

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

« 12 » декабря 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® ННУ8-скрин/монитор-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	12
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	18
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	22
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	24
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	26
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN).....	28
СОСТАВ.....	28
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	28
А. Подготовка проб для амплификации	28
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	30
В. Анализ и интерпретация результатов.....	31
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	36
СОСТАВ.....	36
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	36
А. Подготовка проб для амплификации	36
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	37
В. Анализ и интерпретация результатов.....	39
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	44
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	44
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВГЧ-8	- вирус герпеса человека 8
ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека)
ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® *HHV8*-скрин/монитор-FL предназначен для количественного определения ДНК вируса герпеса человека 8 (*Human gammaherpesvirus 8*, ВГЧ-8, *HHV8*) в биологическом материале (плазма венозной крови, цельная венозная кровь, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, слюна, биологические (плевральная, асцитическая) жидкости, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на герпесвирусную инфекцию, ассоциированную с ВГЧ-8, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма, ДНК экзогенного и эндогенного ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. При экстракции ДНК из биологического материала, содержащего клетки (цельная венозная кровь, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал, тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках), происходит амплификация участка ДНК β -глобинового гена человека (эндогенного внутреннего контроля). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

Амплификация участков ДНК проводится при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют

флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК ВГЧ-8 основывается на существовании линейной зависимости между логарифмом исходной концентрации ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, C_t). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. ДНК-калибраторы и положительный контроль аттестованы по методике Изготовителя. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК участка β -глобинового гена (ВКО Glob)	ДНК ВГЧ-8	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	β -глобиновый ген	ген минорного капсидного белка	искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон измерения и предел обнаружения

Таблица 2

Вид биологического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для амплификации и детекции	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Плазма венозной крови	—	«РИБО-преп»	100	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN, «ПЦР-комплект» вариант FRT-L	300	500–1x10 ⁷
		«МАГНО-сорб»	200			
Цельная венозная кровь	—	«РИБО-преп»	100			
		«МАГНО-сорб»	200			
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	«Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков»	«РИБО-преп»	100			
		«МАГНО-сорб»	200			
Слюна	—	«РИБО-преп»	100			
Биологические (плевральная, асцитическая) жидкости	—	«РИБО-преп»	100			

Вид биологического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для амплификации и детекции	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«РИБО-преп»	100			
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	—	«РИБО-преп»	100			

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участок ДНК ВГЧ-8 (клинический образец, содержащий ДНК ВГЧ-8 в концентрации не менее 10^4 копий/мл, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также геномной ДНК человека:

- Штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США): *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Haemophilus influenzae* (ATCC® 33930™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 27736™), *Listeria grayi* (ATCC® 25401™), *Listeria innocua* (ATCC® 33090™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Moraxella catarrhalis* (ATCC® 25240™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 15442™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™), *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC® 43300™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™), *Staphylococcus haemolyticus* (ATCC® 29970™), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC® 49907™), *Streptococcus agalactiae* (ATCC® 12386™), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™) в концентрации не более 1×10^8 и не менее 1×10^4 копий/мл;

- Клинические изоляты панели штаммов и изолятов, находящейся в распоряжении ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Enterovirus* spp., *Human alphaherpesvirus 1* (вирус герпеса человека 1), *Human alphaherpesvirus 2* (вирус герпеса человека 2), *Human alphaherpesvirus 3* (вирус герпеса человека 3), *Human betaherpesvirus 5* (вирус герпеса человека 5), *Human betaherpesvirus 6A/B* (вирус герпеса человека 6A/B), *Human betaherpesvirus 7* (вирус герпеса человека 7), *Human gammaherpesvirus 4* (вирус герпеса человека 4), *Human gammaherpesvirus 8* (вирус герпеса человека 8), *Human polyomavirus 1*, *Human polyomavirus 2*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Primate erythroparvovirus 1*, *Streptococcus pneumoniae*, *Toxoplasma gondii* в концентрации не более 1×10^7 и не менее 1×10^4 копий/мл;
- ДНК человека в концентрации 0,2 мг/мл.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Воспроизводимость и повторяемость исследования

Воспроизводимость и повторяемость исследования определены путем тестирования положительных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия, содержащего ДНК ВГЧ-8, до конечных концентраций 1×10^4 и 1×10^6 копий/мл (см. табл. 3, 4).

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах, на разных сериях набора реагентов.

