПЦР в реальном времени.

Представление последовательностей NCBI, начатое в 2001 г., было использовано в качестве основы при разработке набора TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Версии 1.0. Биоинформатический анализ показал, что набор для определения гриппа может быть использован для определения большинства изолятов вируса типа А и субтипа H5, последовательности которых известны. Смотри “Приложение

В”: Специфика и ограничения определения” на странице 29 приведено обсуждение предсказания и продемонстрирована специфика

Обзор химического состава

Компоненты реакции

В состав набора TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit версии 1.0 включены следующие компоненты:

- Смесь реагентов (Reagent Mix) (собранные из основных реагентов TaqMan® EZ RT-PCR (PN N8080236)), содержащих dNTP, DNA полимеразу и другие компоненты, необходимые для выполнения обратной транскрипции и ПЦР.
- Смесь мишеней для анализа (гриппа А и гриппа Н5) содержит праймеры и TaqMan зонды для ПЦР.
- Образцы:
 - РНК, изолированную из образцов, полученных из окружающей среды, или эпидемиологические образцы, которые предоставляются клиентами;
 - РНК позитивный контроль (поставляется в составе набора);
 - Негативный контроль (поставляется в составе набора).

Набор рассчитан на проведение 100 тестов на наличие вируса гриппа А и 100 тестов на наличие вируса гриппа Н5.

Негативные и позитивные контроли

Рекомендуется включать ПЦР специфические и процесс специфические контроли в ваш эксперимент.

• Негативные контроли:

- используйте по крайней мере два “ПЦР контроля” (негативный контроль поставляется в составе набора) для подтверждения того, что набор реагентов не содержит каких либо амплифицирующихся компонентов.
- используйте “контроль процесса” (образец, подготовленный для определения, но без добавления какого либо образца) для того, чтобы подтвердить тот факт, что в процессе проведения анализа не попадают какие-либо компоненты, которые могут вызвать амплификацию.

• Позитивные контроли:

- используйте “ПЦР контроль” (позитивный контроль поставляется в составе набора или ДНК, поставляемая пользователем) для того, чтобы подтвердить амплификацию ожидаемой цели реагентами, входящими в набор.
- используйте “контроль процесса” (позитивный материал образца, сходный с реальными образцами, которые вы исследуете, например, кровь, физиологические жидкости, культуры) для того, чтобы проверить процесс, начиная с приготовления образцов до сбора результатов, чтобы удостовериться в том, что ваш процесс может давать положительный результат.

ВАЖНО! При постановке позитивного контроля закрывайте лунки образцов и негативных контролей перед внесением позитивных контролей для того, чтобы избежать перекрестного загрязнения образцов и негативных контролей.

Внутренний позитивный контроль (IPC)

Компания Applied Biosystems включает IPC в состав смеси для определения проб. Сигнал позитивного контроля IPC свидетельствует о том, что:

- ПЦР реагенты амплифицируются, как ожидается.
- можно точно интерпретировать результаты негативных образцов.

Система Контроля Загрязнений UNG

AmpErase® UNG обработка в данном протоколе минимизирует или элиминирует повторную амплификацию внесенных ПЦР продуктов путем:

- замены dUTP на dTTP в смеси реагентов ПЦР (PCR Reagent Mix);
- обрабатывает смесь ферментом урацил N-гликозилазой (UNG, EC 3.2.2) перед проведением амплификации (Longo et al., 1990).

Замена dTTP на dUTP как dNTP субстрат в ПЦР может приводить в результате к удалению до 200,000 копий предварительно амплифицированного продукта на 50 мкл. реакционной смеси.

γTth ДНК полимеразы

γTth ДНК полимеразы действует как термореактивная обратная транскриптаза и как термостабильная ДНК полимеразы. The γTth ДНК полимеразы выполняет обратную транскрипцию РНК в присутствии Mn^{2+} и при температурах (≥ 60 °C). Также характеризуется 5' - 3' нуклеазной активностью, необходимой для разделения флуорогенных проб.

ПЦР в реальном времени

Проба TaqMan Influenza A/H5 использует одношаговый формат обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (RT-PCR). Данный метод комбинирует γTth ДНК полимеразу с флуорогенной 5' нуклеазой в системе одна-пробирка, один-фермент.

В течение ПЦР в реальном времени (Рис. 1 стр. 9):

1. процесс обратной транскрипции РНК в кДНК;
2. выполнение ПЦР циклов:
 - a. отжиг праймеров или связывание с кДНК;
 - b. ДНК полимеразы синтезирует новую кДНК нить путем присоединения к праймеру нуклеотидов;
 - c. если интересующая кДНК присутствует среди продуктов амплификации, TaqMan зонд гибридизируется с последовательностью.
 - d. благодаря 5' - 3' нуклеолитической активности γTth ДНК полимеразы расщепляет гибридизированные пробы между репортерным красителем и гасителем (более подробная информация о зондах TaqMan приведена ниже). Фрагмент, несущий репортерный краситель, отделяется от цели, в результате чего наблюдается усиление флуоресценции. Данный процесс имеет место в каждом цикле и не интерферирует с экспоненциальным накоплением продукта.
 - e. Полимеризация нитей продолжается. 3' конец зонда блокируется для того, чтобы предотвратить удлинение зонда в течение ПЦР.
 - f. Накопление ПЦР продуктов определяется напрямую путем мониторинга усиления флуоресценции репортерным красителем.

Примечание: Усиление флуоресцентного сигнала имеет место только в случае, если последовательность – мишень комплементарна зонду и амплифицируется в течение ПЦР. Неспецифическая амплификация не наблюдается при отсутствии сайта, комплементарного зонду.

TaqMan Зонды

TaqMan зонды содержат флуоресцирующий репортерный краситель на 5' конце зонда и гаситель на 3' конце зонда. В интактном зонде близкое расположение репортерного красителя и гасителя вызывает супрессию флуоресценции. Расщепление зонда в процессе ПЦР реакции пространственно разделяет репортерный краситель от гасителя и позволяет детектировать флуоресценцию репортерного красителя.

