

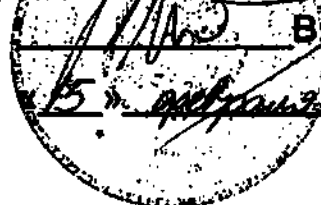
УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ

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



В.И.Покровский

2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения
ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	8
ФОРМАТ FRT	10
СОСТАВ.....	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	11
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	11
Б. Проведение амплификации детекцией в режиме «реального времени»	13
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей.....	19
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	20

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
K+	– положительный контроль ПЦР
K–	– отрицательный контроль ПЦР
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзо ра	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HHV6	– вирус герпеса 6 типа

НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление HHV6 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и ПЦР), но и оценивать адекватность взятия

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

материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *HHV6* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

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

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК, амплификацию и количественное определение ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность
Спинномозговая жидкость (ликвор), слюна, смывы и мазки из ротоглотки	«РИБО-преп»	400 копий/мл
Цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов	«РИБО-преп»	5 копий ДНК <i>HHV6</i> на 10^5 клеток

Линейный диапазон измерения набора реагентов: 500 – 10 000 000 копий/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК вируса герпеса 6 типа. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) – при работе с формой комплектации 2. Для экстракции ДНК из биоптатов рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008).
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

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

5. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
6. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
7. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми прибором).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.
13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

– цельная периферическая и пуповинная кровь

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

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

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку с кровью центрифугировать в течение 20 мин при 800-1600 g (3 тыс об/мин), после этого отобрать белую пленку, образующуюся на поверхности отстоявшейся крови. Далее провести предобработку, описанную выше для цельной периферической и пуповинной крови. Допускается хранение белых клеток периферической и пуповинной крови при температуре не выше минус 68 °C в

течение длительного времени.

Предобработку биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости (ликвора) проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г. Предобработка для слюны, смывов и мазков из ротоглотки не требуется.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

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

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

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

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО ДНК HHV6 и ДНК человека.

При использовании формы выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

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

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

2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в качественном формате необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации: положительный (ДНК-калибратор KSG 2) и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). А для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два повтора и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.
3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FRT *HHV6 / Glob* и заранее подготовленную смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
 - 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *HHV6 / Glob*
 - 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в Приложении 1.

ВНИМАНИЕ! При одновременном исследовании 60 образцов возможна упрощенная схема приготовления смеси: все содержимое одной пробирки ПЦР-

ФОРМАТ FRT

смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *HHV6* / Glob.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, выделенной из клинических или контрольных образцов.
6. Для проведения качественного анализа:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-калибратора KSG 2

Для проведения количественного анализа:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;
- б) калибраторы KSG1 и KSG2 – внести в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG1 и в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG2.

Б. Проведение амплификации детекцией в режиме «реального времени»

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

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа³

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

³ Например, Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁴

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, HEX/ JOE	
	72	15 с	—	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

По каналу – **FAM/Green** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (BKO Glob)**, по каналу **JOE/HEX/Yellow** – **ДНК HNV6 (ПКО ДНК HNV6 + ДНК человека)**

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

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

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

Результаты интерпретируются следующим образом:

– **ДНК HNV6 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** определено значение порогового

⁴ Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

цикла C_t , не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК HHV6 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение порогового цикла C_t не превышает указанное во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК ВКО Glob более **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и более **500** для слюны, смывов и мазков из ротоглотки. Для проб спинномозговой жидкости допустимо превышение значения порогового цикла C_t , указанного во вкладыше, по каналу для флуорофора **FAM/Green**, а количество ДНК ВКО Glob может быть менее 500 в случае количественного теста, т.к. в пробах спинномозговой жидкости может содержаться очень маленькое количество клеток.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) или выше порогового значения C_t по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow**, и по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение C_t более указанного во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК ВКО Glob менее **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, смывов и мазков из ротоглотки. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

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

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

ФОРМАТ FRT

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

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены правильные результаты прохождения контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+, KSG1, KSG2 (см. табл. 2). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

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

Таблица 2

Результаты постановки контролей ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green		JOE/HEX/Yellow	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение C_t и расчетная концентрация	-	Определено значение C_t и расчетная концентрация

При экстракции тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК **HHV6** на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах провести по формуле:

ФОРМАТ FRT

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

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

$$\text{КП ДНК HHV6} = \text{КДНК HHV6} \cdot 100 \text{ (копии/мл)}$$

К ДНК HHV6- количество копий ДНК HHV6 в пробе ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁵.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №



Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

⁵ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

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

* - Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек ((2 ДНК-калибратора KSG1, KSG2 (по два повтора) и отрицательный контроль РНК-буфер) для количественного определения ДНК HHV6 и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК HHV6.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



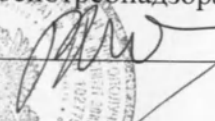
Дата изготовления



Производитель

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 20 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 В.В.Малеев

