

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 15.05.2012 № 2352-Пр/12

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

15.05.2012 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 Новогиревская, 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
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	— эндогенный внутренний контрольный образец
K+	— положительный контроль ПЦР
K-	— отрицательный контроль ПЦР
OK	— отрицательный контроль экстракции
ОКО	— отрицательный контрольный образец
ПК	— положительный контроль экстракции
ПКО	— положительный контрольный образец
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	— Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
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

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

Формат FRT Форма 1: REF TR-V10-T(RG.Q.Mx) REF HK1-0941-1-1;

Форма 2: REF R-V10-T(RG.Q.Mx) REF H-0942-1-1 VER 15.02.12 стр. 3 из 22

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 материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *HHV6* при помощи специфических к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) 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! 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, биопаты внутренних органов	«РИБО-преп»	5 копий ДНК <i>HHV6</i> на 10^6 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».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, использовать 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 односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. 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

Проведение предварительной подготовки материала:

1. ГЕМОЛИТИК (ТУ 9398-097-01897593-2010) – реагент для преобработки цельной периферической и пуповинной крови (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, США).

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 биопатов 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 ЦНИИЗ 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 вортке 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 °С на длительное время.

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

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

Предобработку биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости (ликвора) проводить в соответствии

с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЗ 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 гибридизационно-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 Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	KSG2 Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК <i>HHV6</i> 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 гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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 (PHK-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FRT HNV6 / 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 HNV6 / 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-смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT HNV6 / 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 (K-) – внести в пробирку 10 мкл PHK-буфера;
- б) положительный контроль ПЦР (K+) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-калибратора KSG 2

Для проведения количественного анализа:

- а) отрицательный контроль ПЦР (K-) – внести в пробирку 10 мкл PHK-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, JOE ⁴	
	72	15 с	–	

Таблица 1б

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁵

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
	95	5 с	–	
2	60	20 с	–	5
	72	15 с	–	
	95	5 с	–	
3	60	30 с	FAM, JOE ⁴	40
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

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.

⁴ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов

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

Формат FRT Форма 1: REF TR-V10-T(RG,IQ,Mx) REF HK1-0941-1-1;

Форма 2: REF R-V10-T(RG,IQ,Mx) REF H-0942-1-1 VER 15.02.12 / стр. 15 из 22



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 для флуорофора – **FAM** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (BKO Glob)**, по каналу для флуорофора **JOE** – **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** определено значение порогового цикла **Ct**, не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК HNV6 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла **Ct** (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение порогового цикла **Ct** не

превышает указанное во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК **BKO Glob** более **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и более **500** для слюны, мазков и мазков из ротоглотки. Для проб спинномозговой жидкости допустимо превышение значения порогового цикла **Ct**, указанного во вкладыше, по каналу для флуорофора **FAM**, а количество ДНК **BKO 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 **Ct** по каналу для флуорофора **JOE**, и по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение **Ct** более указанного во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК **BKO Glob** менее **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, мазков и мазков из ротоглотки. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

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

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

Для количественного теста в случае, если ДНК **BKO Glob** менее **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, мазков 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, 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

Конт- роль	Контролируем ый этап анализа	Результаты амплификации по каналам для флуорофоров			
		FAM		JOE	
		Качествен- ный формат	Количествен- ный формат	Качествен- ный формат	Количествен- ный 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:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК HHV6 в ПЦР-пробе}}{\text{число копий ДНК Glob в ПЦР-пробе}} \cdot 2^{10^5} \right) = \lg (\text{копий ДНК HHV6} / 10^5 \text{ клеток})$$

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 °C не более 5 сут. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионов

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Е.Л. Никонov

Управления делами Президента Российской Федерации

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

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

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

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 12 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

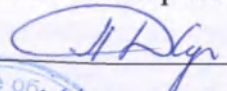


Масяго А.В.
2021 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК ВГЧ-6»
(комплект 1)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВГЧ-6» предназначен для качественного выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) в клинических образцах (соскобы из ротоглотки, сыворотка (плазма) крови, цельная кровь, моча, слюна) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор может быть использован при диагностике герпес-вирусной инфекции, обусловленной вирусом герпеса человека 6 типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Таq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

