«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.В. Малеев
«09» января 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения мРНК химерного гена bcr-abl (вариант M-bcr) и мРНК гена abl в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® Лейкоз Квант M-bcr-FRT»

для приборов «iQ iCycler», «iQ5» («Bio-Rad», США);
«Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия);
«Mx3000P», «Mx3005P» («Stratagene», США);
«ABIPrism» 7700 («Applied Biosystem», США)

Набор реагентов состоит из трёх комплектов реагентов:

- **«РИБО-золь-D» вариант 100** – комплект реагентов для выделения РНК из клинического материала;
- **«РЕВЕРТА-L» вариант 100** – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК;
- **«АмплиСенс» вариант FRT** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК bcr-abl и abl с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ФОРМА ВЫПУСКА.

Комплект реагентов «РИБО-золь-D» вариант 100 включает:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Раствор А	Прозрачная вязкая жидкость желтого цвета	48	1 флакон

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
Раствор B	Прозрачная бесцветная жидкость	10	2 флакона
Раствор C	Прозрачная бесцветная жидкость	48	1 флакон
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	48	1 флакон
Ацетат натрия	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	4 пробирки
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
РНК-элюент *bcr-abl*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	10 пробирок

Дополнительно к комплекту реагентов «РИБО-золь-D» прилагаются следующие реактивы:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ОКО	Жёлтая опалесцирующая	1,6	2 пробирки
тРНК 1 мкг/мкл	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок
ПКО-1 *bcr-abl*-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО-2 *bcr-abl*-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	5 пробирок

Комплект рассчитан на выделение РНК из 120 проб, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 100 включает**:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
DTT лиофилизированный	Порошок белого цвета	—	10 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	10 пробирок
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на 120 реакций обратной транскрипции, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «АмплиСенс» вариант FRT включает:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT *M-bcr-abl*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,13	10 пробирок
ПЦР-смесь-1-FRT *N-abl*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,13	10 пробирок
ПЦР-буфер-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	10 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	10 пробирок
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Дополнительно к комплекту реагентов «АмплиСенс» прилагаются следующие реактивы:

Реактив		*Описание*	*Объем*	*Кол-во*
ДНК-калибраторы	**K1 *bcr-abl / gus***	Прозрачная бесцветная жидкость	0,045	5 пробирок
	K2 *bcr-abl / gus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,045	5 пробирок
	K3 *bcr-abl / gus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,045	5 пробирок
	K4 *bcr-abl / gus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,045	5 пробирок
	K5 *bcr-abl / gus*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,045	5 пробирок

Комплект рассчитан на постановку 360 реакций, включая контрольные образцы (по 180 реакций с каждой ПЦР-смесью-1-FRT).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов **«АмплиСенс® Лейкоз Квант *M-bcr*-FRT»**, предназначенный для выявления и количественного определения мРНК химерного гена *bcr-abl* (вариант *M-bcr*) и мРНК гена *abl* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов может быть использован для скринингового выявления случаев ХМЛ (хронический миелоидный лейкоз), ассоциированного с хромосомной перестройкой M-*bcr-abl*, для подтверждения диагноза ХМЛ, для мониторинга минимальной остаточной болезни (MRD) и эффективности терапии.

Набор реагентов рассчитан на проведение исследования в количественном формате – 50 клинических образцов в двух повторах или в скрининговом (качественном) формате – 100 клинических образцов (120 экстракций РНК, 120 реакций обратной транскрипции, 360 ПЦР, включая контрольные).

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод выявления мРНК гена *bcr-abl* в клиническом материале, основан на:

а) экстракции тотальной РНК из клеток периферической крови; клеток пунктата костного мозга (по методу Хомчинского);
б) проведении реакции обратной транскрипции;
в) последующей амплификацией с детекцией в режиме

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«реального времени» с двумя смесями олигонуклеотидов: амплификация участка мРНК химерного гена *M-bcr-abl* (p210), соответствующего участку сшивки генов *bcr* и *abl* (b2a2 и b3a2) и фрагмента мРНК области сплайсинга гена *abl* (рекомендован рабочей группой «Europe Against Cancer», EAC), в качестве эндогенного внутреннего контроля и гена-нормализатора. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме «реального времени».