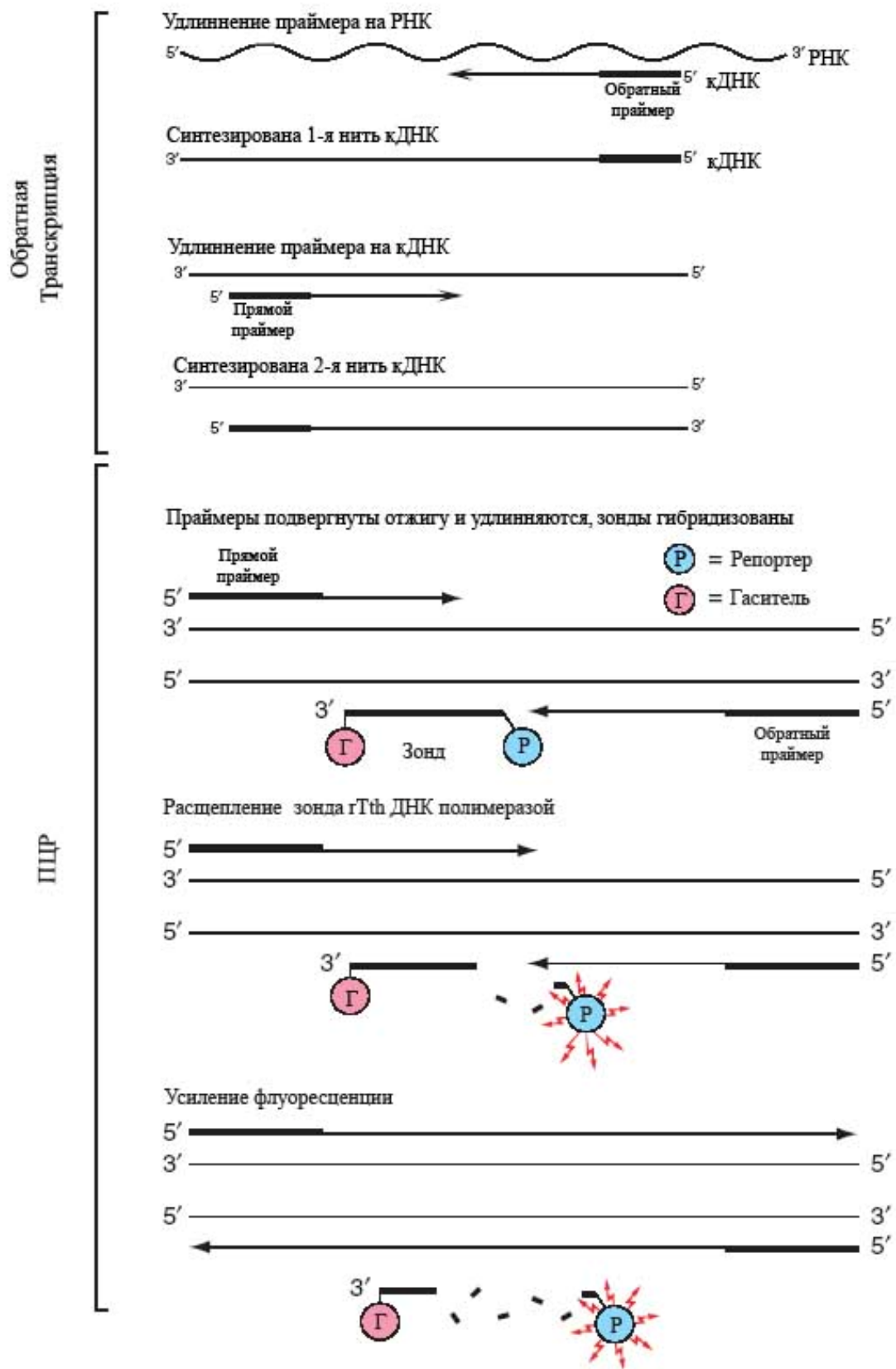


Рисунок 1. Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция (РТ-ПЦР).
Материалы и оборудование

Набор содержит

TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit (PN 4370676) содержит реагенты в количестве, достаточном для проведения 100 тестов Гриппа А и 100 тестов Гриппа Н5 РТ-ПЦР. Набор включает две коробки и настоящий протокол:

- TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents (PN N8080236)
- TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Версия 1.0 (PN 4370330)

Таблица 1. TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents (PN N8080236)











Цвет Крышки	Реагент	Объем	Описание
Пурпурный 	гТth ДНК Полимераза, 2 пробирки, 1,000 единиц	400 мкл	2.5 ед./мкл. гТth ДНК полимеразы в 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 100 мМ KCl, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 50 глицерола, 0.5% (м./об.) Tween 20
Белый 	AmpErase® UNG, 1 пробирка, 100 единиц	100 мкл	1 ед./мкл. урацил N-гликозилаза в 30 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 150 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 5% глицерола (м./об.), 0.5% (м./об.) Tween 20
Синий 	деокси АТФ, 1 пробирка	320 мкл	10 мМ дезоксиаденозин трифосфат
Белый 	деокси СТР, 1 пробирка	320 мкл	10 мМ дезоксицитозин трифосфат
Оранжевый 	деокси GTP, 1 пробирка	320 мкл	10 мМ дезоксигуанозин трифосфат
Пурпурный 	деокси УТР, 1 пробирка	320 мкл	20 мМ дезоксиуридин трифосфат
Пурпурный 	5X TaqMan® EZ Буфер, 2 пробирки	2 мкл	250 мМ Бицин, 575 мМ ацетат калия, 0.05 мМ. EDTA, 300 нМ Пассивный контроль 1, 40% (м./об.) глицерол, pH 8.2
Белый 	Раствор ацетата магния, 2 пробирки	2 мл	25 мМ. Mn (OAc)2

Таблица 2. TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Версия 1.0 (PN 4370330)

Цвет Крышки	Реагент	Объем	Описание
Красный 	10X Influenza A Смесь пробы, 1 пробирка	500 мкл	Праймеры и зонды для амплификации и детекции мшени и IPC (мишень = зонд маркированный FAM™ красителем, IPC = зонд маркированный красителем VIC®)
Темно Зеленый 	10X Influenza H5 Смесь пробы, 1 пробирка	500 мкл	Праймеры и зонды для амплификации и детекции мшени и IPC(мишень = зонд маркированный FAM™

			красителем, IPC = зонд маркированный красителем VIC [®])
Белый 	Негативный контроль, 1 пробирка	1000 мкл	Вода не содержащая РНК-азу
Бесцветный	РНК позитивный контроль, 1 пробирка	25 мкл	10нг/мкл РНК

Хранение

- Рекомендуется хранить все компоненты при $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Защищать компоненты от попадания света. Продолжительное нахождение реагентов на свету может повлиять на флуоресценцию проб.
- Свести к минимуму количество циклов заморозки-оттаивания.

Оборудование и материалы, не включенные в набор

Следующие таблицы включают оборудование и материалы, необходимые для совместного использования с набором TaqMan[®] Influenza A/H5 Detection Kit Версии 1.0. За исключением отмеченного далее многие позиции, приведенные в списке, могут быть найдены у основного поставщика лабораторного оборудования (ОПЛО).