Таблица 3

Воспроизводимость

АмплиСенс® HNV8-скрин/ монитор-FL	Комплект для экстракции	Выяв- ляемый патоген	Ожидаемое значение концент- рации, копий/мл	Коли- чество повто- ров	Среднее значение измерения концентра- ции, lg	Стандарт- ное отклонение (SD)	Кoeffи- циент вариации (CV), %
Форма 1	«РИБО- преп»	ВГЧ-8	6,0	30	5,8	0,15	2,6
			4,0	30	3,9	0,18	4,6
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-8	6,0	30	5,9	0,12	2,1
			4,0	30	3,9	0,13	3,3
Форма 2	«РИБО- преп»	ВГЧ-8	6,0	30	6,0	0,29	4,9
			4,0	30	4,1	0,30	7,5
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-8	6,0	30	6,2	0,34	5,5
			4,0	30	4,1	0,32	8,0

Таблица 4

Повторяемость

АмплиСенс® HNV8-скрин/ монитор-FL	Комплект для экстракции	Выяв- ляемый патоген	Ожидаемое значение концент- рации, копий/мл	Коли- чество повто- ров	Среднее значение измерения концентра- ции, lg	Стандарт- ное отклонение (SD)	Кoeffи- циент вариации (CV), %
Форма 1	«РИБО- преп»	ВГЧ-8	6,0	10	5,8	0,07	1,1
			4,0	10	3,9	0,09	2,3
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-8	6,0	10	5,8	0,03	0,6
			4,0	10	3,9	0,07	1,8
Форма 2	«РИБО- преп»	ВГЧ-8	6,0	10	6,0	0,18	3,0
			4,0	10	4,1	0,13	3,0
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-8	6,0	10	6,2	0,23	3,7
			4,0	10	4,1	0,19	4,8

Правильность

Правильность определена путем тестирования положительных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведения стандартного образца предприятия, содержащего ДНК ВГЧ-8, до конечных концентраций 1×10^4 и 1×10^6 копий/мл (см. табл. 5).

Правильность

АмплиСенс® HNV8-скрин/ монитор-FL	Комплект для экстрак- ции	Выявляе- мый патоген	Коли- чество повторов	Ожидаемое значение концентра- ции, Ig	Среднее значение измерения концентрации, Ig	Системати- ческая погрешность (В), %
Форма 1	«РИБО- преп»	ВГЧ-8	30	6,0	5,8	-3,3
			30	4,0	3,9	-2,5
	«МАГНО- сорб»		30	6,0	5,9	-1,7
			30	4,0	3,9	-2,5
Форма 2	«РИБО- преп»	ВГЧ-8	30	6,0	6,0	0,0
			30	4,0	4,0	0,0
	«МАГНО- сорб»		30	6,0	6,1	1,7
			30	4,0	4,0	0,0

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы образцы биологического материала пациентов с подтвержденным диагнозом по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10): «С46 Саркома Капоши» и «D47.7 Болезнь Кастлемана», модельные образцы биологического материала с добавлением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК ВГЧ-8, до концентраций 1×10^4 - 1×10^6 копий/мл, а также биологический материал условно-здоровых доноров крови и пациентов с соматической патологией при отсутствии клинических проявлений острого инфекционного заболевания.

В качестве референтного метода использовалась система QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР (QX100 droplet digital PCR) (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, РУ № ФСЗ 2012/13278).

Результаты представлены в табл. 6 и 7.

**Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® *HHV8*-скрин/монитор-FL в сравнении с
референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® <i>HHV8</i> -скрин/монитор-FL		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Плазма венозной крови	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200
Цельная венозная кровь	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200
Слюна	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200
Биологические (плевральная, асцитическая) жидкости	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	Всего исследовано 400 образцов	положительных	200	0
		отрицательных	0	200

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® HNV8-скрин/монитор-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность² (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма венозной крови	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %
Цельная венозная кровь	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %
Слюна	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %
Биологические (плевральная, асцитическая) жидкости	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	100 (98,2 - 100) %	100 (98,2 - 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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 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 обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514), «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
3. Вакуумная система забора крови типа Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).
4. Лабораторная центрифуга с принадлежностями (например, настольная центрифуга ALLEGRA X-12, Beckman Coulter Inc. («Бекмен Культер, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл,

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», или аналогичный).
6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 7. Забуференный формалин для фиксации тканей или специализированные растворы, предназначенные для фиксации ткани с целью последующих молекулярно-биологических исследований (например, FineFIX (Formalin Substitute), MILESTONE, Италия, или аналогичные).
 8. Одноразовые стерильные скальпели (например, «Полимерные изделия», Россия, или аналогичные) или одноразовые скарификаторы (например, «Медикон», Россия, или аналогичные).
 9. Одноразовые заворачивающиеся полипропиленовые пробирки объемом 2 мл с винтовой горловиной, с коническим дном и юбкой устойчивости (свободностоящие) с крышками, снабженными уплотняющей кольцевой прокладкой и петлями, необходимыми для прикрепления крышки (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

10. «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514).
11. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505).
12. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
14. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
15. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения предварительной обработки тканевого материала.
16. Термошейкер для микропробирок и ПЦР-планшетов (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
17. о-Ксилол, химически чистый (хч), или промышленно

производимый депарафинизирующий агент (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные).