возбудителя инфекции, 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'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции (см. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(16), 7276–7280. doi:10.1073/pnas.88.16.7276*). Измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце (см. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). *Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. Nature Biotechnology, 11(9), 1026–1030. doi:10.1038/nbt0993-1026*). При этом определяется значение порогового цикла (Ct) – номер цикла, на котором уровень флуоресцентного сигнала, появляющегося в ходе специфичной реакции амплификации, достоверно превышает фоновые колебания. Значение Ct и начальная концентрация целевой ДНК в пробе чётко связаны математической функцией (см., например: Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... Zoric, N. (2006). *The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3), 95–125. doi:10.1016/j. mam.2005.12.007*). Соответствие значений Ct и численных значений концентрации ДНК ВГЧ-6 в исследуемых образцах устанавливается в каждой постановке за счёт использования положительного контрольного образца (ПКО), аттестованного относительно международного стандарта ВОЗ в международных единицах на 1 мл анализируемого образца (МЕ/мл) (NIBSC code 15/266). (

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических образцов совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) Описание.	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05 %) Аттестован относительно стандарта ВОЗ «1st WHO International Standard HHV-6B virus DNA» (NIBSC code 15/266)»	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС)	96 пробирок

Лиофилизированная	
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш с информацией о концентрации ДНК ВГЧ-6 в ПКО	1 шт.

2.3. Условия применения.

Комплект 1 применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96», «iQ5 iCycler», (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК ВГЧ-6 из клинических образцов (соскобов из ротоглотки, сыворотки (плазмы) крови, цельной крови, моча, слюна) с использованием наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест».

Количественное определение ДНК ВГЧ-6 в сыворотке (плазме) крови валидировано при выделении ДНК наборами «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг». Количественное определение ДНК ВГЧ-6 в цельной крови валидировано при выделении ДНК набором «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность:

Чувствительность выявления ДНК ВГЧ-6 - 40 МЕ в пробе. Определяется по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-396, аттестован относительно стандарта ВОЗ «1st WHO International Standard HHV-6B virus DNA» (NIBSC code 15/266)). Образцы с содержанием ДНК ВГЧ-6 40 МЕ в пробе в 100 % случаев дают положительный результат.

3.2. Диапазон определяемых концентраций (область линейности): от 500 до 10^7 МЕ ДНК ВГЧ-6/мл.

Тест на «линейность» – характеризует совпадение (в %) измеренного значения и предписанного значения (вычисленного с учётом фактора разведения) логарифма концентрации ДНК ВГЧ-6 в образце, приготовленном разведением из СОП. Значение «линейности» находится в пределах 90-110%.

3.3. Воспроизводимость - коэффициент вариации значений логарифма концентрации ДНК ВГЧ-6 не превышает 10 %.

3.4. Аналитическая специфичность:

Для оценки аналитической специфичности были проведены проверки с ДНК герпесвирусов других типов: вируса ветряной оспы (VZV, герпесвирус человека тип 3), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ, герпесвирус человека тип 4), цитомегаловируса (ЦМВ, герпесвирус

человека тип 5), вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1,2), герпесвирус человека тип 8 (ВГЧ-8). Перекрестно реагирующих ДНК герпесвирусов других типов, по данным, полученным при исследованиях в рамках клинко-лабораторных испытаний, обнаружено не было.

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов и вирусов. Возможность перекрестных реакций исключена.

3.5. Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВГЧ-6: клинические испытания, проведенные на 84 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 95,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.6. Диагностическая специфичность выявления ДНК ВГЧ-6: клинические испытания, проведенные на 76 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 95,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.7. Потенциально интерферирующие вещества.

Для выделения ДНК при работе с набором реагентов используются зарегистрированные в установленном порядке наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов – «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест». При использовании данных наборов в соответствии с инструкциями по их применению не ожидается влияние интерферентов, которые могут присутствовать в образцах соскобов из ротоглотки, сыворотки (плазмы) крови, цельной крови, мочи, слюны.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах цельной крови (гемоглобина до 240 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл (350 мкмоль/л), триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл), образцах соскобов эпителиальных клеток (кровь до 0,5%) и образцах мочи (билирубин до 0,2 мг/мл (350 мкмоль/л), глюкоза до 55 ммоль/л, белок до 3 г/л) на результаты анализа методом ПЦР набором «РеалБест ДНК ВГЧ-6».

ЭДТА, используемый в качестве антикоагулянта, не оказывает влияния на результаты анализа.

