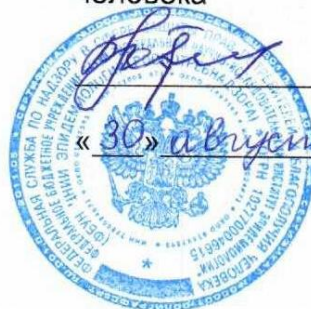


«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



А.В. Горелов

«30» августа 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*), цитомегаловируса (*CMV*) и вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® *EBV / CMV / HHV6*-скрин-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 И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	10
ФОРМАТ FRT	12
СОСТАВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
К–	– отрицательный контроль ПЦР
К+	– положительный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ПК	– положительный контроль экстракции
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
<i>CMV</i>	– цитомегаловирус человека
<i>EBV</i>	– вирус Эпштейна-Барр
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
<i>HHV6</i>	– вирус герпеса 6 типа

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *EBV / CMV / HHV6*-скрин-FL» предназначен для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (*EBV*), герпеса 6 типа (*HHV6*) и цитомегаловируса человека (*CMV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *CMV*, *EBV* и *HHV6* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участков ДНК данных микроорганизмов и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. При экстракции ДНК из

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

клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК возбудителя при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F.

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

Примечание – Форма 1 удалена.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для амплификации и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6) и цитомегаловируса человека (CMV) с гибридизационно-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

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность
Спинномозговая жидкость (ликвор), слюна, смывы и мазки из ротоглотки	РИБО-преп	400 копий/мл
Цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов	РИБО-преп	5 копий ДНК на 10^5 клеток

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК вируса герпеса 6 типа, вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса человека. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании референсного штамма цитомегаловируса человека AD 169, панели QCMD на Эпштейн-Барр вирус, а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других вирусов (вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус герпеса 8 типа, вирус Варицелла-Зостер, *Parvovirus B19* и др.), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и др.) и ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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, 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 Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, 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

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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 фильтром³. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) 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.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по

³ Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости и обратиться за медицинской помощью.
 - При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
 - Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

1. ГЕМОЛИТИК (РУ № ФСР 2010/09505) – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или «ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2009/05220).
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Проведение ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации. (ЗОНА 2):

5. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», «Ламинарные системы», Россия).
6. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
7. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемым прибором).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.
13. 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 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) - 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.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Материалом для исследования служит цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов, слюна, смывы и мазки из ротоглотки, спинномозговая жидкость (ликвор).

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- цельная периферическая и пуповинная кровь

Перед экстракцией необходимо провести предобработку крови: в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68°С на длительное время.

- белые клетки (лейкоцитарная масса) периферической и/или пуповинной крови

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку

с кровью центрифугировать в течение 20 мин при 800-1600 g (3 тыс об/мин), после этого отобрать белую пленку, образующуюся на поверхности отстоявшейся крови. Далее провести предобработку, описанную выше для цельной периферической и пуповинной крови. Допускается хранение белых клеток периферической и пуповинной крови при температуре не выше минус 68 °С в течение длительного времени.

Предобработку биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости (ликвора) проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Предобработка для слюны, смывов и мазков из ротоглотки не требуется.

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (*EBV*), герпеса 6 типа (*HHV6*) и цитомегаловируса человека (*CMV*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» –**включает:**

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>EBV / CMV / HHV6 / Glob</i>		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
РНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК <i>EBV / CMV / HHV6</i> и ДНК человека		Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (*EBV*), герпеса 6 типа (*HHV6*) и цитомегаловируса человека (*CMV*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» –**включает:**

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>EBV / CMV / HHV6 / Glob</i>		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
РНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО ДНК EBV / CMV / HHV6 и ДНК человека		Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки

К набору реагентов прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя программное обеспечение AmpliSens Soft Monitor FRT (в формате Microsoft® Excel) для автоматической обработки результатов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса человека и вируса герпеса 6 типа в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6-скрин-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл** ПКО ДНК *EBV/CMV/HHV6* и ДНК человека.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

- 1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Полимеразу (TaqF) (30 мкл) добавить в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.**

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

- 2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в качественном формате необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительный (ДНК-калибратор KSG2) и отрицательный контроль ПЦР (PHK-буфер). А для**

тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации ПЦР: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два повтора и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob* и заранее подготовленную смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
 - 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob*
 - 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в Приложении 1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, полученной в результате экстракции из клинических или контрольных образцов.
6. Для проведения качественного анализа:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку 10 мкл ДНК-калибратора KSG 2.Для проведения количественного анализа:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;
 - б) **калибраторы KSG1 и KSG2** – внести в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG1 и в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG2.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 1а и 1б).