18. 96% раствор этанола, 70% раствор этанола.
19. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
20. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
21. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
22. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
23. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
25. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

26. Комплект реагентов для экстракции ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции «Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция ДНК из исследуемых образцов») «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265).
27. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

28. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 FN:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.

- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
29. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 30. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 31. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 32. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 34. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»), Россия и другие, рекомендованные Изготовителем).
 35. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 36. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 37. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма венозной крови,
- цельная венозная кровь,
- мазки со слизистой оболочки ротоглотки,
- слюна,
- биологические (плевральная, асцитическая) жидкости,
- тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал,
- тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках.

Плазма венозной крови

Для получения образцов плазмы венозной крови взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку с ЭДТА (специальная вакуумная система типа Vacuette (сиреневые крышки – 6% ЭДТА)). После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого центрифугируют пробирки с цельной венозной кровью при 0,6 тыс g (3 тыс об/мин) в течение 10 минут при комнатной температуре (от 18 до 25 °С). Полученную плазму отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы венозной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 5 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Цельная венозная кровь

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку с ЭДТА (специальная вакуумная система типа Vacuette (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА)). После взятия крови пробирку

следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов цельной венозной крови до проведения предварительной подготовки:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток с момента взятия биологического материала.

Недопустимо замораживание образцов цельной венозной крови!

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие мазка проводят при помощи сухого стерильного зонда с тампоном вращательными движениями с поверхности небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия мазка рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Аккуратно обламывают полистирольную палочку на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставляют рабочую часть зонда с биологическим материалом в пробирке. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Допускается хранение образцов мазков со слизистой оболочки ротоглотки до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Слюна

Перед получением слюны следует провести полоскание полости рта водой. Слюну забирать в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл или в пластиковые стерильные контейнеры объемом 50-60 мл в количестве не менее 0,5 мл.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Плевральная жидкость

Плевральная пункция (плевроцентез или торакоцентез) проводится с помощью специального инструмента, иглы или пластикового катетера, который прокалывает грудную стенку и позволяет вывести жидкость. Взятие плевральной жидкости в количестве не менее 0,5 мл проводят в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом не менее 2 мл или контейнеры.

Допускается хранение плевральной жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Асцитическая жидкость

Лапароцентез проводится при помощи прокалывания брюшной стенки специальным инструментом, представляющим собой металлическую трубку и вставленную в нее трехгранную иглу. После прокола иглу извлекают и выводят жидкость. Взятие асцитической жидкости в количестве не менее 1,0 мл проводят в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом не менее 2 мл или контейнеры.

Допускается хранение асцитической жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал

Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка.

Образцы ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки объемом 2 мл с добавлением 500 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Пробирку плотно закрывают.

Образцы ткани диаметром более 5 мм помещают в одноразовые пластиковые контейнеры с широким горлом объемом не менее 50 мл.

Допускается хранение тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала до проведения предварительной подготовки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках отбирается, транспортируется и хранится для проведения молекулярно-биологических исследований согласно Приказу МЗ РФ №179н от 24.03.2016 г. «О правилах проведения патолого-анатомических исследований».

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использование кислого формалина для фиксации тканевого материала.

Отбор образцов проводится двумя способами:

1. Парафиновые блоки нарезать на микротоме для парафиновых срезов, используя отдельный одноразовый нож для каждого типа биологического материала. Образцы (4-5 срезов общим размером 2-3 мм³ без учета объема парафина) при помощи пинцета перенести в стерильную одноразовую пробирку объемом 2,0 мл с винтовой горловиной с крышкой, снабженной уплотняющей кольцевой прокладкой и петлей, необходимой для прикрепления крышки.

2. Из парафинового блока с помощью стерильного одноразового скальпеля или скарификатора извлечь фрагменты ткани размером 2-3 мм³ (без учета объема парафина). Образцы перенести в стерильную одноразовую пробирку объемом 2,0 мл с винтовой горловиной с крышкой, снабженной уплотняющей кольцевой прокладкой и петлей, необходимой для прикрепления крышки.

Допускается хранение тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках до проведения предварительной подготовки при температуре от 18 до 25 °С – длительно, не допуская плавления парафиновых блоков.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы венозной крови, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, образцы слюны, плевральной и асцитической жидкостей не требуют предварительной подготовки.

