

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 16.07.13г. № 32/6-17п/13

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«15» ноября 2012 г.

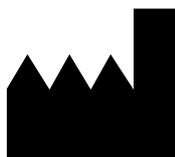


ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)
rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в
клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® Геноскрин-*IL28B-FL*»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	8
ФОРМАТ FRT	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации.....	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп».....	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	27

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
В-	- отрицательный контроль экстракции
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
SNP	- однонуклеотидный полиморфизм

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс[®] Геноскрин-*IL28B-FL*» предназначен для определения SNP rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в клиническом материале (цельная кровь или мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий)) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на экстракции тотальной ДНК человека из образцов клинического материала и проведении ПЦР-амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене *IL28B* и участка гена, кодирующего β-глобин человека, в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО). ВКО позволяет контролировать все этапы анализа и оценивать влияние ингибиторов ПЦР на результаты исследования.

Анализ одного образца проводится в двух пробирках, в одной из которых определяются SNP rs8099917 и ВКО, в другой - SNP rs12979860 и ВКО. Набор реагентов позволяет дифференцировать гомо- и гетерозиготное состояние по каждому

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

из исследуемых SNP. Набор разработан для приборов, имеющих три и более канала детекции флуоресценции. В таблице 1 указаны каналы, по которым детектируются нуклеотидные варианты исследуемых SNP и ВКО.

Таблица 1

Детекция SNP

Реакционная смесь	«rs17»	«rs60»
Канал для флуорофора	Выявляемые нуклеотиды	
FAM	T	T
JOE	G	C
ROX	ВКО	ВКО

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате:

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), РНК-буфер (1 пробирка), «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Объём экстракции, мкл	Вид клинического материала	Аналитическая чувствительность, копий/мл
100	Цельная кровь, мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий)	5×10^3

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми аллелями в пределах каждого исследуемого SNP при использовании высококонцентрированных положительных контрольных образцов и клинических образцов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в

соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда - «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-2009)
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-08) – при работе с формами комплектации 2 и 3.
3. «Гемолитик» – реагент для селективного лизиса эритроцитов крови при предобработке клинического материала (цельной периферической и пуповинной крови) (ТУ 9398-097-01897593-2010). При работе с формами комплектации 2 и 3 (при выделении ДНК из образцов цельной крови).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
5. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
6. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.
7. Пробирки объемом 0,5 мл для приготовления реакционной смеси (например, Axugen, США).
8. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

9. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
10. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл в штативах (например, Axugen, США).
11. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат: свежая цельная кровь, мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий).

Контейнер с материалом доставляется в лабораторию в емкости со льдом в течение сут.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

– Свежая цельная кровь

Взятие крови проводится в количестве 2,0 мл в одноразовую пробирку с 0,2 мл 3 % раствора ЭДТА. Закрытую пробирку с цельной кровью переворачивают 3-4 раза для равномерного перемешивания с ЭДТА. Допускается хранение образца цельной крови при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч.

– Мазок с внутренней поверхности щеки (буккальный эпителий)

Мазок берут сухим стерильным зондом с ватным тампоном. После получения материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку вместимостью 1,5-2,0 мл с крышкой с 0,5 мл «Транспортной среды для хранения и

транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-09). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают. Допускается хранение образца при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 сут.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

К комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагаются следующие реагенты:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

² При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене *IL28B* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>IL28B</i> rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>IL28B</i> rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО ДНК <i>IL28B</i> rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК <i>IL28B</i> rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 тестов (110 реакций амплификации), включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

К комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК человека, содержащих SNP rs8099917 и rs12979860 в гене *IL28B* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>IL28B</i> rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-1-FRT <i>IL28B</i> rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО ДНК <i>IL28B</i> rs8099917	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК <i>IL28B</i> rs12979860	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 тестов (220 реакций амплификации), включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

К комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-/L28B-FL»», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп», в соответствии с Приложением «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»».