Таблица 3. Инструменты Applied Biosystems

Инструменты	Источник
ABI PRISM [®] 7000 Система определения последовательности	Свяжитесь с вашим местным торговым офисом компании Applied Biosystems.
Applied Biosystems 7900HT Быстрая ПЦР Система Реального Времени (использующая стандартный блок)	
Applied Biosystems 7500 ПЦР Система Реального Времени	
Applied Biosystems 7300 ПЦР Система Реального Времени	

Таблица 4. Материалы пользователя

Материалы	Источник
Планшеты, пробирки, крышки, по необходимости:	
<ul style="list-style-type: none"> • ABIPRISM[®] 96-Well Optical Reaction Plate (96-луночные оптические реакционные планшеты со штриховым кодом) (code 128), 20 планшетов 	Applied Biosystems (PN 4306737)
<ul style="list-style-type: none"> • ABIPRISM[®] Optical Adhesive Covers (Оптические адгезивные покрытия) и ABI PRISM[®] 96-Well Optical reaction Plate with Barcode (96-луночные оптические реакционные планшеты со штриховым кодом) (code 128), 100 планшетов с покрытиями 	Applied Biosystems (PN 4314320)
<ul style="list-style-type: none"> • ABIPRISM[®] Optical Tubes (Оптические пробирки) 	Applied Biosystems (PN 4316567)
	Applied Biosystems (PN 4323032)

• ABIPRISM® Optical Caps (Оптические крышки), (8 крышек/стрипов), 300 стрипов	
---	--

Таблица 4. Материалы пользователя (*Продолжение*)

Материалы	Источник
Планшеты, пробирки, крышки и покрытия, по необходимости (продолжение): • ABIPRISM® Optical Adhesive Cover Starter Kit (Стартовый набор оптических адгезивных покрытий) • Applied Biosystems Optical Adhesive Covers, 25 covers (Оптические адгезивные покрытия, 25 шт.) • MicroAmp™ Безбликовая поддерживающая основа	Applied Biosystems (PN 4313663) Applied Biosystems (PN 4360954) Applied Biosystems (PN 4312063)
Настольная центрифуга	Основной поставщик лабораторного оборудования (ОПЛО)
Резиновые перчатки	(ОПЛО)
Наконечники дозаторов, аэрозольустойчивые	(ОПЛО)
Дозаторы: Положительного вытеснения Воздушного вытеснения Многоканальные	(ОПЛО)
Стерильные микроцентрифужные пробирки с прикрепленной крышкой	(ОПЛО)
Не содержащая РНК-зу, стерильно фильтрованная вода.	(ОПЛО)
Центрифуга с адаптером для 96-луночных планшетов	(ОПЛО)
Вортекс	(ОПЛО)

Предотвращение загрязнения

Обзор

ПЦР анализ требует специальной лабораторной практики для предотвращения появления ложно-положительной амплификации (Kwok and Higuchi, 1989). Высокая чувствительность данного метода может приводить к амплификации единственной молекулы ДНК (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987).

Предотвращение загрязнения

- По возможности разделите рабочие области, оборудование и реагенты для:
 - подготовки образца;
 - постановки ПЦР;
 - ПЦР амплификации;
 - анализа ПЦР продуктов.

Примечание: Рабочая область может быть разделена путем использования чистого бокса или ПЦР бокса, который можно приобрести у основного поставщика лабораторного оборудования.

- Не работайте с продуктами амплификации в области подготовки ПЦР.
- Используйте чистую лабораторную одежду (не ту, в которой вы работали с ПЦР продуктами или проводили подготовку образцов) и чистые перчатки при приготовлении образцов для ПЦР амплификации.
- Смените перчатки, если вы подозреваете, что они загрязнены и перед тем, как вы покидаете рабочую область.
- Перед внесением позитивных контролей закройте все неизвестные образцы и пробирки с негативными контролями.
- Не открывайте пробирки с образцами в чистой области.
- Держите реакционные смеси и их компоненты закрытыми, когда не работаете с ними.
- Используйте позитивно-вытесняющие дозаторы или аэрозоль-устойчивые наконечники к дозаторам.
- Очищайте поверхности и оборудование свежеприготовленным 10% раствором отбеливателя.

ВАЖНО! Для того, чтобы избежать ложно-позитивного результата, не открывайте пробирки, прошедшие стадию амплификации в рабочей области.

Обзор процедуры детекции



Приготовление образцов РНК

Проверка процедуры подготовки образца РНК

Важно использовать высокоочищенную вирусную РНК, свободную от веществ, которые могут являться ингибиторами амплификации при выполнении данного анализа. Ожидается, что наиболее доступные коммерческие наборы для выделения вирусной РНК должны удовлетворять требованиям набора TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Версия 1.0, и набора Qiagen QIAamp® Viral RNA Mini Kit, которые использовались успешно во время выполнения данного теста. Однако компания Applied Biosystems не утвердила процедуру изоляции РНК для использования с этим протоколом. Вы должны утвердить вашу собственную процедуру.

Меры предосторожности при обработке



ВНИМАНИЕ

Биологическая Опасность. Биологические образцы, такие как ткани, жидкости тела, инфекционные агенты, кровь людей и животных являются потенциальным

источником заражения. Соблюдайте все предписанные государством или лабораторным регламентом меры предосторожности. Надевайте соответствующие защитные средства, такие как защитные очки, щиток для лица, лабораторный халат и перчатки. Все работы должны проводиться в специально оборудованных, обеспечивающих безопасность местах (например, физически изолирующее устройство). Пользователи должны обучаться в соответствии с предъявляемыми компанией/учреждением требованиями перед работой с потенциально инфицированным материалом. Прочтите и твердо придерживайтесь рекомендаций из следующих руководств и/или инструкций по применению:

- U.S. Department of Health and Human Services guidelines published in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (stock no. 017-040-00547-4; <http://bmbi.od.nih.gov>)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR 1910.1030; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html).
- Протоколы программы биологической безопасности вашей компании/учреждения для работы/манипуляций с потенциально инфицированным материалом. Дополнительную информацию по биологической безопасности вы можете найти на сайте <http://www.cdc.gov>

Подготовка ПЦР в реальном времени

Обзор

Подготовка РТ-ПЦР включает:

- подготовку планшетного документа;
- приготовление реагентной смеси;
- приготовление РНК позитивного контроля;
- внесение в лунки смеси, образцов и контролей;
- герметизацию планшета или пробирок.

Подготовка планшетного документа

Более подробную информацию о создании планшетного документа можно найти в инструкции, поставляемой с вашим анализатором.