Запрещено использование гепарина в качестве антикоагулянта в связи с его возможным ингибирующим влиянием на ПЦР.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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». Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

4.3. ПКО содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

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

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с 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».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени (с каналами детекции «FAM» и «ROX»):

«CFX96», «iQ5 iCycler», (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном

порядке в РФ;

- бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- мини-шейкер, обеспечивающий частоту вращения 1800 об/мин (например, «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма SSI, США);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- магнитный штатив для пробирок (АО «Вектор-Бест», Россия);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Подробно с правилами забора биоматериала можно ознакомиться в Методических рекомендациях по лабораторным тестам для студентов медицинских учебных заведений, лечащих врачей, сотрудников процедурных кабинетов и клинико-диагностических лабораторий «Преаналитический этап лабораторных исследований» Министерства образования и науки (сост.: Кочетов А.Г. с соавт - Москва: РУДН, 2012. – 251 с.).

Для выявления ДНК ВГЧ-6 используется ДНК, выделенная из клинических образцов с использованием соответствующих наборов для выделения ДНК:

- из образцов соскобов из ротоглотки, мочи, слюны - «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор»;

- из образцов сыворотки крови, плазмы крови (полученной с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта) - «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг»;

- из образцов цельной крови - «РеалБест экстракция 100».

При выделении ДНК из образцов цельной крови, необходимо провести их предварительную обработку с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик» согласно инструкции по применению набора.

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

Для количественного определения ДНК ВГЧ-6 выделение ДНК производится:

- из 100 мкл сыворотки крови, 100 мкл плазмы крови (полученной с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта) набором «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест УниМаг»;

- из 250 мкл цельной крови набором «РеалБест экстракция 100». При выделении ДНК из образцов цельной крови, необходимо провести их предварительную обработку с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик» согласно инструкции по применению набора.

Каждая группа образцов должна содержать 3 ПКО и 1 ОКО. Объем элюции – 200 мкл. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО (для количественного определения 1 ОКО и 3 ПКО)) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные

образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК ВГЧ-6 и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

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

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК ВГЧ-6:

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК ВГЧ-6.

7.6. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВГЧ-6 (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом по каналу «ROX» программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК с C_t меньше или равно 40.

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетель-

ствуется о наличии контаминации (см. п. 8.2.4.).

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

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. 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.

8.2.2. Анализируемый образец считается положительным (содержащим ДНК ВГЧ-6), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.3. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК ВГЧ-6), если для этого образца значение C_t по каналу «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 ДНК.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по 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 данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

8.3. Количественный учёт результатов

Для количественного анализа рассчитать концентрацию ДНК ВГЧ-6 в исследуемых образцах в соответствии с Приложением.

8.3.1. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГЧ-6 в образце находится в диапазоне от 500 до 10^7 МЕ ДНК ВГЧ-6/мл, результат определяется как положительный с указанием полученной концентрации ДНК ВГЧ-6 в образце (в МЕ/мл).

8.3.2. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГЧ-6 больше 10^7 МЕ, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГЧ-6 «больше 10^7 МЕ/мл».

8.3.3. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГЧ-6 меньше 500 МЕ/мл, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГЧ-6 «меньше 500 МЕ/мл».

8.3.4. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ВГЧ-6), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

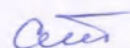
По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВГЧ-6», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 252-51-75, 227-60-30; тел./факс (383) 252-51-81, 252-51-77.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

М.П.

В.К. Ткачев

В.К. Ткачев



Т.И. Поспелова

Расчёт концентрации ДНК ВГЧ-6

Количественный анализ ДНК ВГЧ-6 следует производить по приведенным ниже формулам.

1. Для образцов ПКО, значение C_t которых находится в диапазоне значений, указанном во вкладыше в наборы данной серии, вычислить скорректированные значения C_t ВГЧ-6 с введением поправки на эффективность выделения, контролируемую по C_t ВКО, по формуле:

$$Z_{\text{пко}} = C_t \text{ ПКО} + (C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}} - C_t \text{ ВКО}),$$

где:

$Z_{\text{пко}}$ - скорректированное значение C_t ВГЧ-6 для образца ПКО;

$C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}}$ - среднее значение C_t ВКО, вычисленное по всем образцам (см. инструкцию);

$C_t \text{ ПКО}$ и $C_t \text{ ВКО}$ - значения C_t данного образца ПКО по каналам «ROX» и «FAM», соответственно.

2. Вычислить среднее значение скорректированного порогового цикла для ПКО ($Z_{\text{пко}_{\text{ср}}}$).

Отбраковке подлежат результаты анализа образцов ПКО, для которых $Z_{\text{пко}}$ отличается более чем на 2 от значения $Z_{\text{пко}_{\text{ср}}}$. После отбраковки вычислить $Z_{\text{пко}_{\text{ср}}}$ для оставшихся образцов.

