

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

« 19 »

мая

20 24 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для качественного и количественного
определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*),
цитомегаловируса человека (*CMV*) и вируса герпеса
человека 6A/B (*HHV6A/B*) в биологическом материале методом
полимеразной цепной реакции с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиСенс® *EBV / CMV / HHV6A/B*-скрин-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	12
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	14
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	15
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	19
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК ⁵	25
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	29
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	34
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	34
ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L-t.....	36
СОСТАВ.....	36
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	36
А. Подготовка проб для амплификации	36
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	38
В. Анализ и интерпретация результатов.....	39
ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN.....	47
СОСТАВ.....	47
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	48
А. Подготовка проб для амплификации	48
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	51
В. Анализ и интерпретация результатов.....	52
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	60
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	61
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	62

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β-глобинового гена человека)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
CMV	- <i>Cytomegalovirus humanbeta5</i> , цитомегаловирус человека, ЦМВ, ранее <i>Human betaherpesvirus 5</i>
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
EBV	- <i>Lymphocryptovirus humangamma4</i> , вирус Эпштейна-Барр, ВЭБ, ранее <i>Human gammaherpesvirus 4</i>
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HHV6A/B	- <i>Roseolovirus humanbeta6a/Roseolovirus humanbeta6b</i> , вирус герпеса человека 6A/B, ВГЧ-6A/B, ранее <i>Human betaherpesvirus 6A/B</i>
KSG1, KSG2	- ДНК-калибраторы

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин-FL» предназначен для качественного и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*Lymphocryptovirus humangamma4*, ВЭБ, EBV), цитомегаловируса человека (*Cytomegalovirus humanbeta5*, ЦМВ, CMV), вируса герпеса человека 6A/B (*Roseolovirus humanbeta6a/Roseolovirus humanbeta6b*, ВГЧ-6A/B, HHV6A/B)¹ в биологическом материале (цельная венозная, пуповинная кровь; лейкоциты венозной,

¹ *Lymphocryptovirus humangamma4*, ВЭБ, EBV, ранее *Human gammaherpesvirus 4*; *Cytomegalovirus humanbeta5*, ЦМВ, CMV, ранее *Human betaherpesvirus 5*; *Roseolovirus humanbeta6a/Roseolovirus humanbeta6b*, ВГЧ-6A/B, HHV6A/B, ранее *Human betaherpesvirus 6A/B*.

пуповинной крови; плазма венозной, пуповинной крови; мазок со слизистой оболочки ротоглотки; слюна; спинномозговая жидкость; амниотическая жидкость; транссудаты; бронхоальвеолярная лаважная жидкость; мокрота; тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

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

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на герпесвирусную инфекцию вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания всех групп населения.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК β -глобинового гена человека с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ДНК β -глобинового гена используется в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО Glob) и позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с образцами с известной концентрацией ДНК-мишеней – ДНК-калибраторами, которые аттестованы по методике Изготовителя. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная прямая и проводится расчет концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация четырех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК участка β-глобинового гена (BKO Glob)	ДНК <i>Lymphocryptovirus humangamma4</i> (EBV)	ДНК <i>Cytomegalovirus humanbeta5</i> (CMV)	ДНК <i>Roseolovirus humanbeta6a/ Roseolovirus humanbeta6b</i> (HHV6A/B)
Область амплификации	β-глобиновый ген	LMP-ген	4 экзон гена MIE	Каталитическая субъединица ДНК-полимеразы

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L-t

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN

Форма 1 рассчитана на 96 реакций амплификации, включая контроли, используется для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме

«реального времени» и позволяет проводить анализ в качественном и количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 2 рассчитана на 110 реакций амплификации, включая контроли, используется для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет проводить анализ в качественном и количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон измерения и предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Объем образца для экстракции, мкл	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Цельная венозная, пуповинная кровь	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
Лейкоциты венозной, пуповинной крови	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
Плазма венозной, пуповинной крови	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	1000	50	$300 - 1 \times 10^7$
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
Слюна	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
Спинномозговая жидкость	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	1000	50	$300 - 1 \times 10^7$
Амниотическая жидкость	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	1000	50	$300 - 1 \times 10^7$
Транссудаты	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	1000	50	$300 - 1 \times 10^7$
Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции ДНК	Объем образца для экстракции, мкл	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Мокрота	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	«РИБО-преп»	100	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
	«МАГНО-сорб»	200	400	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК *Lymphocryptovirus humangamma4*, *Cytomegalovirus humanbeta5*, *Roseolovirus humanbeta6a/Roseolovirus humanbeta6b* при исследовании референсного штамма *Lymphocryptovirus humangamma4* B95-8, референсного штамма *Cytomegalovirus humanbeta5* AD 169 в концентрации не менее 10^4 копий/мл, клинических изолятов *Roseolovirus humanbeta6a* и *Roseolovirus humanbeta6b* в концентрации не менее 10^5 копий/мл с последующим подтверждением специфичности результата методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей.

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

- Штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США): *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Haemophilus influenzae* (ATCC® 33930™), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 27736™), *Listeria grayi* (ATCC® 25401™), *Listeria innocua* (ATCC® 33090™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 7644™), *Moraxella catarrhalis* (ATCC® 25240™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 15442™), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™), *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC® 43300™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™), *Staphylococcus haemolyticus* (ATCC® 29970™), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC® 49907™), *Streptococcus agalactiae* (ATCC® 12386™),

Streptococcus pyogenes (ATCC® 19615™) в концентрации не более 1×10^7 и не менее 1×10^4 копий/мл;

- Клинические изоляты панели штаммов и изолятов, находящейся в распоряжении ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: *Betapolyomavirus hominis*, *Betapolyomavirus secu hominis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Enterovirus* spp., *Erythroparvovirus primate1*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Rhadinovirus humangamma8*, *Roseolovirus humanbeta7*, *Simplexvirus humanalpha1*, *Simplexvirus humanalpha2*, *Streptococcus pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Varicellovirus humanalpha3* в концентрации не более 1×10^7 и не менее 1×10^4 копий/мл;

- ДНК человека в концентрации 0,2 мг/мл.

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

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость определены путем тестирования образцов цельной венозной крови, мазка со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговой жидкости, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия, содержащими ДНК ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6А/В, в концентрации 1×10^5 и 1×10^7 копий/мл (см. табл. 3, 4).