Для того чтобы приготовить планшетный документ:

1	Создайте планшетный документ (Тип анализа = Определение абсолютного количества без стандартной кривой).																																						
2	Создайте или выберите детекторы с красителем FAM и красителем VIC для каждой реакции. Оставьте настройки гасителя в положении (none) или Non Fluorescent (не флуоресцентный).																																						
3	Температурные условия протекания реакции:																																						
<table border="1"> <tr> <th colspan="6">Время и температуры</th> </tr> <tr> <td rowspan="2">Начальный шаг UNG Обработка</td> <td rowspan="2">OT</td> <td rowspan="2">Деактивация UNG</td> <td colspan="3">40 Циклов</td> </tr> <tr> <td>Денатурация</td> <td colspan="2">Отжиг/ Наращивание цепи</td> </tr> <tr> <td>Выдержка</td> <td>Выдержка</td> <td>Выдержка</td> <td>Выдержка</td> <td colspan="2">Цикл</td> </tr> <tr> <td>1 мин.</td> <td>2 мин.</td> <td>30 мин.</td> <td>5 мин.</td> <td>20 сек.</td> <td>1 мин.</td> </tr> <tr> <td>72 °C</td> <td>50 °C</td> <td>60 °C</td> <td>95 °C</td> <td>94 °C</td> <td>58 °C</td> </tr> </table>							Время и температуры						Начальный шаг UNG Обработка	OT	Деактивация UNG	40 Циклов			Денатурация	Отжиг/ Наращивание цепи		Выдержка	Выдержка	Выдержка	Выдержка	Цикл		1 мин.	2 мин.	30 мин.	5 мин.	20 сек.	1 мин.	72 °C	50 °C	60 °C	95 °C	94 °C	58 °C
Время и температуры																																							
Начальный шаг UNG Обработка	OT	Деактивация UNG	40 Циклов																																				
			Денатурация	Отжиг/ Наращивание цепи																																			
Выдержка	Выдержка	Выдержка	Выдержка	Цикл																																			
1 мин.	2 мин.	30 мин.	5 мин.	20 сек.	1 мин.																																		
72 °C	50 °C	60 °C	95 °C	94 °C	58 °C																																		

Приготовление реагентной смеси

Готовьте реагентные смеси для анализа Influenza A и Influenza H5 отдельно. Каждая реагентная смесь содержит все необходимые для проведения реакции компоненты за исключением РНК пробы, позитивных и негативных контролей.

Для подготовки реагентной смеси:

1	Полностью растапливайте реагенты. ВАЖНО! Держите все реагенты на льду.
2	После оттаивания реагентов перемешайте содержимое каждой пробирки с компонентом с помощью Vortex.
3	Центрифугируйте пробирки с реагентами в течение короткого времени на микроцентрифуге для осаждения содержимого. ВАЖНО! Защищайте смесь с мишенью реакции от длительного нахождения на свету. После приготовления смеси поместите набор в морозильник $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4	Пометьте стерильную пробирку с названием первой мишени.
5	Вычислите объем компонентов, необходимых для выполнения анализа образцов, их повторностей и контролей (смотри Таблицу 5 на стр. 15). Компания Applied Biosystems рекомендует ставить три повторности для каждого образца. В таблице 5 на стр. 15 приведен список объемов для одной реакции и десяти реакций (три повторности для каждого образца, негативный контроль и РНК позитивный контроль плюс объем одной пробирки для компенсации погрешностей пипетирования).
6	Внесите необходимые объемы компонентов в пробирку со смесью реагентов, затем тщательно перемешайте путем переворачивания. ВАЖНО! Держите все пробирки на льду.
7	Повторите шаги с 4 по 6 для второй пробирки с мишенью.

Для подготовки реагентной смеси: (продолжение)

<p>⚠ Осторожно ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. AmpErase® uracil N-glycosylase может быть причиной раздражения кожи и глаз. Прочитайте РБИ и следуйте приведенным инструкциям. Надевайте подходящие защитные средства защиты глаз, халат и перчатки.</p> <p>Таблица 5. Компоненты и объемы реакционной смеси</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Компонент</th> <th>Объем для одной 50-мкл. Реакции (мкл.)</th> <th>Конечная концентрация</th> <th>Объем для десяти 50-мкл. Реакций (мкл)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Свободная от РНК-зы вода</td> <td>10.5</td> <td>–</td> <td>105.0</td> </tr> <tr> <td>5X TaqMan EZ Буфер</td> <td>10</td> <td>1X</td> <td>100.0</td> </tr> <tr> <td>Ацетат магния (25 мМ)</td> <td>6</td> <td>3 мМ</td> <td>60.0</td> </tr> <tr> <td>dATP (10 мМ)</td> <td>1.5</td> <td>300 мкМ</td> <td>15.0</td> </tr> <tr> <td>dCTP (10 мМ)</td> <td>1.5</td> <td>300 мкМ</td> <td>15.0</td> </tr> <tr> <td>dGTP (10 мМ)</td> <td>1.5</td> <td>600 мкМ</td> <td>15.0</td> </tr> <tr> <td>dUTP (20 мМ)</td> <td>2.0</td> <td>0.1 ед./мкл</td> <td>20.0</td> </tr> <tr> <td>rTth DNA Полимераза (2.5 U/мкл)</td> <td>0.5</td> <td>0.01 ед./мкл</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>AmpErase UNG (1</td> <td>5.0</td> <td>450 нМ</td> <td>50.0</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>праймеры</td> <td>400</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Компонент	Объем для одной 50-мкл. Реакции (мкл.)	Конечная концентрация	Объем для десяти 50-мкл. Реакций (мкл)	Свободная от РНК-зы вода	10.5	–	105.0	5X TaqMan EZ Буфер	10	1X	100.0	Ацетат магния (25 мМ)	6	3 мМ	60.0	dATP (10 мМ)	1.5	300 мкМ	15.0	dCTP (10 мМ)	1.5	300 мкМ	15.0	dGTP (10 мМ)	1.5	600 мкМ	15.0	dUTP (20 мМ)	2.0	0.1 ед./мкл	20.0	rTth DNA Полимераза (2.5 U/мкл)	0.5	0.01 ед./мкл	5.0	AmpErase UNG (1	5.0	450 нМ	50.0	40	праймеры	400	
	Компонент	Объем для одной 50-мкл. Реакции (мкл.)	Конечная концентрация	Объем для десяти 50-мкл. Реакций (мкл)																																								
	Свободная от РНК-зы вода	10.5	–	105.0																																								
	5X TaqMan EZ Буфер	10	1X	100.0																																								
	Ацетат магния (25 мМ)	6	3 мМ	60.0																																								
	dATP (10 мМ)	1.5	300 мкМ	15.0																																								
	dCTP (10 мМ)	1.5	300 мкМ	15.0																																								
	dGTP (10 мМ)	1.5	600 мкМ	15.0																																								
	dUTP (20 мМ)	2.0	0.1 ед./мкл	20.0																																								
	rTth DNA Полимераза (2.5 U/мкл)	0.5	0.01 ед./мкл	5.0																																								
	AmpErase UNG (1	5.0	450 нМ	50.0																																								
	40	праймеры	400																																									

	ед./мкл)			
--	----------	--	--	--

Приготовление РНК позитивного контроля

ВАЖНО! Будьте особо осторожны для того, чтобы избежать загрязнения неизвестных образцов РНК-позитивным контролем.