Образцы цельной венозной крови, тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала и тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках требуют предварительной подготовки.

Цельная венозная кровь

Отобрать 250 мкл цельной венозной крови в одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Добавить 1 мл «Гемолитика». Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10-15 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 4 тыс g (8 тыс об/мин) в течение 3 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, оставив 100 мкл 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 должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции комплектом «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в

соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно).

Допускается хранение предварительно обработанных с помощью раствора для лизиса образцов цельной венозной крови до проведения экстракции при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал

Тканевой материал (биопсийный, операционный, аутопсийный) диаметром менее 5 мм, помещенный в пробирки объемом 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)», не требует предварительной подготовки.

Тканевой материал (биопсийный, операционный, аутопсийный) диаметром от 5 до 10 мм поместить в стерильную фарфоровую ступу и измельчить пестиком. В полученный гомогенат добавить 1 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и тщательно перемешать пестиком. Для экстракции ДНК используют 100 мкл полученной суспензии.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов до проведения экстракции:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках

Отобранные образцы тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках необходимо депарафинизировать с помощью реагентов, предназначенных для этой цели, например, о-ксилола, а затем провести серию отмылок с понижающейся концентрацией раствора этилового спирта (аналогично стандартной гистологической проводке). В случае использования коммерческих растворов для депарафинизации действовать согласно инструкции по применению. Для экстракции ДНК берут 100 мкл образца без фрагментов стромальной ткани.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов до проведения экстракции:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной венозной крови и плазмы венозной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной венозной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке;
- образцы тканевого материала в парафиновых блоках, фиксация которого была проведена с использованием кислого формалина.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 8).

Были протестированы образцы без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 8. Все образцы исследуемого материала содержали стандартный образец предприятия с концентрацией ДНК ВГЧ-8 1×10^3 копий/мл.

Таблица 8

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Комплект для экстракции	Наличие интерференции
Плазма венозной крови	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Проспидин	200 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Литий гепарин ⁴	от 12 до 30 МЕ/мл	«РИБО-преп»	<u>Обнаружено</u>
				«МАГНО-сорб»	<u>Обнаружено</u>
Калий ЭДТА ⁴	2,0 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено		
		«МАГНО-сорб»	Не обнаружено		
Цельная венозная кровь	Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы 21 мкмоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Общий холестерин	77,6 ммоль/л (верхняя граница нормы 7,8 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Триглицериды	37,6 ммоль/л (верхняя граница нормы 3,7 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы 170 г/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено	
			«МАГНО-сорб»	Не обнаружено	
	Экзогенные вещества	Литий гепарин ⁴	от 12 до 30 МЕ/мл	«РИБО-преп»	<u>Обнаружено</u>
				«МАГНО-сорб»	<u>Обнаружено</u>
		Калий ЭДТА ⁴	2,0 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Проспидин		200 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено	
			«МАГНО-сорб»	Не обнаружено	
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Муцин	0,15 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5%	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено

⁴ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрациях от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрациях от 12 до 30 МЕ/мл.

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Комплект для экстракции	Наличие интерференции
Слюна	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
		Муцин	0,15 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5%	«РИБО-преп»	Не обнаружено
Биологическая (плевральная, асцитическая) жидкость	Эндогенные вещества	Альбумин	500 мг/л	«РИБО-преп»	Не обнаружено
		Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Проспидин	200 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Проспидин	200 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал в парафиновых блоках	Экзогенные вещества	Формалин кислый	—	«РИБО-преп»	<u>Обнаружено</u>
		Формалин забуференный	—	«РИБО-преп»	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» – для экстракции ДНК из плазмы венозной крови, цельной венозной крови, мазков со слизистой оболочки ротоглотки, слюны, биологических (плевральной, асцитической) жидкостей, тканевого (биопсийного,

операционного, аутопсийного) материала, тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала в парафиновых блоках;

- «МАГНО-сорб» – для экстракции ДНК из плазмы венозной крови, цельной венозной крови, мазков со слизистой оболочки ротоглотки.

Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ПКО HNV8** и **90 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 FN);

– **100 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **20 мкл ПКО HNV8** и **180 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 FN);

– **100 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN – комплект реагентов для амплификации участка ДНК ВГЧ-8 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>HHV8</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
К1 <i>HHV8</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 <i>HHV8</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО <i>HHV8</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию

требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *HHV8*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *HHV8***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL *HHV8***, **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *HHV8*** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **ДНК-калибратор K1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл K1 *HHV8***.
 - б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл K2 *HHV8***.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
 - г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ПКО *HHV8*.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 9).