3. Вычислить количество ДНК ВГЧ-6 в каждом исследуемом образце (Q_k) по формуле:

$$Q_k = C_{\text{пко}} \times 2^{X_k} (\text{МЕ}),$$

где:

$$X_k = Z_{\text{пко}_{\text{ср}}} - Z_k;$$

$Z_{\text{пко}_{\text{ср}}}$ - среднее значение Z для образцов ПКО;

$C_{\text{пко}}$ - концентрация ДНК ВГЧ-6 в ПКО, приведенная во вкладыше к набору, МЕ/мл;

k - номер образца;

Z_k - скорректированное значение C_t данного образца, вычисляемое по формуле:

$$Z_k = C_t \text{ ВГЧ-6}_k + (C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}} - C_t \text{ ВКО}_k).$$

4. Вычислить концентрацию C_k ДНК ВГЧ-6 (в МЕ/мл) в каждом исследуемом образце:

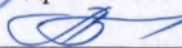
при выделении из 100 мкл образца: $C_k = 10 \times Q_k$

при выделении из 250 мкл образца: $C_k = 4 \times Q_k$

Таким образом, будет получена концентрация ДНК ВГЧ-6 в данном образце, выраженная в МЕ/мл.



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 12 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России



Захарова Л.Н.

“07” 06 20 21 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВГЧ-6»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВГЧ-6» предназначен для качественного выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) в клинических образцах (соскобы из ротоглотки, сыворотка (плазма) крови, цельная кровь, моча, слюна) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор может быть использован при диагностике герпес-вирусной инфекции, обусловленной вирусом герпеса человека 6 типа.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

возбудителя инфекции, 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'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции (см. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(16), 7276–7280. doi:10.1073/pnas.88.16.7276*). Измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце (см. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). *Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. Nature Biotechnology, 11(9), 1026–1030. doi:10.1038/nbt0993-1026*). При этом определяется значение порогового цикла (Ct) – номер цикла, на котором уровень флуоресцентного сигнала, появляющегося в ходе специфичной реакции амплификации, достоверно превышает фоновые колебания. Значение Ct и начальная концентрация целевой ДНК в пробе чётко связаны математической функцией (см., например: Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... Zoric, N. (2006). *The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27(2-3), 95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007*). Соответствие значений Ct и численных значений концентрации ДНК ВГЧ-6 в исследуемых образцах устанавливается в каждой постановке за счёт использования положительного контрольного образца (ПКО), аттестованного относительно международного стандарта ВОЗ в международных единицах на 1 мл анализируемого образца (МЕ/мл) (NIBSC code 15/266). (

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических образцов совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) Описание.	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05 %) Аттестован относительно стандарта ВОЗ «1st WHO International Standard HHV-6B virus DNA» (NIBSC code 15/266)	1 пробирка, 1 мл
Реакционная смесь для ПЦР (PC)	10 пробирок, каждая

<i>Лиофилизированная</i>	на 10 определений
Раствор для восстановления (РВ)	2 флакона,
<i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	по 2 мл
Вкладыш с информацией о концентрации ДНК ВГЧ-6 в ПКО	1 шт

2.3. Условия применения.

Комплект 2 применяется с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК ВГЧ-6 из клинических образцов (соскобов из ротоглотки, сыворотки (плазмы) крови, цельной крови, моча, слюна) с использованием наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест».

Количественное определение ДНК ВГЧ-6 в сыворотке (плазме) крови валидировано при выделении ДНК наборами «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг». Количественное определение ДНК ВГЧ-6 в цельной крови валидировано при выделении ДНК набором «РеалБест экстракция 100».

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность:

Чувствительность выявления ДНК ВГЧ-6 - 40 МЕ в пробе. Определяется по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-396, аттестован относительно стандарта ВОЗ «1st WHO International Standard HHV-6B virus DNA» (NIBSC code 15/266)), образцы с содержанием ДНК ВГЧ-6 40 МЕ в пробе в 100 % случаев дают положительный результат.

3.2. Диапазон определяемых концентраций (область линейности): от 500 до 10^7 МЕ ДНК ВГЧ-6/мл.

Тест на «линейность» – характеризует совпадение (в %) измеренного значения и предписанного значения (вычисленного с учётом фактора разведения) логарифма концентрации ДНК ВГЧ-6 в образце, приготовленном разведением из СОП. Значение «линейности» находится в пределах 90-110%.