Для приготовления РНК-позитивного контроля:

1	Разморозьте РНК позитивный контроль, поставляемый в наборе.																								
2	Перемешайте содержимое пробирки для придания раствору однородности.																								
3	<p>Выполните серию разведений РНК позитивного контроля (10 нг/мкл) до предпочитаемой вами концентрации. Компания Applied Biosystems рекомендует конечные концентрации 0.1 фг/мкл (1 фг на реакцию), которая дает $C_t \sim 27 - 29$, затем запустите реакцию, используя условия протекания, приведенные на стр. 13.</p> <p>Таблица 6. Серия разведения и концентрация РНК позитивного контроля</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Концентрация позитивного контроля</th> <th>Объем РНК позитивного контроля</th> <th>Объем свободной от РНК-зы воды</th> <th>Общий объем</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100 пкг/мкл (1.0E+09 копий/мкл)</td> <td>5 мкл. Из 10 нг/ мкл. (из флакона с позитивным контролем)</td> <td>495 мкл.</td> <td>500 мкл.</td> </tr> <tr> <td>1 пкг/ мкл. (1.0E+07 копий/мкл.)</td> <td>5 мкл. Из 100 пг/ мкл. разведение</td> <td>495 мкл.</td> <td>500 мкл.</td> </tr> <tr> <td>10 фг/ мкл. (1.0E+05 копий/мкл.)</td> <td>5 мкл. Из 1 г/ мкл. разведения</td> <td>495 мкл.</td> <td>500 мкл.</td> </tr> <tr> <td>0.1 фг/ мкл. (1.0E+03 копий/мкл.)</td> <td>5 мкл. Из 10 фг/ мкл. разведения</td> <td>495 мкл.</td> <td>500 мкл.</td> </tr> <tr> <td>0.005 фг/ мкл. (50 копий/мкл.)</td> <td>5 мкл. из 0.1 фг/ мкл. разведения</td> <td>95 мкл.</td> <td>100 мкл.</td> </tr> </tbody> </table>	Концентрация позитивного контроля	Объем РНК позитивного контроля	Объем свободной от РНК-зы воды	Общий объем	100 пкг/мкл (1.0E+09 копий/мкл)	5 мкл. Из 10 нг/ мкл. (из флакона с позитивным контролем)	495 мкл.	500 мкл.	1 пкг/ мкл. (1.0E+07 копий/мкл.)	5 мкл. Из 100 пг/ мкл. разведение	495 мкл.	500 мкл.	10 фг/ мкл. (1.0E+05 копий/мкл.)	5 мкл. Из 1 г/ мкл. разведения	495 мкл.	500 мкл.	0.1 фг/ мкл. (1.0E+03 копий/мкл.)	5 мкл. Из 10 фг/ мкл. разведения	495 мкл.	500 мкл.	0.005 фг/ мкл. (50 копий/мкл.)	5 мкл. из 0.1 фг/ мкл. разведения	95 мкл.	100 мкл.
Концентрация позитивного контроля	Объем РНК позитивного контроля	Объем свободной от РНК-зы воды	Общий объем																						
100 пкг/мкл (1.0E+09 копий/мкл)	5 мкл. Из 10 нг/ мкл. (из флакона с позитивным контролем)	495 мкл.	500 мкл.																						
1 пкг/ мкл. (1.0E+07 копий/мкл.)	5 мкл. Из 100 пг/ мкл. разведение	495 мкл.	500 мкл.																						
10 фг/ мкл. (1.0E+05 копий/мкл.)	5 мкл. Из 1 г/ мкл. разведения	495 мкл.	500 мкл.																						
0.1 фг/ мкл. (1.0E+03 копий/мкл.)	5 мкл. Из 10 фг/ мкл. разведения	495 мкл.	500 мкл.																						
0.005 фг/ мкл. (50 копий/мкл.)	5 мкл. из 0.1 фг/ мкл. разведения	95 мкл.	100 мкл.																						


Внесение реагентной смеси, образцов и контролей

Для внесения:



1	<p>Для каждого исследования вашего образца или контроля:</p> <p>a. внесите 40 мкл. реагентной смеси Influenza A в соответствующие лунки;</p> <p>b. внесите 40 мкл. реагентной смеси Influenza H5 в соответствующие лунки.</p> <p>Примечание: Используйте новый наконечник для каждой реагентной смеси. Держите планшет и пробирки на льду.</p>
2	<p>Внесите 10 мкл РНК образца, разведенной РНК позитивного контроля или негативного контроля, в соответствующие лунки. Аккуратно перемешайте раствор путем пипетирования.</p> <p>ВАЖНО! Перемешивайте очень осторожно, удерживая наконечник у дна лунки для того, чтобы минимизировать образование аэрозоля и перекрестное загрязнение.</p> <p>Примечание: Используйте новый наконечник для каждой лунки, даже если пипетируете один и тот же образец или контроль.</p>
3	<p>Удостоверьтесь, что реагенты находятся на дне лунок. Если возможно, используйте центрифугу с планшетным адаптером для кратковременного центрифугирования планшета.</p>

Заклеивание планшета или пробирок



Для того чтобы заклеить планшет:

1.	<p>Поместите оптическую адгезивную пленку на планшет, затем разгладьте ровной гранью аппликатора возвратно-поступательными движениями вдоль продольной грани планшета</p> <p>ВАЖНО! Прилагайте значительные усилия, надавливая на аппликатор при выполнении всех шагов для того, чтобы полностью заклеить лунки. Давление необходимо для активации адгезивных свойств оптической пленки.</p>	
----	---	---

Для того чтобы заклеить планшет: (продолжение)

2	<p>Разгладьте пленку гранью аппликатора возвратно-поступательными движениями вдоль короткой (ширина) грани планшета.</p>	
3	<p>Проведите концом аппликатора горизонтально и вертикально между всеми лунками.</p>	
4	<p>Проведите концом аппликатора по периметру планшета, используя короткие возвратно-поступательные движения для полного заклеивания лунок снаружи.</p>	

Для того чтобы заклеить пробирки:

1	<p>Поместите стрипованные крышки на пробирки.</p>	
2	<p>ВАЖНО! Применяйте значительное давление на закрывающее устройство во всех шагах для полного закрывания крышек.</p> <p>Используя закрывающее устройство, прикрепите крышки на пробирки.</p> <p>Если вы используете роликовое закрывающее устройство:</p> <ul style="list-style-type: none">a. проведите, надавливая сверху, закрывающим устройством по всем стрипованным крышкам поперек, а затем вдоль планшета;b. проведите, надавливая сверху, закрывающим устройством по всем внешним рядам стрипованных крышек. <p>Если вы используете качающееся закрывающее устройство:</p> <ul style="list-style-type: none">a. вставьте пальцы в рукоятку устройства таким образом, чтобы лунки устройства были направлены вниз;b. расположите лунки устройства над первыми восьмью крышками в ряду;c. надавите, покачивая несколько раз, чтобы закрыть пробирки;d. повторите процедуру для оставшихся крышек в ряду, затем для всех оставшихся рядов.	 