В качестве отрицательного контроля экстракции (В-) используют **ОКО**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

1. Разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (один контроль экстракции ДНК, два контроля амплификации).

ВНИМАНИЕ! Каждый образец анализируется с использованием двух реакционных смесей, поэтому для каждого образца необходимо приготовить 2 пробирки.

3. Отобрать две пробирки объемом **0,5 мл** для приготовления реакционных смесей. Промаркировать пробирки «rs17» и «rs60».
4. Смешать в пробирке, промаркированной «rs17», следующие

реактивы из расчета на 1 реакцию: **5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT IL28B rs8099917** (см. также табл. 2).

5. Смешать в пробирке, промаркированной «rs60», следующие реактивы из расчета на 1 реакцию: **5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT IL28B rs12979860** (см. также табл. 2).

ВНИМАНИЕ! Реакционные смеси необходимо готовить с запасом на 1 образец (см. табл. 2).

6. Перемешать подготовленные смеси и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
7. Внести в пробирки, предназначенные для проведения амплификации, по **15 мкл** подготовленной реакционной смеси, т.е. реакционная смесь «rs17» вносится в пробирки, приготовленные для амплификации фрагмента, содержащего SNP rs8099917; реакционная смесь «rs60» вносится в пробирки, приготовленные для амплификации фрагмента, содержащего SNP rs12979860.
8. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов, причем каждый образец, в том числе отрицательный контроль экстракции (B-), необходимо внести в 2 пробирки, содержащие раскапанные реакционные смеси «rs17» и «rs60».
9. Поставить **контрольные реакции**:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (K-)** – внести в пробирки с раскапанными реакционными смесями «rs17» и «rs60» по **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (K+_{rs17})** – в пробирку с реакционной смесью «rs17» внести **10 мкл ПКО ДНК IL28B rs8099917**;
 - в) **положительный контроль ПЦР (K+_{rs60})** – в пробирку с реакционной смесью «rs60» внести **10 мкл ПКО ДНК IL28B rs12979860**.

Таблица 2

Схема приготовления реакционных смесей для варианта FRT-100 F

Объем реагента на одну реакцию (мкл)		10,00	5,00	0,50
Число клинических образцов	Число исследуемых точек ³	ПЦР-смесь-1-FRT ⁴	ПЦР-смесь-2-FRT ⁴	Полимераза (TaqF) ⁴
4	8	90	45	4,5
5	9	100	50	5,0
6	10	110	55	5,5
7	11	120	60	6,0
8	12	130	65	6,5
9	13	140	70	7,0
10	14	150	75	7,5
11	15	160	80	8,0
12	16	170	85	8,5

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа амплификации

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	40 с детекция флуоресц. сигнала		60	50 с детекция флуоресц. сигнала	

³ Число клинических образцов + 1 контроль этапа экстракции ДНК + 3 контроля ПЦР (N+4, N – количество клинических образцов).

⁴ Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

⁵ например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁶ например, iCycler iQ5, CFX96 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по трем каналам - для флуорофоров FAM⁷, JOE⁷ и ROX⁷.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 реакционного модуля в приборах роторного типа обязательно должна быть заполнена пробиркой из текущего эксперимента, содержащей реакционную смесь «rs17».

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам. В таблице 4 указаны каналы, по которым детектируются нуклеотидные варианты исследуемых SNP и ВКО.

Таблица 4

Реакционная смесь	«rs17»	«rs60»
Канал для флуорофора	Выявляемые нуклеотиды	
FAM	T	T
JOE	G	C
ROX	ВКО	ВКО

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *C_t* в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции однократно

⁷Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов

пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, **отрицательным** в случае отсутствия пересечения с пороговой линией (нет значения C_t или C_p) и **сомнительным** во всех других случаях.

ВНИМАНИЕ! Учет результатов для каждой реакционной смеси проводится отдельно!