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

Таблица 3

Повторяемость

Форма комплек- тации	Комплект для экстрак- ции	Объем образца для экстрак- ции, мкл	Выявляемый патоген	Ожидаемое значение концентра- ции, lg копий/мл	Коли- чество повторов	Среднее значение измерения концентра- ции, lg копий/мл	Стандарт- ное откло- нение (SD)	Козф- фициент вариации (CV), %
Форма 1	«РИБО- преп»	100	ВЭБ	7,0	10	7,20	0,07	0,92
				5,0	10	5,21	0,05	1,05
			ЦМВ	7,0	10	6,92	0,06	0,93
				5,0	10	5,09	0,11	2,24
			ВГЧ-6А/В	7,0	10	7,11	0,07	1,03
				5,0	10	5,16	0,07	1,28
Форма 2			ВЭБ	7,0	10	7,00	0,04	0,50
				5,0	10	4,99	0,07	1,48
			ЦМВ	7,0	10	7,02	0,03	0,42
				5,0	10	5,07	0,04	0,86
			ВГЧ-6А/В	7,0	10	6,86	0,03	0,41
				5,0	10	4,85	0,06	1,30
Форма 1	«МАГНО- сорб»	200	ВЭБ	7,0	10	7,09	0,04	0,62
				5,0	10	5,07	0,04	0,72
			ЦМВ	7,0	10	6,88	0,06	0,80
				5,0	10	4,86	0,02	0,35
			ВГЧ-6А/В	7,0	10	6,97	0,05	0,67
				5,0	10	4,94	0,04	0,81
Форма 2			ВЭБ	7,0	10	6,99	0,04	0,55
				5,0	10	5,04	0,04	0,73
			ЦМВ	7,0	10	6,71	0,02	0,25
				5,0	10	4,75	0,03	0,60
			ВГЧ-6А/В	7,0	10	7,02	0,02	0,27
				5,0	10	5,05	0,03	0,57
Форма 1	«МАГНО- сорб»	1000	ВЭБ	7,0	10	7,18	0,06	0,86
				5,0	10	5,11	0,06	1,18
			ЦМВ	7,0	10	6,68	0,06	0,86
				5,0	10	4,62	0,05	1,14
			ВГЧ-6А/В	7,0	10	6,96	0,05	0,69
				5,0	10	4,95	0,06	1,12
Форма 2			ВЭБ	7,0	10	7,04	0,02	0,22
				5,0	10	5,02	0,03	0,62
			ЦМВ	7,0	10	6,70	0,06	0,93
				5,0	10	4,67	0,05	1,13
			ВГЧ-6А/В	7,0	10	6,83	0,04	0,54
				5,0	10	4,87	0,07	1,34

Таблица 4

Воспроизводимость

Форма комплек-тации	Комплект для экстрак-ции	Объем образца для экстрак-ции, мкл	Выявляемый патоген	Ожидаемое значение концентра-ции, lg копий/мл	Коли-чество повторов	Среднее значение измерения концентра-ции, lg копий/мл	Стандарт-ное откло-нение (SD)	Козф-фициент вариации (CV), %	
Форма 1	«РИБО-преп»	100	ВЭБ	7,0	30	7,09	0,13	1,86	
				5,0	30	5,10	0,10	2,02	
			ЦМВ	7,0	30	6,92	0,12	1,73	
				5,0	30	5,01	0,17	3,39	
			ВГЧ-6А/В	7,0	30	7,08	0,14	1,91	
5,0				30	5,09	0,12	2,28		
Форма 2			ВЭБ	7,0	30	6,92	0,16	2,27	
				5,0	30	4,92	0,16	3,23	
			ЦМВ	7,0	30	6,96	0,13	1,84	
				5,0	30	4,98	0,11	2,12	
			ВГЧ-6А/В	7,0	30	6,81	0,15	2,16	
				5,0	30	4,75	0,17	3,54	
			Форма 1	«МАГНО-сорб»	200	ВЭБ	7,0	30	7,12
	5,0	30					5,05	0,07	1,40
ЦМВ	7,0	30				6,87	0,09	1,32	
	5,0	30				4,85	0,05	1,03	
ВГЧ-6А/В	7,0	30				6,96	0,08	1,15	
	5,0	30				4,91	0,09	1,80	
Форма 2	ВЭБ	7,0				30	7,00	0,08	1,13
		5,0				30	5,02	0,08	1,54
	ЦМВ	7,0				30	6,77	0,06	0,82
		5,0				30	4,82	0,07	1,41
	ВГЧ-6А/В	7,0	30			6,91	0,06	0,84	
		5,0	30			4,96	0,08	1,71	
	Форма 1	«МАГНО-сорб»	1000			ВЭБ	7,0	30	7,03
				5,0	30		5,04	0,10	1,89
ЦМВ				7,0	30	6,88	0,09	1,34	
				5,0	30	4,91	0,09	1,87	
ВГЧ-6А/В				7,0	30	6,89	0,08	1,13	
				5,0	30	4,90	0,09	1,89	
Форма 2				ВЭБ	7,0	30	7,07	0,07	1,00
					5,0	30	5,07	0,07	1,38
				ЦМВ	7,0	30	6,71	0,11	1,71
					5,0	30	4,71	0,09	1,94
	ВГЧ-6А/В			7,0	30	6,91	0,08	1,11	
				5,0	30	4,92	0,12	2,41	

Правильность

Правильность определена путем тестирования образцов цельной венозной крови, мазка со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговой жидкости, искусственно контаминированных стандартными образцами предприятия, содержащими ДНК ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6А/В, в концентрации 1×10^5 копий/мл (см. табл. 5).

Таблица 5

Правильность

Форма комплек-тации	Комплект для экстракции	Объем образца для экстракции, мкл	Выявляемый патоген	Ожидаемое значение концентрации, Ig	Количество повто-ров	Среднее значение измерения концентрации, Ig	Системати-ческая погрешность (В), %
Форма 1	«РИБО-преп»	100	ВЭБ	5,00	30	5,10	2,07
			ЦМВ	5,00	30	5,01	0,20
			ВГЧ-6А/В	5,00	30	5,09	1,87
Форма 2			ВЭБ	5,00	30	4,92	-1,67
			ЦМВ	5,00	30	4,98	-0,47
			ВГЧ-6А/В	5,00	30	4,75	-5,07
Форма 1	«МАГНО-сорб»	200	ВЭБ	5,00	30	5,05	1,00
			ЦМВ	5,00	30	4,85	-2,93
			ВГЧ-6А/В	5,00	30	4,91	-1,87
Форма 2			ВЭБ	5,00	30	5,02	0,47
			ЦМВ	5,00	30	4,82	-3,60
			ВГЧ-6А/В	5,00	30	4,96	-0,87
Форма 1	«МАГНО-сорб»	1000	ВЭБ	5,00	30	5,04	0,80
			ЦМВ	5,00	30	4,91	-1,80
			ВГЧ-6А/В	5,00	30	4,90	-2,00
Форма 2			ВЭБ	5,00	30	5,07	1,40
			ЦМВ	5,00	30	4,71	-5,80
			ВГЧ-6А/В	5,00	30	4,92	-1,60

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностической чувствительности набора реагентов использовано по 750 образцов заявленных видов биологического материала, полученных от:

- новорожденных с подтвержденным диагнозом по МКБ 10: P35.1 Врожденная цитомегаловирусная инфекция;
- детей с первичной инфекцией в возрасте от года до трех лет с подтвержденным диагнозом по МКБ 10: B08.2 Экзантема внезапная (шестая болезнь);
- детей с первичной инфекцией в возрасте от трех до десяти лет с подтвержденным диагнозом по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ 10): B27.0 Мононуклеоз, вызванный гамма-герпетическим вирусом;
- ВИЧ-инфицированных пациентов, имевших генерализованную форму ВЭБ-инфекции;
- ВИЧ-инфицированных пациентов с подтвержденным диагнозом по МКБ 10: B20.2 Болезнь, вызванная ВИЧ, с проявлениями цитомегаловирусного заболевания;
- пациентов с лабораторно подтвержденной наследуемой хромосомно-интегрированной формой вируса герпеса человека 6А и вируса герпеса человека 6В.