Запуск анализа (Выполнение РТ-ПЦР)

Обзор

Запуск анализа включает в себя использование системы определения последовательности компании Applied Biosystems или системы ПЦР реального времени для анализа ваших образцов.

Перед тем как начать

Удостоверьтесь, что ваш прибор должным образом установлен и откалиброван. Для получения информации о калибровке, см. документацию, поставляемую с прибором.

Запуск анализа планшета

Для запуска анализа планшета:

1	Откройте документ планшета, который соответствует реакционному планшету.
2	Загрузите реакционный планшет в SDS или систему ПЦР реального времени.
3	Запустите прибор.

ВАЖНО! Для того чтобы избежать ложно-положительных результатов, а также амплифицирующегося материала в вашей рабочей области, не открывайте пробирки после амплификации.

Просмотр результатов

Обзор

Шаги, которые вы предпринимаете для того, чтобы просмотреть результаты, зависят от инструмента, который вы используете. Сверяйтесь с соответствующим инструменту руководством пользователя для получения инструкций о том, как выполнять анализ данных и просматривать результаты.

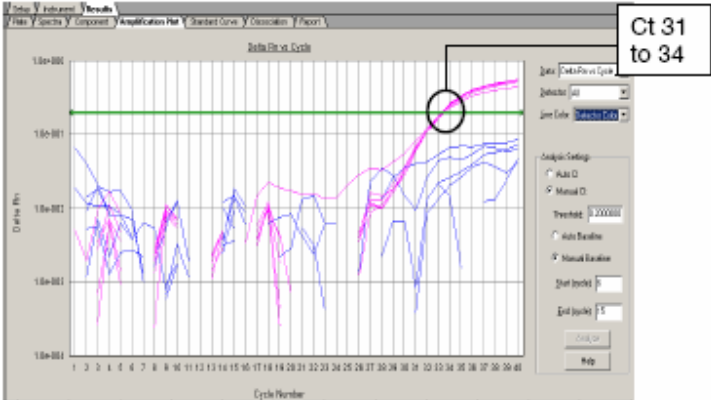
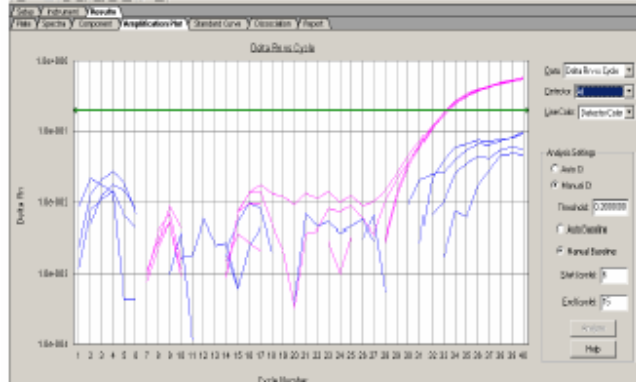
Просмотр результатов

Для того чтобы просмотреть результаты:

1	Просмотрите амплификационные графики лунок планшета.		
2	В том случае, если вы используете систему 7300/7500, проводите анализ данных, используя опцию ручной установки базовой линии (не автоматической), и сохраняйте значения базовой линии Ct по умолчанию (цикл с 3 по 15). Если вы используете Быструю систему 7000 или 7900HT, пропустите шаг 3. Данная система не имеет опции автоматического определения базовой линии.		
3	Проверьте каждый образец на наличие сигнала красителя FAM™ (мишень-специфический сигнал) и наличие сигнала красителя VIC® (IPC), затем интерпретируйте результаты:		
	FAM сигнал (мишень)	VIC сигнал (IPC)	Результат
	Присутствует	Присутствует	Позитивный. См. “Интерпретация результатов” на стр. 19.
	Присутствует	Отсутствует	Неверный – повторите анализ. См. “Приложение А: Разрешение проблем” стр. 23.
	Отсутствует	Присутствует	Негативный
	Отсутствует	Отсутствует	См. “Приложение А: Разрешение проблем” стр. 23.

Просмотр Результатов

Интерпретация результатов:

1	<p>Пример IPC сигнала во всех лунках. Сигнал для внутреннего позитивного контроля (детектор красителя VIC[®]) во всех лунках следует фиксировать Ct в диапазоне с 31 по 34 при пороговом значении по умолчанию равным 0.2. На рисунках 2 и 3 изображены графики амплификации для IPC и негативного контроля для проб Influenza A и H5.</p>  <p>Рисунок 2. Influenza A. Анализ IPC в амплификационном графике негативного контроля (система 7000 SDS, пороговое значение 0.2)</p>  <p>Рисунок 3. IPC анализ Influenza H5 графика амплификации негативного контроля (система 7000 SDS, пороговое значение 0.2)</p>
---	--

Интерпретация результатов: (продолжение)

2	<p>Если вы наблюдаете что-либо из приведенного ниже, см. “Приложение А: Разрешение проблем” на стр. 23:</p> <ul style="list-style-type: none"> • IPC отсутствует в лунках с негативным контролем, неизвестным или позитивным контролем; • IPC сигнал Ct выше, чем 34 в лунке с неизвестным образцом или позитивным контролем; • IPC сигнал Ct не соответствует сигналам в лунках с неизвестными образцами.
3	<p>Проверьте все лунки с негативным контролем. На рисунках 4 (ниже) и 5 на странице 20 изображены типичные амплификационные графики для негативного контроля Influenza A и Influenza H5.</p>

Отметьте тот факт, что вы можете видеть нижний сигнал в лунках негативного контроля (NTC – No Template Control) (детектор красителя FAM™) даже в отсутствии загрязнения. Данный сигнал представляет собой фоновый шум и обычно остается ниже порогового значения 0.2, принятого по умолчанию.