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Учет результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считаются достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 5.

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Реакционная смесь	«rs17»			«rs60»		
Контроль	Значение порогового цикла, C_t по каналу для флуорофора					
	FAM	JOE	ROX	FAM	JOE	ROX
B-	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t
K-	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t	Отсутствует значение C_t
K ⁺ _{rs17}	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	–	–	–
K ⁺ _{rs60}	–	–	–	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Примечание : «–» на данной реакционной смеси не тестируется. Учет результатов в исследуемых клинических образцах (см. также табл. 6)

ВНИМАНИЕ! При использовании прибора планшетного типа просмотреть данные отдельно по каждому каналу для каждой ПЦР-смеси-1.

ПЦР-смесь-1	Канал для флуорофора			Обнаружен генотип
	FAM (T)	JOE (G)	ROX (ВКО)	
ПЦР-смесь-1-FRT «rs17»	+	-	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТТ
	-	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	GG
	для приборов <u>роторного типа</u>			
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТG
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТТ
	для приборов <u>планшетного типа</u>			
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТG
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	GG
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТТ
		FAM (T)	JOE (C)	ROX (ВКО)
ПЦР-смесь-1-FRT «rs60»	+	-	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТТ
	-	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	CC
	для приборов <u>роторного типа</u>			
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	CT
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТТ
	для приборов <u>планшетного типа</u>			
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	CT
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	CC
	+	+	значение Ct <u>меньше</u> граничного значения	ТТ

Примечание. Граничные значения **Ct** и **N** указаны во вкладыше к набору реагентов.

А. Учет результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs17»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение C_t только по каналам для флуорофоров **FAM** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу для флуорофора **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип TT»**.
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение C_t только по каналам для флуорофоров **JOE** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу для флуорофора **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то по SNP **rs8099917** выдается результат **«Обнаружен генотип GG»**.
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определены значения C_t по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE** и **ROX**, при этом значение C_t по каналу для флуорофора **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то
 - а) при использовании прибора роторного типа выдается результат **«Обнаружен генотип TG»** только в том случае, если значение C_t по каналу для флуорофора **FAM** превышает значение C_t по каналу для флуорофора **JOE**. Если значение C_t по каналу для флуорофора **FAM** меньше значения C_t по каналу для флуорофора **JOE**, результат по каналу для флуорофора **JOE** не учитывается и выдается результат **«Обнаружен генотип TT»**;
 - б) при использовании прибора планшетного типа выдается результат **«Обнаружен генотип TG»** только в том случае, если значение C_t по каждому из каналов для флуорофоров **FAM** или **JOE** не более чем на **N⁸** циклов превышает значение C_t по каналу для флуорофора **ROX**. Если по одному из каналов для флуорофоров **FAM** или

⁸Значение N для каждого типа прибора указано в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс[®] Геноскрин-*IL28B*-FL»», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

JOE значение *Ct* более чем на **N** циклов превышает значение *Ct* по каналу для флуорофора **ROX**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат «**Обнаружен генотип GG**» или «**Обнаружен генотип TT**».

4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси не определены значения *Ct* по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение *Ct* по каналу для флуорофора **ROX** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

Б. Учет результатов, полученных с использованием реакционной смеси «rs60»

1. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение *Ct* только по каналам для флуорофоров **FAM** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу для флуорофора **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат «**Обнаружен генотип TT**».
2. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определено значение *Ct* только по каналам для флуорофоров **JOE** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу для флуорофора **ROX** не превышает указанного во вкладыше, то по SNP **rs12979860** выдается результат «**Обнаружен генотип CC**».
3. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, определены значения *Ct* по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE** и **ROX**, при этом значение *Ct* по каналу для флуорофора **ROX** не превышает указанное во вкладыше, то
 - а) при использовании прибора роторного типа выдается результат «**Обнаружен генотип CT**», только в том случае, если значение *Ct* по каналу для флуорофора