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX**. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК человека (ВКО Glob)	ДНК ВГЧ-8	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВГЧ-8, ДНК человека (ВКО Glob) и ДНК ВКО-FL в копиях/реакцию. Полученные значения используются для расчета количества копий ДНК ВГЧ-8 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-8 на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО-FL на реакцию}} \times A \times B = \text{копий/мл}$$

где:

A – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

B – число копий ВКО в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

Полученные значения концентрации ДНК ВГЧ-8 (при экстракции из цельной венозной крови и тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала) могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВГЧ-8 на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВГЧ-8 производят согласно формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-8 на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-8 на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

Примечание – Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно количества клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для выражения относительной концентрации ДНК ВГЧ-8 в lg копий на стандартное количество клеток используется коэффициент пересчета:

$$10^5 \text{ клеток} = 2 \times 10^5 \text{ геномов человека}$$

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента B указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

Принцип интерпретации результатов при проведении исследования указан в таблице 11:

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
Невалидный (при исследовании цельной венозной крови и тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае, если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
Невалидный (при исследовании мазков со слизистой оболочки ротоглотки)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
ДНК ВГЧ-8 не обнаружена	Значение <i>Ct</i> для ДНК ВГЧ-8 отсутствует или больше граничного, а по каналу для флуорофора ROX определено значение <i>Ct</i> меньше граничного
Менее 500 копий ДНК ВГЧ-8/мл	ДНК ВГЧ-8 обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
X x 10 ^Y копий ДНК ВГЧ-8/мл	ДНК ВГЧ-8 обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов
более 1x10 ⁷ копий ДНК ВГЧ-8/мл	ДНК ВГЧ-8 обнаружена в концентрации больше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К– (например, в 10 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного
К-	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t и диапазон концентрации ПКО *HNV8* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
- Расчитанная концентрация ПКО *HNV8* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определены значения порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация

- реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК;
- б) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию отрицательного контроля экстракции. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участка ДНК ВГЧ-8 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>HHV8-Lyo</i>	Порошок белого цвета	—	96 пробирок объемом 0,2 мл
K1 HHV8	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K2 HHV8	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО HHV8	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью *HHV8-Lyo*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K1 HNV8**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K2 HNV8**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО HNV8**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 13).

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного⁷ и планшетного⁸ типа**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX**. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и

⁷ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁸ Например, CFX 96 (Bio-Rad), ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК человека (ВКО Glob)	ДНК ВГЧ-8	ДНК ВКО-FL

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

На основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВГЧ-8, ДНК человека (ВКО Glob) и ДНК ВКО-FL в копиях/реакцию. Расчет количества копий ДНК ВГЧ-8 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов проводится по формуле:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-8 на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО-FL на реакцию}} \times A \times B = \text{копий/мл}$$

где:

A – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

B – число копий ВКО в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

Полученные значения концентрации ДНК ВГЧ-8 (при

экстракции из цельной венозной крови и тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала) могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВГЧ-8 на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВГЧ-8 производят согласно формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-8 на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \times 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-8 на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

Примечание – Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для выражения относительной концентрации ДНК ВГЧ-8 в lg копий на стандартное количество клеток используется коэффициент пересчета:

10^5 клеток = 2×10^5 геномов человека.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента В указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

Принцип интерпретации результатов при проведении исследования указан в таблице 15:

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
Невалидный (при исследовании цельной венозной крови и тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
Невалидный (при исследовании мазков со слизистой оболочки ротоглотки)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
ДНК ВГЧ-8 не обнаружена	Значение <i>Ct</i> для ДНК ВГЧ-8 отсутствует или больше граничного, а по каналу для флуорофора ROX определено значение <i>Ct</i> меньше граничного
менее 500 копий ДНК ВГЧ-8/мл	ДНК ВГЧ-8 обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
$X \times 10^y$ копий ДНК ВГЧ-8/мл	Рассчитанное значение концентрации (копий/мл) находится в пределах диапазона измерения набора реагентов
более 1×10^7 копий ДНК ВГЧ-8/мл	ДНК ВГЧ-8 обнаружена в концентрации больше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К– (например, в 10 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 16 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного
К-	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t и диапазон концентрации ПКО *HNV8* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
2. Рассчитанная концентрация ПКО *HNV8* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определены значения порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на

- каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК;
- б) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию отрицательного контроля экстракции. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *HNH8*. ПЦР-буфер-Н, ПЦР-смесь-FL *HNH8* хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *HNH8* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *HNH8*-Lyо хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

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, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru⁹.

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 набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления