

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2011 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris* и

Ehrlichia chaffeensis методом полимеразной цепной реакции

в режиме реального времени

**«РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum* / *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*»
(комплект 2)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum* / *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*» предназначен для выявления ДНК *Anaplasma phagocytophilum* (возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ)), ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* (возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ)), выделенной из биологических проб с помощью набора «РеалБест экстракция 100», методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью набора «РеалБест экстракция 100».

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного («Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия)), так и планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (НПФ ДНК-Технология, Россия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum* / *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора и суспензии клещей.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные образцы.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и н.с. Лаборатории ПЦР Бондаренко Е.И.

4

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе метода ПЦР в режиме реального времени лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителей инфекций в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* из клинического материала или суспензий клещей совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок, каждая на 10 определений;
- раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2,0 мл);
- раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 флакона (по 4,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis* (по стандартной панели предприятия образцов контрольных сывороток) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С (например, «Атлант», Республика Беларусь; или аналогичный);
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- пестик металлический (фирма ЗАО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахуген, США, или аналогичные);
- хладоэлемент (например, МХД-1, фирма «Термо-Конт МК», Россия; или аналогичный);
- штатив-холодильник (например, IsoFreeze, фирма SSI, США; или аналогичный);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа могут быть использованы: лейкоцитарная фракция человека, сыворотка (плазма) крови, биоптат, суспензия клещей.

6.2. Подготовка образцов клещей.

Исследуемых клещей, либо пулы клещей (*до 10 голодных – не пивших особей; до 3 пивших клещей*) *рода Ixodes* поместить в пронумерованные пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл. Клещей *рода Dermacentor* исследовать индивидуально.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (*масло, бензин и т.п.*), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку (см п. 6.2.1). В случае анализа не пивших клещей можно сразу приступить к приготовлению суспензии клещей (см п. 6.2.2).

6.2.1. Предварительная промывка клещей

Добавить в каждую пробирку с клещом 300 мкл (*500 мкл при анализе пулов*) 96% этанола, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя, не касаясь клеща, используя отдельные наконечники для каждой пробы. Далее внести в пробирки

Р

по 500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхнуть пробирки на шейкере и сбросить капли со стенок пробирок центрифугированием 15 сек при 7000 об/мин; удалить жидкость из пробирок с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя.

6.2.2. Приготовление суспензии клещей

Для приготовления суспензий клещей следует использовать раствор РПО, входящий в состав набора.

Метод 1: Заморозить пробирки с клещами в жидком азоте (минимум 5 мин) или морозильной камере при температуре от минус 50 до минус 80 °С в течение 20 мин. Достать одну замороженную пробирку и сразу тщательно растереть клеща (*пул клещей*), прижимая материал ко дну пробирки с помощью отдельного стерильного пестика. Для этой процедуры удобно использовать металлические пестики производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

Для приготовления суспензии к измельченному образцу, не вынимая пестика, добавить раствор РПО:

250 мкл – в случае одиночного клеща *рода Ixodes*;

500 мкл – в случае одиночного клеща *рода Dermacentor*;

500 мкл – при гомогенизации пула клещей.

После проведения процедуры гомогенизации поместить пестик в дезинфицирующий раствор, выдержать не менее 2 часов, промыть водой, протереть салфеткой, смоченной 70% этиловым спиртом, и дать пестику высохнуть. Перед работой металлическую часть пестика прокалить над пламенем спиртовки.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере в течение 5-10 сек. Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Центрифугированием 15 сек при 10000 об/мин сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать для выделения НК 100 мкл суспензии клещей *рода Ixodes* или 50 мкл суспензии клещей *рода Dermacentor*.

Выделение ДНК из клещей проводить с помощью набора «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции. На заключительном этапе выделенную НК образца растворить в 200 мкл элюирующего раствора.

Метод 2: В пробирки с клещами *рода Ixodes* внести по 20 мкл раствора РПО (в случае анализа пивших клещей, больших размеров, клещей *рода Dermacentor* или пулов клещей внести 30-50 мкл РПО так, чтобы раствор покрывал их). Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок, поместить пробирки в охлажденный до минус 20°С штатив-холодильник и заморозить в морозильной камере в течение 20 мин при температуре минус 30 °С. Далее поместить штатив с анализируемыми образцами в емкость со льдом либо на охлажденный хладоэлемент, или на термоизолирующую поверхность (например, пенопласт). Достать одну пробирку с клещом (пулом клещей), замороженным в РПО, и максимально быст-

9

ро, не дожидаясь растаивания раствора, тщательно измельчить клеща с помощью отдельного стерильного пестика.

Далее порядок действий аналогичен описанным выше в методе 1, за исключением того, что при доведении объема суспензии раствором РПО необходимо сделать поправку на объем РПО (20-50 мкл), первоначально внесенный в пробирку для измельчения клеща.

Выделение ДНК из клещей проводить с помощью набора «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции.

6.3. Подготовка лейкоцитарной фракции

В пробирку типа «Eppendorf» внести 1,5-2,0 мл цельной крови, взятой с раствором ЭДТА, и центрифугировать в течение 10 мин при 800 об/мин; собрать верхний слой плазмы (~500 мкл) с лейкоцитами, перенести его в другую чистую пробирку и центрифугировать в течение 10 мин при 13000 об/мин; удалить основную часть надосадочной жидкости, а осадок клеток и 200 мкл оставшейся на дне жидкости использовать для выделения НК с помощью набора «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции.

6.4. Подготовка ликвора

Спинномозговую жидкость (1-1,5 мл) центрифугируют при 13 000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносят в контейнер с дезраствором, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости используют для выделения НК с помощью набора «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции.

6.5. Хранение материала

Клещей предпочтительно хранить в живом виде при температуре от 2 до 8 °С во влажной среде в течение 1 недели. Подготовленный материал (суспензии клещей) хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 ч.

В замороженном виде клещей и суспензии клещей хранить при температуре от минус 18 до минус 60 °С в течение 2 недель; при температуре минус 60°С (и ниже) не более 12 мес.

Внимание! Допускается однократное замораживание-оттаивание образцов!

6.6. Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с реакционной смесью для ПЦР (РС) и выдержать их при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут.

***Внимание!** 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.*

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 10 мин при температуре от 18 до 25 °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

После восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °С не более 7 дней.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

***Внимание!** Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.*

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. В пробирку, маркированную ОКО, внести 25 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку. В пробирку, маркированную ПКО, внести 25 мкл положительного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку. Плотно закрыть крышки пробирок.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Проведение анализа с помощью амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q»).

Далее по тексту каналы детекции и термины, соответствующие модели амплификатора «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q» указаны в скобках.

7.6.1. Поместить пробирки в амплификатор.

Внимание! Лунка №1 ротора обязательно должна содержать какой-либо исследуемый образец.

7.6.2. Программирование прибора:

- 1) Нажать кнопку «New» в основном меню программы.
- 2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента «Advanced» и выделить «Dual Labeled Probe». Нажать кнопку «New».
- 3) Выбрать ротор на 36 лунок «36-Well Rotor», и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками (отметить, что кольцо закреплено). Нажать кнопку «Next».
- 4) В открывшемся окне выбрать объем реакционной смеси 50 мкл. Нажать кнопку «Next».
- 5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку «Edit Profile» и задать следующие параметры:

1. Hold 50°C – 2 мин
 2. Cycling 95°C – 2 мин
 3. Cycling (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек).
- Cycle repeats (количество циклов) – 50 times.

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C в каналах FAM, JOE и ROX (для прибора «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q» – в каналах Green, Yellow и Orange).

- 6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку «OK».

7) В окне «New Run Wizard» («Мастер нового теста») нажать кнопку «Calibrate» («Опт. Уровень сигнала»). В открывшемся окне в строке «Channel Settings» («Установки канала») выбрать канал «ROX» («Orange»), нажать «Add» («Добавить»). Установить «Tube Position» («Позиция пробирки») 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10 («Нужный диапазон стартового сигнала» 5FL до 10 FL). Нажать «OK».

В строке «Channel Settings» («Установки канала») выбрать канал «FAM» («Green»), нажать «Add» («Добавить»). Установить «Tube Position» («Позиция пробирки») 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10 («Нужный диапазон стартового сигнала» 5FL до 10 FL). Нажать «OK».

В строке «Channel Settings» («Установки канала») выбрать канал «JOE» («Yellow»), нажать «Add» («Добавить»). Установить «Tube Position» («Позиция пробирки») 1, «Min Reading» 5, «Max Reading» 10 («Нужный диапазон стартового сигнала» 5FL до 10 FL). Нажать «OK».

a

Отметить галочкой «Perform Calibration Before 1st Acquisition» («Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции»). Нажать кнопку «Close» («Заккрыть»).

8) Нажать кнопку «Next» («Далее»), запустить амплификацию кнопкой «Start run» («Старт»).

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием «РеалБест» с расширением *.ret. Тогда при дальнейшей работе программа РеалБест будет представлена в списке «New» в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Start run» в файл с расширением *.rex.

7.7. Проведение анализа с помощью амплификатора планшетного типа.

7.7.1. Поместить пробирки в амплификатор.

7.7.2. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7.3. Задать протокол проведения амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

7.7.4. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* и ВКО:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Anaplasma phagocytophilum* следует выбрать канал детекции «HEX».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* следует выбрать канал детекции «ROX».

7.7.5. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.7.6. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов ПЦР в случае использования амплификатора «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q»).

8.1.1. Анализ результатов амплификации ВКО:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis», выбрать режим анализа «Quantitation», нажать кнопку «Cycling A. FAM» («Cycling A. Green»), «Show» («Показать»).
- 2) Отменить автоматический выбор «Threshold» («порога»), нажав кнопку ОК в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу «Linear scale» («Линейная шкала»).
- 4) В меню основного окна «Quantitation analysis» («Количественный анализ») должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» («Динамический фон») и «Slope Correct» («Корректировка уклона»).
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») («Устранение выбросов») установить значение «NTC threshold» («Процент от наибольшего изменения флуоресценции») 5%.
- 6) В меню «CT Calculation» («Вычисление СТ» в правой части окна) выставить Threshold = 0,04.
- 7) В таблице результатов окно «Quant. Results» («Количественные результаты») появятся значения Ст.

8.1.2. Анализ результатов амплификации ДНК *A. phagocytophilum*:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis» («Анализ»), выбрать режим анализа «Quantitation» («Количественный»), нажать кнопку «Cycling A. JOE» («Cycling A. Yellow»), «Show» («Показать»).
- 2) Отменить автоматический выбор «Threshold» («Порога»), нажав кнопку «ОК» в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу «Linear scale» («Линейная шкала»).
- 4) В меню основного окна «Quantitation analysis» («Количественный анализ») должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» («Динамический фон») и «Slope Correct» («Корректировка уклона»).
- 5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») («Устранение выбросов») установить значение «NTC threshold» («Процент от наибольшего изменения флуоресценции») 10%.

8.1.3. Анализ результатов амплификации ДНК *E. muris*/*E. chaffeensis*:

- 1) Нажать в меню кнопку «Analysis» («Анализ»), выбрать режим анализа «Quantitation» («Количественный»), нажать кнопку «Cycling A. ROX» («Cycling A. Orange»), «Show» («Показать»).
- 2) Отменить автоматический выбор «Threshold» («Порог»), нажав кнопку «ОК» в появившемся окне.
- 3) Нажать клавишу «Linear scale» («Линейная шкала»).

4) В меню основного окна (Quantitation analysis) («Количественный анализ») должны быть нажаты две кнопки «Dynamic tube» («Динамический фон») и «Slope Correct» («Корректировка уклона»).

5) В меню «Quant. Settings» («More Settings») («Устранение выбросов») установить значение NTC threshold («Процент от наибольшего изменения флуоресценции») 5%.

6) В меню «CT Calculation» («Вычисление СТ») выставить Threshold (порог) = 0,04.

7) В таблице результатов (окно «Quant. Results») («Количественные результаты») появятся значения C_t .

8.2. Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США) проводится программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов). При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов проводится в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Anaplasma phagocytophilum* (канал «JOE»/«Yellow»/«HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «JOE»/«Yellow»/«HEX» и «ROX»/«Orange».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять C_t ВКО.

9.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ehrlichia muris* и/или *Ehrlichia chaffeensis*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Anaplasma*

phagocytophilum, если для этого образца значение C_t по каналу «JOE»/«Yellow»/«HEX» меньше или равно 40.

9.7. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналам «JOE»/«Yellow»/«HEX» и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.8. Если для ОКО значение C_t по каналам «JOE»/«Yellow»/«HEX», «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum*/*Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum*/*Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis» (комплект 2), следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru.

Н. с. Лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»

Е.И. Бондаренко

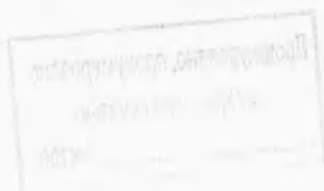
Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России

д.м.н., профессор В.В. Долгов
«28» ноября 2011 г.



Подпись В.В. Долгов
удостоверяю.
Специалист по кадрам М.А. Давыдов
Подпись _____
" _____"





Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
13 листов

Д (Терехина Е.А.)