Для определения диагностической специфичности набора реагентов использовано по 300 образцов заявленных видов биологического материала условно-здоровых доноров крови и пациентов с соматической патологией при отсутствии клинических проявлений острого инфекционного заболевания.

В качестве референтных методов использовались наборы реагентов на основе ПЦР для количественного определения ДНК заявленных возбудителей, зарегистрированные в Российской Федерации в установленном порядке, а также метод цифровой капельной ПЦР.

Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин-FL»**

Вид исследуемого материала	Микро-организм	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)
Цельная венозная, пуповинная кровь	ВЭБ	100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Лейкоциты венозной, пуповинной крови		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Плазма венозной, пуповинной крови		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Слюна		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Спинномозговая жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Амниотическая жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Транссудаты		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Бронхоальвеолярная лаважная жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Мокрота		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Цельная венозная, пуповинная кровь	ЦМВ	100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Лейкоциты венозной, пуповинной крови		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Плазма венозной, пуповинной крови		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Слюна		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Спинномозговая жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Амниотическая жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Транссудаты		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Бронхоальвеолярная лаважная жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Мокрота		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Цельная венозная, пуповинная кровь	ВГЧ-6A/B	100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Лейкоциты венозной, пуповинной крови		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Плазма венозной, пуповинной крови		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Слюна		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Спинномозговая жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Амниотическая жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Транссудаты		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Бронхоальвеолярная лаважная жидкость		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Мокрота		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал		100 (98,54 – 100) %	100 (98,78 – 100) %

² Относительная чувствительность в сравнении с использованными референтными методами.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованными референтными методами.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки,

лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

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

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда для транспортирования и хранения

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- биологического материала, содержащая консервант (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011), «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (РУ № ФСР 2009/05514)).
2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
 3. 70 % раствор этанола.
 4. Вакуумные пробирки или одноразовая система для взятия венозной крови с К2/К3 ЭДТА в качестве антикоагулянта.
 5. Зонд для взятия исследуемого биологического материала, однократного применения, стерильный.
 6. Одноразовые пробирки с винтовой горловинной крышкой объемом 5; 10; 15 мл.
 7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2 мл.
 8. Емкость для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 30-60 мл, стерильный.
 9. Центрифуга-вортекс.
 10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
 11. Центрифуга лабораторная с принадлежностями.
- Предварительная подготовка исследуемого материала**
12. Реагент для предобработки цельной крови (например, реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505)).
 13. Реагент для предварительной обработки мокроты (например, реагент для предобработки слизистого материала «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082)).
 14. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
 15. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5; 2 мл.
 16. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.

17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.
18. Штативы для пробирок объемом 1,5; 2 мл.
19. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
20. Бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
21. Шейкер.
22. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
23. Центрифуга-вортекс.
24. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
25. Автоматические дозаторы переменного объема.
26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
27. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
28. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

31. Автоматическая станция для экстракции НК «открытого типа» (например, KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (ПУ № ФСЗ 2009/05562))).
32. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например,

«МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)).

33.Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции в соответствии с рекомендациями производителя.

Амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

34.Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;**
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;**
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.**

35.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и 1000 мкл.

36.Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.

37.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.

38.Центрифуга-вортекс.

39.Автоматические дозаторы переменного объема.

40.Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториес, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229))).

41.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

42.Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

43.Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА⁵

Материалом для исследования служат:

- цельная венозная, пуповинная кровь,
- лейкоциты венозной, пуповинной крови,
- плазма венозной, пуповинной крови,
- мазок со слизистой оболочки ротоглотки,
- слюна,
- спинномозговая жидкость,
- амниотическая жидкость,
- транссудаты,
- бронхоальвеолярная лаважная жидкость,
- мокрота,
- тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал.

Цельная венозная, пуповинная кровь: лейкоциты венозной, пуповинной крови

Взятие венозной крови рекомендуется производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены в положении сидя. Взятие пуповинной крови осуществлять при проведении кордоцентеза.

Взятие крови произвести в пробирку с 6 % ЭДТА.

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Закрытую пробирку с кровью сразу после взятия несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с антикоагулянтом тщательно перемешалась. После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

ВНИМАНИЕ! Получение лейкоцитов крови описано в разделе «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Допускается хранение образцов цельной венозной, пуповинной крови до проведения предварительной подготовки:

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

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

⁵ См. также «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации» / Домонова Э.А., Творогова М.Г., Подколзин А.Т. [и др.]. Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 2021. 112 с. ISBN 978-5-6045286-6-2, DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-6-2>, веб-сайт <https://prepcr.crie.ru/>

Плазма венозной, пуповинной крови

Взятие венозной крови рекомендуется производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены в положении сидя. Взятие пуповинной крови осуществлять при проведении кордоцентеза.

Взятие крови произвести в пробирку с 6 % ЭДТА или 6 % ЭДТА и гелем.

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Закрытую пробирку с кровью сразу после взятия несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с антикоагулянтом тщательно перемешалась. После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Для получения плазмы крови пробирки с цельной кровью центрифугировать при 600 g (например, 3 тыс. об/мин для центрифуги Z 306, HERMLE Labortechnik GmbH) в течение 10 мин при температуре от 18 до 25 °С. Далее аликвоту плазмы крови в объеме не менее 1 мл перенести в пробирки объемом 2 или 5 мл, используя наконечник с фильтром. Плазму крови необходимо перенести в новую пробирку в течение 6 часов с момента взятия образца крови.

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

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазок со слизистой оболочки ротоглотки

Рабочей частью зонда-тампона провести вращательными движениями по поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. Перенести зонд-тампон в пробирку с 0,5 мл «Транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков». Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда-тампона в транспортную среду и, прижав

ее к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда-тампона!

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

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Слюна

Провести трехкратное полоскание полости рта 0,9 % раствором натрия хлорида или кипяченой водой. Слюну в объеме не менее 1–2 мл собрать в пробирку или контейнер, плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение образцов слюны до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Спинномозговая жидкость

Спинномозговую жидкость отобрать методом аспирации в объеме не менее 1 мл в пробирку или контейнер путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков пункционными иглами. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой.