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа⁴

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	20 с	Green, Yellow, Orange, Red (FAM, JOE, ROX, Cy5)	
	72	15 с	–	

Таблица 1б

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁵

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	Green, Yellow, Orange, Red (FAM, JOE, ROX, Cy5)	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

⁴ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

По каналу – **FAM/Green** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (BKO Glob)**, по каналу **JOE/HEX/Yellow** – **ДНК EBV**, по каналу **ROX/Orange** – **ДНК CMV**, по каналу **Cy5/Red** – **ДНК HHV6**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов (см. инструкцию для используемого прибора).

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.

Результат амплификации по каналу считается *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct*).

Результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК EBV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК CMV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX/Orange** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК HHV6 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **Cy5/Red** определено значение порогового цикла Ct , не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК EBV не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), **ДНК CMV не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX/Orange** не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), **ДНК HHV6 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **Cy5/Red** не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию). При этом в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение порогового цикла Ct не должно превышать указанное во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК ВКО Glob должно быть более **2000** копии/реакцию для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и более **500** для слюны, смывов и мазков из ротоглотки.

ВНИМАНИЕ! Для проб спинномозговой жидкости допустимо превышение значения порогового цикла Ct , указанного во вкладыше, по каналу для флуорофора **FAM/Green**, а количество ДНК ВКО Glob может быть менее 500 в случае количественного теста, т.к. в пробах спинномозговой жидкости может содержаться очень маленькое количество клеток.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) или выше порогового значение Ct по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow**, **ROX/Orange** или **Cy5/Red** и по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение Ct более указанного во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК

ВКО Glob менее **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, смывов и мазков из ротоглотки. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналам JOE/Yellow/HEX, ROX/Orange или Cy5/Red превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторях. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторях значений – результат считается **сомнительным**.

Для качественного теста в случае, если значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **FAM/Green** превышает указанное во вкладыше, отрицательный **результат считается недостоверным**.

Для количественного теста в случае, если ДНК ВКО Glob менее **2000** копии/реакцию для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** копий/реакцию для слюны, смывов и мазков из ротоглотки количественный положительный или отрицательный **результат считается недостоверным**.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+, KSG1, KSG2 (см. табл. 2, 3). Для количественного теста результаты по ПК должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 2

**Результаты для контролей ПЦР-исследования
в качественном формате**

Контроль	Контролируе- мый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+ (для качествен- ного теста)	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Таблица 3

**Результаты постановки контролей ПЦР-исследования
в количественном формате**

Контроль	Контролируе- мый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
KSG1, KSG2	ПЦР	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация

При экстракции тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах провести по формуле:

для *CMV*:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК_CMV_в_ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК_Glob_в_ПЦР-пробе}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right\} = \lg \{ \text{копий ДНК CMV} / 10^5 \text{ клеток} \}$$

для EBV:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК_EBV_в_ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК_Glob_в_ПЦР-пробе}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right\} = \lg \{ \text{копий ДНК EBV} / 10^5 \text{ клеток} \}$$

для HHV6:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК_HHV6_в_ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК_Glob_в_ПЦР-пробе}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right\} = \lg \{ \text{копий ДНК HHV6} / 10^5 \text{ клеток} \}$$

При экстракции тотальной ДНК из слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора) расчет концентрации ДНК на мл образца (КПДНК HHV6) проводится по формуле:

$$\text{КПДНК} = \text{КДНК} \cdot 100 \text{ (копий/мл)}$$

КДНК - количество копий ДНК EBV в пробе ДНК или количество копий ДНК CMV в пробе ДНК или количество копий ДНК HHV6 в пробе ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 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.

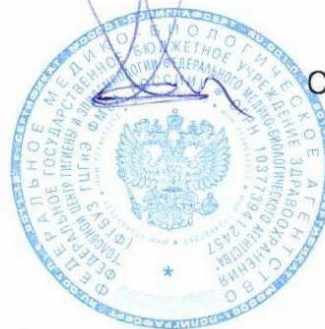
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob* хранить в защищенном от света месте.

Заведующий НПЛ ОмДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, e-mail: cs@pcr.ru)⁶.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл, включая объем пробы ДНК - 10 мкл			
объем реагентов на одну реакцию		10,0	5,0
число клинических образцов		ПЦР-смесь-1-FRT <i>EBV/ CMV/ HHV6 /</i> Glob *	Смесь ПЦР-смеси-2- FRT и полимеразы (TaqF) *
для количественного определения	для качественного определения		
1	4	70	35
2	5	80	40
3	6	90	45
4	7	100	50
5	8	110	55
6	9	120	60
7	10	130	65
8	11	140	70
9	12	150	75
10	13	160	80
11	14	170	85
12	15	180	90
13	16	190	95
14	17	200	100
15	18	210	105
16	19	220	110
17	20	230	115
18	21	240	120
19	22	250	125
20	23	260	130
21	24	270	135
22	25	280	140
23	26	290	145
24	27	300	150
25	28	310	155
30	33	360	180

* – Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек ((2 ДНК-калибратора KSG1, KSG2 (по два повтора) и отрицательный контроль РНК-буфер) для количественного определения ДНК и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Изготовитель