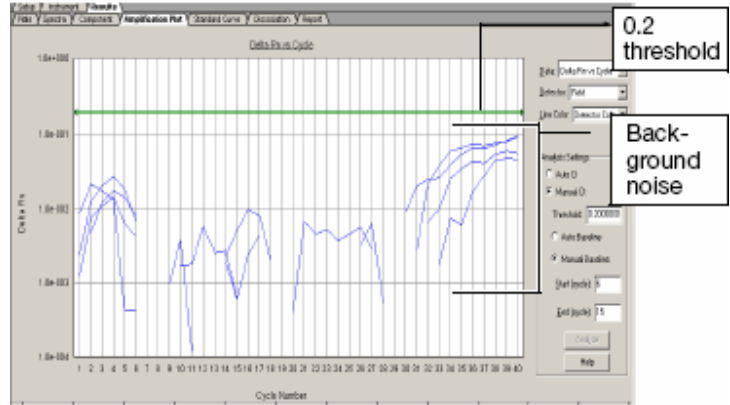


Рисунок 4. Influenza A анализ амплификационного графика негативного контроля (система 7000 SDS, пороговое значение 0.2)

Интерпретация результатов: (продолжение)

3

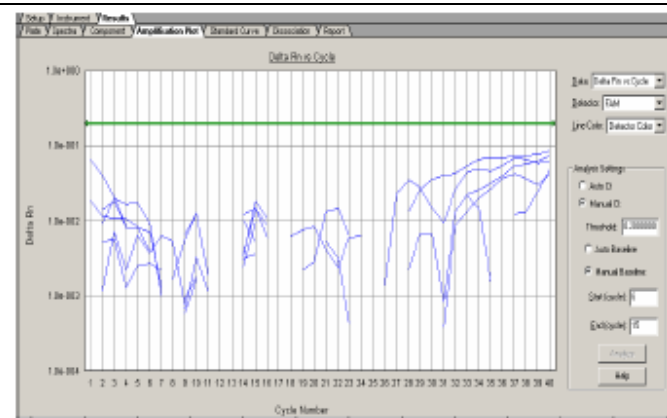


Рисунок 5. Амплификационный график негативного контроля теста на Influenza H5 (система 7000 SDS, пороговое значение 0.2)

4

Удостоверьтесь, что образцы с негативным контролем не показывают мишень-специфическую амплификацию (см. Рисунок 6 на странице 21 пример мишень-специфической амплификации).
Если вы наблюдаете мишень-специфическую амплификацию в лунке негативного контроля, см. “Приложение А: Разрешение проблем” на стр. 23.

5

В том случае, если какие-либо сигналы лунок с негативным контролем пересекают принятую по умолчанию пороговую линию 0.2 (такое встречается довольно редко) и не показывает мишень-специфическую амплификацию:

- вручную установите пороговую линию слегка выше сигнала какого-либо негативного контроля.

ВАЖНО! Не устанавливайте пороговую линию слишком высоко над уровнем шумовых сигналов. Это приведет к понижению чувствительности детекции позитивных образцов. Вы будете вынуждены понизить пороговую линию в случае, если она не пересекается с экспоненциальной фазой в лунках с позитивными сигналами (см. шаги 6 и 7).

- проведите повторный анализ.

Примечание: Установка порогового значения над сигналом негативного контроля изменит

значение Ct негативного контроля к “Неопределенный.”

Интерпретация результатов: (продолжение)

6 Проверьте графики амплификации всех лунок с положительными результатами. Истинно положительные образцы дают сигнал (детектор с красителем FAM™) с амплификационным графиком, который пересекает пороговую линию в пределах экспоненциальной фазы кривой.

На рисунках 6 и 7 изображены графики амплификации РНК позитивного контроля для Influenza A и H5 проб, определенных при 1000, 100 и 10 копий на реакцию.

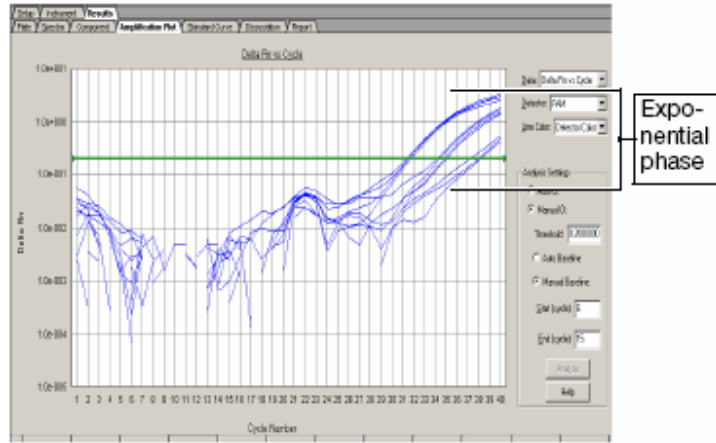


Рисунок 6. Influenza A тест РНК позитивного контроля.
Графики амплификации – 1000, 100, и 10 копий

Интерпретация результатов: (продолжение)

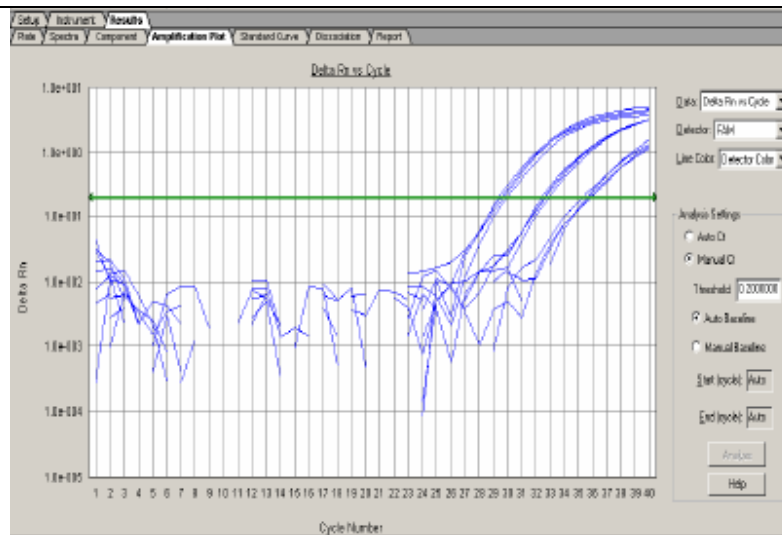


Рисунок 7. Influenza H5 тест РНК позитивного контроля.
Амплификационный график – 1000, 100, и 10 копий

7 В том случае, если вы настраиваете пороговую линию с шагом 5, удостоверьтесь, что кривая амплификации пересекается с новым положением пороговой линии в экспоненциальной фазе.
В том случае, если это условие не выполняется:
а. понизьте пороговую линию так, чтобы:
– в лунках с негативным контролем пороговая линия располагалась над кривыми шумового

	<p>фона;</p> <ul style="list-style-type: none">– в лунках с позитивными результатами амплификации пороговая линия пересекала кривую графика в экспоненциальной фазе; <p>b. выполните анализ заново.</p>
--	---