При необходимости можно провести концентрирование нативного материала. Образец спинномозговой жидкости перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с. 1 мл материала перенести в пробирку объемом 1,5 мл,

используя наконечник с фильтром. Центрифугировать 5 мин при 8 тыс. g (например, 10–11 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Удалить супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученную пробу тщательно перемешать на вортексе, осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с и использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение и транспортирование образцов спинномозговой жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Амниотическая жидкость

Амниотическую жидкость отобрать методом аспирации в объеме не менее 1–2 мл в пробирку при выполнении процедуры амниоцентеза. Пробирку плотно закрыть крышкой.

При необходимости можно провести концентрирование нативного материала. Образец амниотической жидкости перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с. 1 мл материала перенести в пробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Центрифугировать 10 мин при 10 тыс. g (например, 12 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Удалить супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100–200 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученную пробу тщательно перемешать на вортексе, осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с и использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение образцов амниотической жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.
- Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Транссудаты

Взятие транссудата в объеме не менее 0,1–0,3 мл провести в пробирку при пункции кожных покровов, предварительно обработанных 70 % раствором этилового спирта. Пробирку плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение образцов транссудатов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 7 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Бронхоальвеолярная лаважная жидкость

Бронхоальвеолярную лаважную жидкость в объеме от 5 до 50 мл собрать в пробирку или контейнер при проведении бронхоскопии. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой.

Для контроля контаминации исследуемыми микроорганизмами или их ДНК рекомендуется провести предварительное взятие смывов с бронхоскопов, подготовленных для проведения процедуры бронхоскопии. С этой целью промыть канал и шланг аппарата 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученный смыв перенести в пробирку для последующего тестирования. Пробирку плотно закрыть крышкой.

Допускается хранение образцов бронхоальвеолярной лаважной жидкости до проведения предварительной подготовки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 12 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мокрота

Мокроту в объеме не менее 1 мл (оптимально 3–5 мл) собрать в контейнер, плотно закрыть крышкой. Качественным материалом можно считать мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер. Если пациент не выделяет мокроту или выделяет ее только эпизодически и в скудном количестве, то накануне вечером и рано утром в день сбора биологического материала следует дать ему отхаркивающее средство или применить раздражающие ингаляции. При получении индуцированной мокроты в сопроводительном документе необходимо отметить, что материал получен после аэрозольных ингаляций.

Допускается хранение образцов мокроты до проведения предварительной подготовки:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 12 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал

Биологический материал отобрать наиболее близко к месту поражения: из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, поврежденной ткани или пограничного с повреждением участка. 3–5 образцов диаметром более 5 мм перенести в контейнер, менее 5 мм — в пробирку с 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Контейнер или пробирку плотно закрыть.

Допускается хранение образцов тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала до проведения предварительной подготовки / ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК⁶

Образцы плазмы венозной, пуповинной крови; мазков со слизистой оболочки ротоглотки; слюны; спинномозговой жидкости; амниотической жидкости; транссудатов; тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала размером менее 5 мм не требуют предварительной подготовки.

Образцы цельной венозной, пуповинной крови; лейкоцитов венозной, пуповинной крови; бронхоальвеолярной лаважной жидкости; мокроты; тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала размером более 5 мм требуют предварительной подготовки.

Цельная венозная, пуповинная кровь

250 мкл цельной крови перенести в пробирку объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Добавить 1 мл реагента «ГЕМОЛИТИК». Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10–15 мин при температуре 18–25 °С, периодически перемешивая на вортексе. Центрифугировать 3 мин при 4 тыс. g (например, 8 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Супернатант отобрать, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100 мкл надосадочной жидкости и осадок. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку реагентом «ГЕМОЛИТИК». Полученный осадок должен быть немедленно лизирован (например, в случае экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно).

Допускается хранение преобработанных образцов цельной венозной, пуповинной крови до проведения ПЦР-исследования при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Лейкоциты венозной, пуповинной крови

Способы получения лейкоцитарной фракции крови

Способ первый. 1,5 мл цельной крови перенести в пробирку объемом 2 мл, используя наконечник с фильтром. Центрифугировать 10 мин при 50 g (например, 800 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Затем 500–600 мкл супернатанта (верхний слой плазмы с лейкоцитами) перенести в другую пробирку объемом 2 мл, используя наконечник с фильтром, и повторно центрифугировать 10 мин при 10 тыс. g (например, 12 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). По окончании центрифугирования удалить супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 200 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученную пробу использовать для экстракции ДНК. .

Способ второй. В пробирки объемом 1,5 мл внести 500 мкл реагента «ГЕМОЛИТИК» и 200 мкл исследуемой цельной крови, используя наконечник с фильтром. Пробирки плотно закрыть и аккуратно перемешать содержимое на вортексе. Инкубировать 3 мин при температуре 18–25 °С, затем еще раз аккуратно перемешать на вортексе и оставить еще на 3 мин. Перемешать на вортексе, после чего центрифугировать 2 мин при 4 тыс. g (например, 8 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). После центрифугирования удалить надосадочную жидкость, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, не захватывая осадок. К полученному осадку добавить 500 мкл реагента «ГЕМОЛИТИК». Закрыть пробирки, перемешать содержимое пробирок на вортексе до полного ресуспендирования клеток. Затем инкубировать пробирки 3 мин при температуре 18–25 °С и еще раз перемешать содержимое пробирок на вортексе. После чего центрифугировать 2 мин при 4 тыс. g (например, 8 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). После центрифугирования удалить надосадочную жидкость, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, не захватывая осадок.

ВНИМАНИЕ! Лейкоцитарная фракция, полученная после предварительной обработки цельной венозной или пуповинной крови, должна быть немедленно лизирована или заморожена.

Допускается хранение предобработанных образцов

лейкоцитов венозной, пуповинной крови до проведения ПЦР-исследования:

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

Бронхоальвеолярная лаважная жидкость

Образец бронхоальвеолярной лаважной жидкости перемешать на вортексе и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с. Отобрать, используя наконечник с фильтром, 1 мл материала и перенести в пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 10 мин при 7–10 тыс. g (например, 10–12 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf). Используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, удалить супернатант, оставляя над осадком 100–200 мкл надосадочной жидкости (если иной объем не предусмотрен инструкцией по применению к набору реагентов), затем тщательно перемешать содержимое на вортексе и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с. Полученный образец использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов бронхоальвеолярной лаважной жидкости до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 12 месяцев);
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мокрота

В емкость с мокротой добавить реагент «МУКОЛИЗИН» в соотношении 1:5 (1 часть мокроты к 5 частям реагента), ориентируясь по градуировке емкости. В процессе разжижения мокроты (20–30 мин) емкость необходимо периодически встряхивать при помощи шейкера. Затем 1 мл разжиженной мокроты перенести, используя наконечник с фильтром, в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировать 10 мин при 5–

7 тыс. g (например, 8–10 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).

