

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
«30» _____ 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Varicella-Zoster virus* (VZV)
в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® VZV-FL»

АмплиСенс®



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	8
СОСТАВ	9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	11
А. Подготовка пробирок для амплификации	11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	12
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	13
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей.....	17
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	18

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

BKO STI-87	– экзогенный внутренний контрольный образец
K–	- отрицательный контроль ПЦР
K+	- положительный контроль ПЦР
OK	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
VZV	– <i>Varicella-Zoster virus</i> (вирус Варицелла-Зостер)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® VZV-FL» предназначен для выявления ДНК Варицелла-Зостер вируса (VZV) путем амплификации специфического фрагмента ДНК вируса методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из образцов плазмы периферической крови, плазмы пуповинной крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (СМЖ), содержимого везикул, слюны, смывов и мазков из ротоглотки.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление VZV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (BKO-STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК VZV при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в

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

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 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 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 и амплификацию ДНК VZV с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК VZV с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 3 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл
Плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, амниотическая жидкость, СМЖ, содержимое везикул, слюна, смывы и мазки из ротоглотки.	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	500

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК VZV. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результатов методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других вирусов (вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус человека, вирус простого герпеса I и II типа, вирус герпеса человека 6 типа, вирус кори, *Rubella virus*, *Parvovirus B19*), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и др.), а также в отношении ДНК *Toxoplasma gondii*.

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».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и

возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения (ЗОНА 1), продолжать в Зоне Амплификации и Детекции (ЗОНА 2). Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например, NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 2.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

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

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл: 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).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служат: плазма периферической крови, плазма пуповинной крови, амниотическая жидкость, СМЖ, содержимое везикул, слюна, смывы и мазки из ротоглотки.

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК VZV с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL VZV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК VZV-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

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

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 ДНК *Varicella-Zoster virus* (VZV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® VZV-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87 (в каждый образец добавляется 10 мкл ВКО STI-87). В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) вносится **100 мкл ОКО**.

В работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

При использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) порядок работы смотри в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Varicella-Zoster virus* (VZV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® VZV-FL» разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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 исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С 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 одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации: положительный (ПКО ДНК VZV) и отрицательный контроль ПЦР (ТЕ-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.
3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FL VZV 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-FL VZV
 - 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 с ПЦР-смесью-1-FL VZV и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК VZV-FL**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

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

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа³

Цикл	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	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	–	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

³ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или аналогичные.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ДНК ВКО (ВКО STI-87)**,
- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК VZV**.

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

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в «реальном 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 C_t).

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК VZV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК VZV не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора **JOE** и по каналу для флуорофора **FAM** значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, у которых значения C_t по каналу для флуорофора **JOE**

превышают указанный порог, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторях. В случае получения воспроизводимого положительного значения C_t – результат считается положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторях значений – результат считается **сомнительным**.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора FAM
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение отсутствует

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора **JOE** отсутствует или превышает указанное граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК VZV.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу для флуорофора **JOE** и/или для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE** зафиксировано значение порогового цикла C_t , это свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
3. Если значение C_t по каналу для флуорофора **FAM** (внутренний контроль) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют, – это означает сбой этапа экстракции. Необходимо повторить анализ для этих образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Если для анализируемого образца значение C_t по каналу для флуорофора **FAM**

(внутренний контроль) превышает указанное граничное значение, а значение C_t по каналу для флуорофора **JOE** (ДНК VZV) больше значения, указанного во вкладыше, то необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа экстракции. Высокие значения C_t могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.

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. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL VZV хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-1-FL VZV, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® VZV-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)⁶.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО "РМАПО Росздрава"
д.м.н., профессор

В.В.Долгов



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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

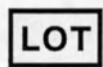
Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций	
	10,0	5,0
Число клинических образцов	ПЦР-смесь-1-FL VZV*	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
4	70	35
5	80	40
6	90	45
7	100	50
8	110	55
9	120	60
10	130	65
11	140	70
12	150	75
13	160	80
14	170	85
15	180	90
16	190	95
17	200	100
18	210	105
19	220	110
20	230	115
21	240	120
22	250	125
23	260	130
24	270	135
25	280	140
26	290	145
27	300	150
28	310	155
33	360	180

*Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК VZV.

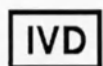
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Код партии



Изделие для in vitro диагностики



Дата изменения



Ограничение температуры



Верхнее ограничение температуры



Производитель



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Максимальное
число тестов



Использовать до



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Не допускать
попадания
солнечного света



Дата изготовления

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 18 листа 26

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.В.Малеев