Приложение А: Разрешение Проблем

Наблюдаемая проблема	Возможная Причина	Действие
Отсутствует IPC или мишень-специфический сигнал регистрируется в неизвестной лунке.	Ингибируется обратная транскрипция или ПЦР.	Повторите процедуру пробоподготовки, затем повторно проведите анализ. Если обратная транскрипция или ПЦР все еще ингибируется, разведите образец (например, 1:5 или 1:10) для того, чтобы развести ингибитор, или используйте альтернативный метод очистки РНК.
	ПЦР реагенты TaqMan® EZ RT хранились с нарушением предписанных условий.	Повторите анализ, используя реагенты, которые хранились с соблюдением предписанных режимов хранения. Избегайте заморозки и оттаивания реагентов для анализа. Защищайте реагентную смесь от попадания света.
	Мишень-специфическая 10X смесь для анализа хранились с нарушением предписанных условий.	
Ошибка внесения компонентов (не добавлен какой либо из реагентов).	Проведите повторный анализ. Удостоверьтесь, что раствор реагентов внесен во все лунки.	
IPC (внутренний позитивный контроль) сигнал Ct выше чем 34 в лунках с неизвестным образцом или с позитивным контролем.	ОТ или ПЦР ингибируется	Повторите процедуру пробоподготовки, затем повторно проведите анализ. Если ОТ или ПЦР все еще ингибируются, разведите образец (например, 1:5 или 1:10) для разбавления ингибитора или используйте альтернативный метод очистки РНК.
Ct сигнала IPC противоречит результатам неизвестных ячеек.		
Сигнал IPC не обнаружен, но мишень-специфический сигнал присутствует.	Большое количество копий РНК мишени приводит к предпочтительной амплификации мишень-специфической РНК.	Разведите образец (например, в соотношении, 1:5 или 1:10), затем повторите анализ.
Мишень-специфический сигнал наблюдается в лунках с негативным контролем.	Перекрестное загрязнение.	Повторите анализ, используя свежие аликвоты всех реагентов, очистите дозаторы. В случае если негативные контроли показывают загрязнение, повторите анализ с использованием нового набора. В случае если негативный контроль все еще загрязнен, свяжитесь со службой технической поддержки компании Applied Biosystems.

Наблюдаемая проблема	Возможная Причина	Действие
Фиксируется мишень-специфический сигнал и отсутствует ИРС сигнал в лунках с негативным контролем.	<p>Перекрестное загрязнение и одно из приведенных ниже:</p> <ul style="list-style-type: none"> • большое количество копий РНК мишени приводит к предпочтительной амплификации мишень-специфической РНК; • проблема с амплификацией ИРС. 	Проверьте неизвестные образцы на наличие ИРС. В случае если ИРС сигнал присутствует в лунках с неизвестными образцами, вы можете исключить проблему с амплификацией ИРС. Повторите анализ с использованием свежих аликвот реагентов и очистите дозаторы.
ИРС сигнал или мишень-специфический сигнал отсутствуют в лунках с позитивным контролем.	Реагенты TaqMan® EZ RT-PCR хранились без соблюдения условий хранения.	Повторите анализ с использованием реагентов, хранившихся с соблюдением условий хранения. Избегайте заморозки и оттаивания реагентов для анализа. Защищайте реагентную смесь от попадания света.
	Мишень-специфическая смесь для анализа (10X Assay Mix) хранились без соблюдения условий хранения.	
Мишень-специфический сигнал не наблюдается в лунках с позитивным контролем.	Ошибка внесения (позитивный контроль не добавлен).	Повторите анализ. Удостоверьтесь, что вы внесли позитивный контроль в соответствующие лунки.
Результаты повторностей для данных образцов не соответствуют исходным.	Все лунки с повторностями для образцов не имеют одинаковые результаты.	<p>В случае, если результаты более чем в двух повторностях показывают одни и те же результаты, (например, вы запустили три повторности, и две повторности являются негативными, но одна повторность – позитивная), результаты, ассоциированные с большим количеством повторностей, являются, вероятно, более точными. Тем не менее, ваш лабораторный протокол может предписывать повторное проведение анализа с использованием свежих реагентов и образцов.</p> <p>В случае, когда вы запускаете только две повторности, и результаты не соответствуют друг другу, повторите анализ с использованием свежих реагентов и образцов.</p>

Приложение В: Специфичность и границы чувствительности

Список включения

Разработка анализа выполнялась для идентификации штаммов гриппа таким образом, чтобы учитывать результаты анализа возможных пар:

- **Негативный/Негативный** – Отсутствует подтип гриппа А/отсутствует подтип гриппа Н5.
- **Позитивный/Негативный** – Подтип гриппа А/отсутствует подтип гриппа Н5.
- **Позитивный/Позитивный** – Подтип гриппа А/Подтип гриппа Н5.

Оценивались образцы Н5Н1 как птичьего, так и человеческого происхождения с учетом их географического и территориального многообразия. Возбудители заболеваний дыхательных путей, не относящихся к штаммам гриппа, были также проверены на кросс-реактивность.

Штаммы, не представленные к рассмотрению в базе данных NCBI и не приведенные в данном Приложении, могут так же давать позитивный результат.

Таблица 7. Изоляты, не относящиеся к Н5 грипп А

Изоляты из птиц	Изоляты человека не-Н5
A/Quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2)	A/Hong Kong/54/98 (H1N1)
A/Duck/Hong Kong/Y280/97 (H9N2)	A/Hong Kong/1174/99 (H3N2)
A/Teal/Hong Kong/W312/97 (H6N1)	————

Таблица 8. Изоляты Н5 гриппа

Изоляты Н5 не человеческой природы	Н5 Изоляты человеческой природы
A/Gs/НК/437.6/99	A/НК/483/97
A/Gs/НК/739.2/02	A/НК/486/97
A/Dk/НК/821/02	A/НК/212/03
A/Ck/НК/31.4/02	A/НК/213/03
A/Ck/НК/96.1/02	A/Viet Nam/1203/2004
Ck/Vietnam/33/04	A/Thailand/MK2/2004

Таблица 8. Изоляты Н5 гриппа (продолжение)

Изоляты Н5 не человеческой природы	Н5 Изоляты человеческой природы
A/Thailand/AIV-1/04	————
СК/Indonesia/4/2004	————

Список исключений

Патогенные возбудители, не относящиеся к штаммам гриппа, и другие потенциальные мишени были проверены на генерацию ложно-позитивных результатов:

- аденовирусы,
- вирус гриппа В,
- вирусы парагриппа (группы 1, 2, 3, и 4),
- респираторно-синцитиальный вирус (RSV),
- вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV),
- ДНК человека,
- РНК человека,
- ДНК курицы,
- ДНК утки,
- вирус гриппа А-не-Н5 (для анализа Н5).

Границы чувствительности

Пробы как для гриппа А так и Н5, включенные в набор TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Версии 1.0, были разработаны для определения как минимум 100 копий РНК в 50 мкл реакционной смеси позитивного контроля.

Прогнозные включения

Основываясь на данных биоинформатического анализа, тесты, включенные в данный набор, точно соответствуют и определяют следующие штаммы (последовательности, представленные к рассмотрению NCBI с 2001 по 2005):

- тест на грипп А: 355 человеческих штаммов и 326 штаммов птиц,
- тест на грипп Н5: 16 человеческих штаммов и 273 штаммов птиц.

Примечание: Ожидается, что многие изоляты А и А/Н5 кроме тех, что предсказаны, будут давать позитивные результаты.

Литература

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125–128.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., et al. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.