Удалить супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100–200 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученную пробу после тщательного перемешивания на вортексе и осаждения капель со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием в течение 3–5 с использовать для экстракции ДНК.

Допускается экстракция ДНК из 100 мкл разжиженной мокроты без стадии центрифугирования.

Допускается хранение предобработанных образцов мокроты до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °C – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 12 месяцев);
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал

Тканевой материал (размер образца в диаметре менее 5 мм), помещенный в пробирки объемом 1,5–2 мл с 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)»

Перед проведением процедуры экстракции ДНК содержимое пробирки тщательно перемешать на вортексе и осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1,5–3 тыс. об/мин в течение 5 с). Другие манипуляции по подготовке образца не требуются.

Тканевой материал (размер образца в диаметре 5–10 мм)

Поместить образец в охлажденную фарфоровую ступку, при необходимости измельчить с помощью ножниц и скальпеля. Добавить 0,5–1 мл охлажденного 0,9 % раствора натрия хлорида стерильного (стерильный физиологический раствор) или фосфатно-солевого буферного раствора, или «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». Гомогенизировать, тщательно растирая фарфоровым пестиком для получения однородной суспензии. 100 мкл полученной суспензии перенести в пробирки объемом 1,5 мл, используя

наконечник с фильтром, для последующей экстракции ДНК.

Тканевой материал (размер образца в диаметре более 10 мм)

30–50 мг (мкл) тканевого материала гомогенизировать растиранием с использованием предварительно охлажденных стерильных фарфоровых ступок и пестиков. При использовании гомогенизатора фрагменты ткани перенести в пробирки объемом 2 мл с 1–2 шариками из нержавеющей стали для гомогенизатора. Из растертой ткани приготовить 10 % суспензию на охлажденном 0,9 % растворе натрия хлорида стерильном (стерильный физиологический раствор) или фосфатно-солевом буферном растворе. Для этого к 1 объему растертого тканевого материала добавить 9 объемов 0,9 % раствора натрия хлорида стерильного или фосфатно-солевого буферного раствора. 50–100 мкл полученной суспензии перенести в пробирки объемом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром, для последующей экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК, реакции амплификации и качества взятия материала в наборе реагентов предусмотрено количественное определение ДНК человека, которая содержится в биологическом образце. По окончании реакции амплификации наличие достаточного количества ДНК человека в образце говорит об адекватности забранного материала, достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в

- качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 7).

Протестированы модельные образцы заявленного биологического материала без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 7. В модельные образцы добавляли также стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6А/В, до концентраций каждой из мишеней, равных пределу обнаружения.

Таблица 7

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Комплект для экстракции	Наличие интерференции
Цельная (венозная, пуповинная) кровь	Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Общий холестерин	77,6 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Триглицериды	37,6 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Литий гепарин ⁶	от 12 до 30 МЕ/мл	«РИБО-преп»	Обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Обнаружено
		Калий ЭДТА ⁶	2,0 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено

⁶ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Комплект для экстракции	Наличие интерференции
Лейкоциты (венозной, пуповинной) крови	Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
		Общий холестерин	77,6 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
		Триглицериды	37,6 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
		Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Литий гепарин ⁶	от 12 до 30 МЕ/мл	«РИБО-преп»	<u>Обнаружено</u>
		Калий ЭДТА ⁶	2,0 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
Плазма (венозной, пуповинной) крови	Эндогенные вещества	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Литий гепарин ⁶	от 12 до 30 МЕ/мл	«РИБО-преп»	<u>Обнаружено</u>
		Калий ЭДТА ⁶	2,0 мг/мл	«МАГНО-сорб»	<u>Обнаружено</u>
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Муцин	0,15 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5%	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Слюна	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Муцин	0,15 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Спинномозговая жидкость	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,89 ммоль/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Лейкоциты	500 кл/мм ³ (верхняя граница нормы – 20 кл/мм ³)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Амниотическая жидкость	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Комплект для экстракции	Наличие интерференции
Транссудаты	Эндогенные вещества	Альбумин	500 мг/л	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Бронхо-альвеолярная лаважная жидкость	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Муцин	0,15 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Мокрота	Эндогенные вещества	Цельная кровь	5 %	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
		Муцин	0,15 мг/мл	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено
Тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	Эндогенные вещества	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	«РИБО-преп»	Не обнаружено
				«МАГНО-сорб»	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов, указанные в табл. 8:

Таблица 8

Комплект для экстракции ДНК	«РИБО-преп»	«МАГНО-сорб»	
Объем исследуемого образца, мкл	100	200	1000
Вид исследуемого материала	- цельная венозная, пуповинная кровь; - лейкоциты венозной, пуповинной крови; - плазма венозной, пуповинной крови; - мазки со слизистой оболочки ротоглотки; - слюна; - спинномозговая жидкость; - амниотическая жидкость; - транссудаты; - бронхоальвеолярная лаважная жидкость; - мокрота; - тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	- цельная венозная, пуповинная кровь; - плазма венозной, пуповинной крови; - мазки со слизистой оболочки ротоглотки; - слюна; - спинномозговая жидкость; - амниотическая жидкость; - транссудаты; - бронхоальвеолярная лаважная жидкость; - мокрота; - тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	- плазма венозной, пуповинной крови; - спинномозговая жидкость; - амниотическая жидкость; - транссудаты

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

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁷. Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «МАГНО-сорб».

⁷ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

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

ВНИМАНИЕ! Добавление внутреннего контрольного образца не требуется.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

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

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 10 мкл ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV6* и ДНК человека и 90 мкл ОКО.

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

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

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» из 200 мкл:

ВНИМАНИЕ! Добавление внутреннего контрольного образца не требуется.

Объем исследуемого образца – 200 мкл.

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

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 20 мкл ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV6* и ДНК человека и 180 мкл ОКО.

Объем элюции – 100 мкл.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» из 1000 мкл:

ВНИМАНИЕ! Добавление внутреннего контрольного образца не требуется.

Объем исследуемого образца – 1000 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 1000 мкл ОКО.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 100 мкл ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV6* и ДНК человека и 900 мкл ОКО.

Объем элюции – 100 мкл.

ФОРМА 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L-t СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L-t – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Lymphocryptovirus humangamma4 (EBV)*, *Cytomegalovirus humanbeta5 (CMV)*, *Roseolovirus humanbeta6a / Roseolovirus humanbeta6b (HHV6A/B)* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент		Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>EBV / CMV / HHV6</i> / Glob-Lyo		Порошок белого цвета	–	96 пробирок объемом 0,2 мл
К–		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО ДНК <i>EBV / CMV / HHV6</i> и ДНК человека		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Электронный калькулятор на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® *EBV / CMV / HHV6A/B*-скрин» – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью

EBV / CMV / HHV6 / Glob-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).

2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

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

3. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл К-.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл ДНК-калибратора KSG 2.
- в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.
- г) положительный контроль экстракции (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV6* и ДНК человека.