3.3. Воспроизводимость - коэффициент вариации значений логарифма концентрации ДНК ВГЧ-6 не превышает 10 %.

3.4. Аналитическая специфичность:

Для оценки аналитической специфичности были проведены проверки с ДНК герпесви-

русов других типов: вируса ветряной оспы (VZV, герпесвирус человека тип 3), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ, герпесвирус человека тип 4), цитомегаловируса (ЦМВ, герпесвирус человека тип 5), вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1,2), герпесвирус человека тип 8 (ВГЧ-8). Перекрестно реагирующих ДНК герпесвирусов других типов, по данным, полученным при исследованиях в рамках клинико-лабораторных испытаний, обнаружено не было.

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов и вирусов. Возможность перекрестных реакций исключена.

3.5. Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВГЧ-6: клинические испытания, проведенные на 84 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 95,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.6. Диагностическая специфичность выявления ДНК ВГЧ-6: клинические испытания, проведенные на 76 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 95,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.7. Потенциально интерферирующие вещества.

Для выделения ДНК при работе с набором реагентов используются зарегистрированные в установленном порядке наборы реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов – «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест». При использовании данных наборов в соответствии с инструкциями по их применению не ожидается влияние интерферентов, которые могут присутствовать в образцах соскобов из ротоглотки, сыворотки (плазмы) крови, цельной крови, мочи, слюны.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах цельной крови (гемоглобина до 240 г/л, билирубина до 0,2 мг/мл (350 мкмоль/л), триглицеридов до 30 мг/мл, альбумина до 90 мг/мл), образцах соскобов эпителиальных клеток (кровь до 0,5%) и образцах мочи (билирубин до 0,2 мг/мл (350 мкмоль/л), глюкоза до 55 ммоль/л, белок до 3 г/л) на результаты анализа набором «РеалБест ДНК ВГЧ-6».

ЭДТА, используемый в качестве антикоагулянта, не оказывает влияния на результаты анализа.

Запрещено использование гепарина в качестве антикоагулянта в связи с его возможным ингибирующим влиянием на ПЦР.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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». Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

4.3. ПКО и РВ содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

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

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с 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».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (с канала-

ми детекции «FAM»/«Green» и «ROX»/«Orange») ротаторного типа : «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия) или планшетного типа: «CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке в РФ;

- бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

- микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

- дозаторы одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма SSI, США);

- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);

- магнитный штатив для пробирок (АО «Вектор-Бест», Россия);

- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (например, фирма «Sarstedt», Германия).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Подробно с правилами забора биоматериала можно ознакомиться в Методических рекомендациях по лабораторным тестам для студентов медицинских учебных заведений, лечащих врачей, сотрудников процедурных кабинетов и клинико-диагностических лабораторий «Преаналитический этап лабораторных исследований» Министерства образования и науки (сост.: Кочетов А.Г. с соавт - Москва: РУДН, 2012. – 251 с.).

Для выявления ДНК ВГЧ-6 используется ДНК, выделенная из клинических образцов с использованием соответствующих наборов для выделения ДНК:

- из образцов соскобов из ротоглотки, мочи, слюны - «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор»;

- из образцов сыворотки крови, плазмы крови (полученной с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта) - «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг»;

- из образцов цельной крови - «РеалБест экстракция 100».

При выделении ДНК из образцов цельной крови, необходимо провести их предварительную обработку с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик» согласно инструкции по применению набора.

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

Для количественного определения ДНК ВГЧ-6 выделение ДНК производится:

- из 100 мкл сыворотки крови, 100 мкл плазмы крови (полученной с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта) набором «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест УниМаг»;

- из 250 мкл цельной крови набором «РеалБест экстракция 100». При выделении ДНК из образцов цельной крови, необходимо провести их предварительную обработку с использованием набора реагентов «РеалБест Гемолитик» согласно инструкции по применению набора.

Каждая группа образцов должна содержать 3 ПКО и 1 ОКО. Объем элюции – 200 мкл. Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с РС в пакете (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть пакет, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО (для количественного определения 1 ОКО и 3 ПКО)) пробирок с РС.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

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

После первого вскрытия упаковки РС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 ме-

сяцев.

6.2.2. В пробирку с РС добавить 300 мкл РВ, аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18-26) °С в течение 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

После вскрытия флакона РВ хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

Оставшуюся восстановленную РС хранить при температуре минус (18-24) °С не более 1 недели (подлежит только однократному замораживанию-оттаиванию).