FAM превышает значение Ct по каналу для флуорофора **JOE**. Если значение Ct по каналу для флуорофора **FAM** меньше значения Ct по каналу для флуорофора **JOE**, результат по каналу для флуорофора **JOE** не учитывается и выдается результат «**Обнаружен генотип TT**»;

б) при использовании прибора планшетного типа выдается результат «**Обнаружен генотип СТ**», только в том случае если значение Ct по каждому из каналов для флуорофоров **FAM** или **JOE** не более чем на N^9 циклов превышает значение Ct по каналу для флуорофора **ROX**. Если по одному из каналов для флуорофоров **FAM** или **JOE** значение Ct более чем на N циклов превышает значение Ct по каналу для флуорофора **ROX**, то результат по этому каналу не учитывается и выдается результат «**Обнаружен генотип СС**» или «**Обнаружен генотип TT**».

4. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси, не определены значения Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

5. Если в таблице результатов для пробы на данной реакционной смеси значение Ct по каналу для флуорофора **ROX** превышает указанное во вкладыше, независимо от полученных результатов по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE**, то необходимо повторить ПЦР-исследование для этого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Детальная информация по анализу и интерпретации результатов, полученных для исследуемых клинических образцов, в зависимости от типа используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и

⁹ Значение N для каждого типа прибора указано в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для определения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) rs8099917 и rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-*IL28B-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

rs12979860 в гене Интерлейкин-28В (*IL28B*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® Геноскрин-*IL28B-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ВНИМАНИЕ!

1. Если значение Ct для обеих контролей $K+_{rs17}$ или $K+_{rs60}$ отсутствует, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации.
2. Если значение Ct хотя бы в одной пробе с положительным контролем этапа ПЦР ($K+_{rs17}$ или $K+_{rs60}$) превышает указанное во вкладыше граничное значение, необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа амплификации, для всех образцов на той ПЦР-смеси-1, на которой были получены некорректные результаты для соответствующего $K+$.
3. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) на любой реакционной смеси по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE** детектируется положительный сигнал, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых на этой реакционной смеси по данному каналу в таблице результатов было получено значение Ct , начиная с этапа амплификации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разупаковать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs8099917 и ПЦР-смесь-1-FRT IL28B rs12979860 хранить в защищенном от света месте.

Реагенты «Гемолитик» и РНК-буфер, прилагающиеся к комплекту реагентов «РИБО-преп», хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс®** **Геноскрин IL28B-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹⁰.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Л. Никонов

¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре до 65 °С до полного растворения кристаллов.

A1. Подготовка клинического материала при выделении ДНК из крови

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
2. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по **1,0 мл гемолитика** и по **100 мкл** исследуемых образцов цельной крови в соответствии с маркировкой. Закрывать пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
3. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин; затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе; оставить на 5 мин.
4. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин.
5. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Полученный осадок лейкоцитов можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 2 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

A2. Подготовка клинического материала при выделении ДНК из мазков с внутренней поверхности щеки

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
2. Пробирки с мазками с внутренней поверхности щеки в «Транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков» тщательно перемешать, а затем коротко осадить на вортексе.
3. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести по **100 мкл** исследуемых образцов в соответствии с

маркировкой.

Б. Лизис клинического материала

1. В промаркированные пробирки с клиническим материалом и пробирку, предназначенную для отрицательного контроля экстракции, внести по **300 мкл раствора для лизиса**.
2. В пробирку отрицательного контроля экстракции (В-) внести **100 мкл ОКО**.
3. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
4. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, тщательно перемешать на вортексе.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 12 тыс g (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение 5 мин.
6. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
7. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
8. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
9. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.
10. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
11. Центрифугировать при **12 тыс g в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, тщательно отобрать

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.

13. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
14. Добавить в пробирки по **100 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
15. Центрифугировать пробирки при **12 тыс g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		Максимальное число тестов