Для количественного определения ДНК:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл К-.
- б) ДНК-калибратор K1 – в две пробирки с реакционной смесью внести по 25 мкл ДНК-калибратора KSG1.
- в) ДНК-калибратор K2 – в две пробирки с реакционной смесью внести по 25 мкл ДНК-калибратора KSG2.
- г) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.
- д) положительный контроль экстракции (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы,

экстрагированной из ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV8* и ДНК человека.

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

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 9, 10)⁸.

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁹ и планшетного¹⁰ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам,

⁸ Программы амплификации (табл. 9, 10) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

⁹ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

¹⁰ Например, CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ⁹			Приборы планшетного типа ¹⁰		
	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5**. При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

В. Анализ и интерпретация результатов

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

Таблица 11

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК участка β-глобинового гена (BKO Glob)	ДНК ВЭБ	ДНК ЦМВ	ДНК ВГЧ-6A/B

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», используя приведенный ниже алгоритм или электронный калькулятор на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин».

ВНИМАНИЕ! Работа электронного калькулятора «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин» осуществляется при использовании программы Microsoft® Excel, входящей в состав приложений Microsoft® Office. Для начала работы необходимо скопировать файл электронного калькулятора с носителя или сайта Изготовителя на жесткий диск персонального компьютера. Порядок работы с электронным калькулятором, а также его назначение и характеристики описаны во вкладке «Инструкция» электронного калькулятора «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин».

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

Принцип интерпретации результатов при проведении качественного исследования указан в табл. 12:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
определено меньше граничного*	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	ДНК ВЭБ обнаружена
определено меньше граничного*	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК ЦМВ обнаружена
определено меньше граничного*	определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК ВГЧ-6A/B обнаружена
определено меньше граничного*	отсутствует	отсутствует	отсутствует	ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6A/B НЕ обнаружены

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
отсутствует или определено больше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	Невалидный**
определено меньше граничного*	определено больше граничного	определено больше граничного	определено больше граничного	Сомнительный***

* Для образцов слюны, плазмы венозной, пуповинной крови, спинномозговой жидкости, амниотической жидкости, транссудата, бронхоальвеолярной лаважной жидкости, мокроты **ДОПУСТИМО** отсутствие или превышение граничного значения Ct.

** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК (если значение Ct по каналу для флуорофора FAM больше граничного) или повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование (если значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует).

*** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца в двух повторах, начиная с этапа экстракции. В случае получения воспроизводимого положительного значения Ct – результат считать **положительным**.

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

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 13 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 13

**Результаты для контролей различных этапов
качественного ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР- исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Для проведения количественного исследования исходя из заданных значений концентрации ДНК-калибраторов и полученных значений Ct, происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВЭБ (EBV), ДНК ЦМВ (CMV), ДНК ВГЧ-6А/В (HHV6A/B) и ДНК человека (ВКО Glob) в копиях/реакцию. Полученные значения используются для расчета количества копий ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В в 1 мл исследуемых образцов всех видов биологического материала:

число копий ДНК ВЭБ на реакцию	x 100	x A	= копий/мл
число копий ДНК ЦМВ на реакцию	x 100	x A	= копий/мл
число копий ДНК ВГЧ-6А/В на реакцию	x 100	x A	= копий/мл

где:

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

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

Для образцов цельной венозной, пуповинной крови; лейкоцитов венозной, пуповинной крови; тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала) полученные значения концентрации ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В в копиях на реакцию могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В на 10⁵ клеток человека). Расчет

нормированных значений концентрации ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6A/B производят согласно формулам:

$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВЭБ на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВЭБ на } 10^5 \text{ клеток человека})$
$\lg \left(\frac{\text{число копий ЦМВ на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ЦМВ на } 10^5 \text{ клеток человека})$
$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-6A/B на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-6A/B на } 10^5 \text{ клеток человека})$

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

Для расчета нормированных значений используется коэффициент пересчета: 2×10^5 геномов человека = 10^5 клеток.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов.

Принцип интерпретации результатов при проведении количественного исследования указан в табл. 14:

Таблица 14

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный – невозможен расчет концентрации (при исследовании цельной венозной, пуповинной крови, лейкоцитов венозной, пуповинной крови, тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
Невалидный – невозможен расчет концентрации (при исследовании мазка со слизистой оболочки ротоглотки)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
ДНК ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6A/B не обнаружены	Значение C_t для ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6A/B отсутствует, а по каналу для флуорофора FAM концентрация ДНК ВКО Glob больше граничной*

Результат	Интерпретация
Менее 1×10^3 (при экстракции из 100 и 200 мкл образца) и менее 300 (при экстракции из 1000 мкл образца) копий ДНК ВЭБ /мл и/или ДНК ЦМВ/мл и/или ДНК ВГЧ-6А/В/мл	ДНК ВЭБ и/или ДНК ЦМВ и/или ДНК ВГЧ-6А/В обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
$X \times 10^y$ копий ДНК ВЭБ /мл и/или ДНК ЦМВ/мл и/или ДНК ВГЧ-6А/В/мл	ДНК ВЭБ и/или ДНК ЦМВ и/или ДНК ВГЧ-6А/В обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов
более 1×10^7 копий ДНК ВЭБ /мл и/или ДНК ЦМВ/мл и/или ДНК ВГЧ-6А/В/мл	ДНК ВЭБ и/или ДНК ЦМВ и/или ДНК ВГЧ-6А/В обнаружена в концентрации больше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К– (например, в 10 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца

* **ВНИМАНИЕ!** Для образцов слюны, плазмы венозной, пуповинной крови, спинномозговой жидкости, амниотической жидкости, транссудата, бронхоальвеолярной лаважной жидкости и мокроты **ДОПУСТИМО** количество ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 15 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 15

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
ПК	Экстракция ДНК	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон
ОК	Экстракция ДНК	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К–	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР- исследо- вания	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
KSG1	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация
KSG2	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* и диапазон концентрации ПКО ДНК *EBV* / *CMV* / *HHV6* и ДНК человека указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. При проведении качественного ПЦР-исследования для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. При проведении качественного ПЦР-исследования для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
3. При проведении количественного ПЦР-исследования рассчитанная концентрация ПКО ДНК *EBV* / *CMV* / *HHV6* и ДНК человека не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-

либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

5. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибраторов KSG1 и KSG2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 15). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
7. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
8. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Lymphocryptovirus humangamma4 (EBV)*, *Cytomegalovirus humanbeta5 (CMV)*, *Roseolovirus humanbeta6a / Roseolovirus humanbeta6b (HHV6A/B)* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент		Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT <i>EBV / CMV / HHV6 / Glob</i>		Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	2 пробирки
ПЦР-буфер-Н		Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
К–		Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО ДНК <i>EBV / CMV / HHV6</i> и ДНК человека		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»).