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая контрольные образцы).

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

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

7.2. Во все пробирки дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 25 мкл РС.

7.3. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК ВГЧ-6 и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 40 секунд) *;

– для приборов «CFX96», «iQ5 iCycler» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд) *;

*Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК ВГЧ-6:

«FAM» (для приборов «CFX96», «iQ5 iCycler», «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» (для приборов «CFX96», «iQ5 iCycler», «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВГЧ-6.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВГЧ-6 (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять C_t ВКО, при этом по каналу «ROX»/«Orange» программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК с C_t меньше или равно 40.

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см.п. 8.2.4).

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

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 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.

8.2.2. Анализируемый образец считается положительным (содержащим ДНК ВГЧ-6), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

8.2.3. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК ВГЧ-6), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» 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 учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по 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 данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

8.3. Количественный учёт результатов

Для количественного анализа рассчитать концентрацию ДНК ВГЧ-6 в исследуемых образцах в соответствии с Приложением.

8.3.1. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГЧ-6 в образце находится в диапазоне от 500 до 10^7 МЕ ДНК ВГЧ-6/мл, результат определяется как положительный с указанием полученной концентрации ДНК ВГЧ-6 в образце (в МЕ/мл).

8.3.2. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГЧ-6 больше 10^7 МЕ, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГЧ-6 «больше 10^7 МЕ/мл».

8.3.3. Если вычисленное значение концентрации ДНК ВГЧ-6 меньше 500 МЕ/мл, то результат рекомендуется интерпретировать как положительный с концентрацией ДНК ВГЧ-6 «меньше 500 МЕ/мл».

8.3.4. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ВГЧ-6), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВГЧ-6», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 252-51-75, 227-60-30; тел./факс (383) 252-51-81, 252-51-77.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор



Т.И. Поспелова

М.П.

Расчёт концентрации ДНК ВГЧ-6

Количественный анализ ДНК ВГЧ-6 следует производить по приведенным ниже формулам.

1. Для образцов ПКО, значение C_t которых находится в диапазоне значений, указанном во вкладыше в наборы данной серии, вычислить скорректированные значения C_t ВГЧ-6 с введением поправки на эффективность выделения, контролируруемую по C_t ВКО, по формуле:

$$Z_{пко} = C_t \text{ ПКО} + (C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}} - C_t \text{ ВКО}),$$

где:

$Z_{пко}$ - скорректированное значение C_t ВГЧ-6 для образца ПКО;

$C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}}$ - среднее значение C_t ВКО, вычисленное по всем образцам (см. инструкцию);

$C_t \text{ ПКО}$ и $C_t \text{ ВКО}$ - значения C_t данного образца ПКО по каналам «ROX» и «FAM», соответственно.

2. Вычислить среднее значение скорректированного порогового цикла для ПКО ($Z_{пко_{\text{ср}}}$).

Отбраковке подлежат результаты анализа образцов ПКО, для которых $Z_{пко}$ отличается более чем на 2 от значения $Z_{пко_{\text{ср}}}$. После отбраковки вычислить $Z_{пко_{\text{ср}}}$ для оставшихся образцов.

3. Вычислить количество ДНК ВГЧ-6 в каждом исследуемом образце (Q_k) по формуле:

$$Q_k = C_{пко} \times 2^{X_k} (\text{МЕ}),$$

где:

$$X_k = Z_{пко_{\text{ср}}} - Z_k;$$

$Z_{пко_{\text{ср}}}$ - среднее значение Z для образцов ПКО;

$C_{пко}$ - концентрация ДНК ВГЧ-6 в ПКО, приведенная во вкладыше к набору, МЕ/мл;

k - номер образца;

Z_k - скорректированное значение C_t данного образца, вычисляемое по формуле:

$$Z_k = C_t \text{ ВГЧ-6}_k + (C_t \text{ ВКО}_{\text{ср}} - C_t \text{ ВКО}_k).$$

4. Вычислить концентрацию C_k ДНК ВГЧ-6 (в МЕ/мл) в каждом исследуемом образце:

$$\text{при выделении из 100 мкл образца: } C_k = 10 \times Q_k$$

$$\text{при выделении из 250 мкл образца: } C_k = 4 \times Q_k$$

Таким образом, будет получена концентрация ДНК ВГЧ-6 в данном образце, выраженная в МЕ/мл.



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 12 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.
"04" 06 2021 г.