Электронный калькулятор на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® *EBV / CMV / HHV6A/B*-скрин» – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *EBV / CMV / HHV8 / Glob* и 5 мкл ПЦР-буфера-Н. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию (см. табл. 16).

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

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT *EBV / CMV / HHV8 / Glob*. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-1-FRT *EBV / CMV / HHV8 / Glob* и ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT *EBV / CMV / HHV8 / Glob* и ПЦР-буфера-Н, осадить капли на вортексе.

Таблица 16

Схема приготовления реакционных смесей

		Объем реагентов на указанное количество реакций, мкл	
Объем реагентов на одну реакцию, мкл		10,0	5,0
Число исследуемых образцов		ПЦР-смесь-1-FRT EBV / CMV / HHV6 / Glob	ПЦР-буфер-Н
для количественного определения	для качественного определения		
1	4	90	45
2	5	100	50
3	6	110	55
4	7	120	60
5	8	130	65
6	9	140	70
7	10	150	75
8	11	160	80
9	12	170	85
10	13	180	90
11	14	190	95
12	15	200	100
13	16	210	105
14	17	220	110
15	18	230	115
16	19	240	120
17	20	250	125
18	21	260	130
19	22	270	135
20	23	280	140
21	24	290	145
22	25	300	150
23	26	310	155
24	27	320	160
25	28	350	165
30	33	380	190

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированной с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции

методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К-.**
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ДНК-калибратора KSG 2.**
- в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.**
- г) положительный контроль экстракции (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV8* и ДНК человека.**

Для количественного определения ДНК:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К-.**
- б) ДНК-калибратор K1 – в две пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл ДНК-калибратора KSG1.**
- в) ДНК-калибратор K2 – в две пробирки с реакционной смесью внести по 10 мкл ДНК-калибратора KSG2.**
- г) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.**
- д) положительный контроль экстракции (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV8* и ДНК человека.**

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

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
2. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» и запустить выполнение программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 17, 18)¹¹.

Таблица 17

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного¹² и планшетного¹³ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

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

¹¹ Программы амплификации (табл. 17, 18) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

¹² Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

¹³ Например, CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).



Таблица 18

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»

Приборы роторного типа ¹²				Приборы планшетного типа ¹³		
Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5**. При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

В. Анализ и интерпретация результатов

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

Таблица 19

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob)	ДНК ВЭБ	ДНК ЦМВ	ДНК ВГЧ-6A/B

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» с помощью приведенного ниже алгоритма или электронного калькулятора на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин».

ВНИМАНИЕ! Работа электронного калькулятора «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин» осуществляется при использовании программы Microsoft® Excel, входящей в состав приложений Microsoft® Office. Для начала работы необходимо скопировать файл электронного калькулятора с носителя или

сайта Изготовителя на жесткий диск персонального компьютера. Порядок работы с электронным калькулятором, а также его назначение и характеристики описаны во вкладке «Инструкция» электронного калькулятора «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин».

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

Принцип интерпретации результатов при проведении качественного исследования указан в табл. 20:

Таблица 20

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Sy5	
определено меньше граничного*	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	ДНК ВЭБ обнаружена
определено меньше граничного*	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК ЦМВ обнаружена
определено меньше граничного*	определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК ВГЧ-6A/B обнаружена
определено меньше граничного*	отсутствует	отсутствует	отсутствует	ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6A/B НЕ обнаружены
отсутствует или определено больше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	определено или отсутствует	Невалидный**
определено меньше граничного*	определено больше граничного	определено больше граничного	определено больше граничного	Сомнительный***

* Для образцов слюны, плазмы венозной, пуповинной крови, спинномозговой жидкости, амниотической жидкости, транссудата, бронхоальвеолярной лаважной жидкости, мокроты

ДОПУСТИМО отсутствие или превышение граничного значения C_t .

****** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК (если значение C_t по каналу для флуорофора FAM больше граничного) или повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование (если значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует).

******* В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца в двух повторах, начиная с этапа экстракции. В случае получения воспроизводимого положительного значения C_t – результат считать **положительным**.

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

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 21 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 21

**Результаты для контролей различных этапов
качественного ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР- исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Для проведения количественного исследования исходя из заданных значений концентрации ДНК-калибраторов и полученных значений C_t , происходит автоматическое

построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВЭБ (EBV), ДНК ЦМВ (CMV), ДНК ВГЧ-6А/В (HHV6A/B) и ДНК человека (ВКО Glob) в копиях/реакцию. Полученные значения используются для расчета количества копий ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В в 1 мл исследуемых образцов всех видов биологического материала:

число копий ДНК ВЭБ на реакцию	x 100	x A	= копий/мл
число копий ДНК ЦМВ на реакцию	x 100	x A	= копий/мл
число копий ДНК ВГЧ-6А/В на реакцию	x 100	x A	= копий/мл

где:

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

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

Для образцов цельной венозной, пуповинной крови; лейкоцитов венозной, пуповинной крови; тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала) полученные значения концентрации ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В в копиях на реакцию могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6А/В производят согласно формулам:

$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВЭБ на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВЭБ на } 10^5 \text{ клеток человека})$
$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ЦМВ на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ЦМВ на } 10^5 \text{ клеток человека})$
$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-6А/В на реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО Glob на реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-6А/В на } 10^5 \text{ клеток человека})$

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

Для расчета нормированных значений используется коэффициент пересчета: 2×10^5 геномов человека = 10^5 клеток.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов.

Принцип интерпретации результатов при проведении количественного исследования указан в табл. 22:

Таблица 22

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный – невозможен расчет концентрации (при исследовании цельной венозной, пуповинной крови, лейкоцитов венозной, пуповинной крови, тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
Невалидный – невозможен расчет концентрации (при исследовании мазка со слизистой оболочки ротоглотки)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
ДНК ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6A/B не обнаружены	Значение C_t для ДНК ВЭБ, ДНК ЦМВ, ДНК ВГЧ-6A/B отсутствует, а по каналу для флуорофора FAM концентрация ДНК ВКО Glob больше граничной*
Менее 1×10^3 (при экстракции из 100 и 200 мкл образца) и менее 300 (при экстракции из 1000 мкл образца) копий ДНК ВЭБ /мл и/или ДНК ЦМВ/мл и/или ДНК ВГЧ-6A/B/мл	ДНК ВЭБ и/или ДНК ЦМВ и/или ДНК ВГЧ-6A/B обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
$X \times 10^y$ копий ДНК ВЭБ /мл и/или ДНК ЦМВ/мл и/или ДНК ВГЧ-6A/B/мл	ДНК ВЭБ и/или ДНК ЦМВ и/или ДНК ВГЧ-6A/B обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов
более 1×10^7 копий ДНК ВЭБ /мл и/или ДНК ЦМВ/мл и/или ДНК ВГЧ-6A/B/мл	ДНК ВЭБ и/или ДНК ЦМВ и/или ДНК ВГЧ-6A/B обнаружена в концентрации больше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К– (например, в 10 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца

* **ВНИМАНИЕ!** Для образцов слюны, плазмы венозной, пуповинной крови, спинномозговой жидкости, амниотической жидкости, транссудата, бронхоальвеолярной лаважной жидкости

и мокроты **ДОПУСТИМО** количество ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 23 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 23

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
ПК	Экстракция ДНК	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон
ОК	Экстракция ДНК	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К–	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
KSG1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация
KSG2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t и диапазон концентрации ПКО ДНК *EBV* / *CMV* / *HHV6* и ДНК человека указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. При проведении качественного ПЦР-исследования для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. При проведении качественного ПЦР-исследования для положительного контроля экстракции (ПК) значение

- порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
3. При проведении количественного ПЦР-исследования рассчитанная концентрация ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV8* и ДНК человека не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
 4. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
 5. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 6. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибраторов KSG1 и KSG2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 23). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении

неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

8. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

•
..

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 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 10 сут (для формы 1) и 5 сут (для формы 2) в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L-t хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *EBV / CMV / HHV6 / Glob-Lyo* после вскрытия вакуумной упаковки хранить в закрытом Zip-Lock пакете с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN состоит из двух частей, хранящихся при разных температурах:

- часть 1 (К-, KSG1, KSG2, ОКО, ПКО ДНК *EBV / CMV / HHV6* и ДНК человека) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С;
- часть 2 (ПЦР-смесь-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob*, ПЦР-буфер-Н) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Верхняя граница температурного диапазона



Дата изготовления



Изготовитель



Не допускать воздействия влаги

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 68
шестьдесят один лист _____

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

« 19 » марта 2024 г.

А.О.Лисицына

Всего пронумеровано _____, скреплено печатью 69 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.



Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B- скрин-FL»

Форма 1:  H-0951-1-14

Форма 2:  H-0952-1-1



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



ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «РИБО-преп»,
- «МАГНО-сорб» (с использованием магнитных штативов вручную или автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот)¹.

Контроли: Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроль экстракции.

ВНИМАНИЕ! Для цельной венозной, пуповинной крови; лейкоцитов венозной, пуповинной крови; бронхоальвеолярной лаважной жидкости; мокроты; тканевого (биопсийного, операционного, аутопсийного) материала размером более 5 мм требуется предварительная подготовка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
- цельная венозная, пуповинная кровь; - лейкоциты венозной, пуповинной крови; - плазма венозной, пуповинной крови; - мазки со слизистой оболочки ротоглотки; - слюна; - спинномозговая жидкость; - амниотическая жидкость; - транссудаты; - бронхоальвеолярная лаважная жидкость; - мокрота; - тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ОКО + ПК ДНК <i>EBV / CMV / HHV6</i> и ДНК человека	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК
Элюция		
все образцы	50 мкл	в каждую пробирку (форма 2 – «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)
	100 мкл	в каждую пробирку (форма 1 – «ПЦР-комплект» вариант FRT-L-t)
При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» из 200 мкл исследуемого образца добавить:		
- цельная венозная, пуповинная кровь; - плазма венозной, пуповинной крови; - мазки со слизистой оболочки ротоглотки; - слюна; - спинномозговая жидкость; - амниотическая жидкость; - транссудаты; - бронхоальвеолярная лаважная жидкость; - мокрота; - тканевой (биопсийный, операционный, аутопсийный) материал	200 мкл	в пробирки/лунки для исследуемых образцов
ОКО	200 мкл	в пробирку/лунку для ОК
ОКО + ПК ДНК <i>EBV / CMV / HHV6</i> и ДНК человека	180 мкл + 20 мкл	в пробирку/лунку для ПК
Элюция		
все образцы	100 мкл	в каждую пробирку/лунку
При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» из 1000 мкл исследуемого образца:		
- плазма венозной, пуповинной крови; - спинномозговая жидкость; - амниотическая жидкость; - транссудаты	1000 мкл	в пробирки/лунки для исследуемых образцов
ОКО	1000 мкл	в пробирку/лунку для ОК
ОКО + ПК ДНК <i>EBV / CMV / HHV6</i> и ДНК человека	900 мкл + 100 мкл	в пробирку/лунку для ПК
Элюция		
все образцы	100 мкл	в каждую пробирку/лунку

ВНИМАНИЕ! Добавление внутреннего контрольного образца не требуется.

м для экстракции
контроли

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L-t

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

Контроли:

Качественный анализ - 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Количественный анализ - 1 отрицательный контроль ПЦР (К-), 2 ДНК-калибратора K1 и 2 ДНК-калибратора K2; 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

- Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью EBV / CMV / HHV6 / Glob-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов, ОК, ПК	в пробирку для исследуемых образцов, ОК, ПК <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
К-	в пробирку для К-
ДНК-калибратор KSG2	в пробирку для К+ (качественный анализ) в две пробирки для ДНК-калибратора K2 (количественный анализ)
ДНК-калибратор KSG1	в две пробирки для ДНК-калибратора K1 (количественный анализ)

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

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 FN

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли:

Качественный анализ - 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Количественный анализ - 1 отрицательный контроль ПЦР (К-), 2 ДНК-калибратора K1 и 2 ДНК-калибратора K2; 1 отрицательный (ОК) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT EBV / CMV / HHV6 / Glob.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-1-FRT EBV / CMV / HHV6 / Glob	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей;
ПЦР-буфер-Н	5*(N+K+1)	1 – запас

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

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для ПЦР исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов, ОК, ПК	в пробирки для исследуемых образцов, ОК, ПК <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
К-	в пробирку для К-
ДНК-калибратор KSG2	в пробирку для К+ (качественный анализ) в две пробирки для ДНК-калибратора K2 (количественный анализ)
ДНК-калибратор KSG1	в две пробирки для ДНК-калибратора K1 (количественный анализ)

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки краям реакционного модуля амплификатора.
- Запрограммировать и запустить амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени»².

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

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

Цикл	Программа амплификации «АмплиСенс-1»							
	Приборы роторного типа				Приборы планшетного типа			
	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5	95	5 с	—	5
	60	20 с	—		60	20 с	—	
	72	15 с	—		72	15 с	—	
	95	5 с	—		95	5 с	—	
3	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	40	60	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	40
	72	15 с	—		72	15 с	—	
	95	5 с	—		95	5 с	—	

При одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам. Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводить вручную с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью электронного калькулятора на базе Microsoft® Excel «АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6A/B-скрин».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX	Cy5
Мишень для амплификации	ДНК участка β-глобинового гена (BKO Glob)	ДНК ВЭБ	ДНК ЦМВ	ДНК ВГЧ-6A/B

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, значения концентрации калибраторов, диапазон концентраций ПКО ДНК EBV / CMV / HHV6 и ДНК человека и граничные значения порогового цикла (Ct), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3
три лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)

« 25 » марта 2024 г.
м.п.

А.О.Лисицына