Результат амплификации кДНК *bcr-abl* регистрируется по каналу флуоресценции Yellow/JOE/HEX, результат амплификации *abl* регистрируется по каналу Yellow/JOE/HEX.

Использование эндогенного внутреннего контроля позволяет контролировать основные этапы анализа (забор, транспортирование, хранение, выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции РНК и непосредственно амплификации кДНК), а также точно рассчитывать количество мРНК химерного гена *bcr-abl* с учетом количества и качества клинического материала (нормализация).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[1], биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром[2]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

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

[2] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- 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.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

<u>Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.</u>

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА. (с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для этапа выделения ДНК требуются:

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, фирмы «Axygen», США).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

24 до минус 16 °С.

12. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения реакций обратной транскрипции и амплификации, а также детекции продуктов амплификации требуются:

1. Амплификатор «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ iCycler» («Bio-Rad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США) и «ABIPrism» 7700 («Applied Biosystem», США).
2. **Для прибора «Rotor-Gene»**: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Axygene», США) для постановки в ротор на 36 пробирок или 0,1 мл («Corbett Research», Австралия) для постановки в ротор на 72 пробирки.

   Для прибора «iQ iCycler»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Axygene», США), стрипованные пробирки с куполообразной крышкой или 96-луночный планшет для ПЦР, снабженный термостабильными оптически прозрачными пленками (например, «Bio-Rad», США).

   Для прибора «Mx3000P»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка, стрипованные или нет) (например, «Axygen», США) или плашки для ПЦР с оптически-прозрачными термостабильными клейкими пленками.

   Для прибора «ABIPrism»: Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (куполообразная крышка, стрипованные или нет) (например, «Axygen», США) или плашки для ПЦР с оптически-прозрачными термостабильными клейкими пленками.
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники для микропипеток до 200 мкл (например, «Axygene», США).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Axygene», США)
8. Штативы для наконечников (например, «Axygene», США) и микропробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
9. Холодильник от 2 до 8 °С, с морозильной камерой не выше минус 16 °С для реагентов и выделенных ДНК.
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
11. Емкость для сброса наконечников.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.

Для проведения анализа используется:
Клетки периферической крови.

Вариант 1. Кровь с ЭДТА. Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в объеме 5 мл в пробирку с 6% раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают. Для отбора клеток:

а) пробирку с кровью центрифугируют в течение 20 мин при 800-1600 об/мин при комнатной температуре ***не позднее 48 часов с момента взятия крови*** (при условии хранения цельной крови при температуре от 2 до 6 °С). Все белые клетки крови (белая пленка на поверхности отстоявшейся эритроцитарной массы) аккуратно отбирают (до общего объема образца 200 мкл, захват эритроцитов и плазмы допустимы) и немедленно помещают в 800 мкл лизирующего раствора **D** из прилагающегося комплекта реагентов «РИБО-золь-D» и перемешивают. Данный образец допускается хранить до обработки при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

Б) цельную кровь обрабатывают лизирующим эритроциты реагентом гемолитик*. Для этого к 2,5 мл цельной крови добавляют 7,0 мл гемолитика, перемешивают и центрифугируют 5 мин при 3 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость отбирают, не задевая осадка. К осадку добавляют

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

800 мкл лизирующего раствора **D** из прилагающегося комплекта реагентов «РИБО-золь-D» и перемешивают. Данный образец допускается хранить до обработки при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

* реагент не входит в состав набора реагентов и закупается отдельно.

Вариант 2. Кровь с РНК-стабилизатором. Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в объеме 2,5 мл в пробирку с РНК-стабилизатором (например, *PAXgene (PreAnalytiX).* Закрытую пробирку с несколько раз переворачивают. Допускается хранение данного образца в течение двух суток при температуре 25 °С или 4 суток при температуре 4 °С.

Клетки пунктата костного мозга.

200 мкл пунктата костного мозга немедленно после забора помещают в 800 мкл лизирующего раствора **D** из прилагающегося комплекта реагентов «РИБО-золь-D» и перемешивают. Пробирки центрифугируют 5 мин при 5 тыс. об/мин и в случае наличия осадка надосадочную жидкость переносят в новую пробирку (далее работают с надосадочной жидкостью). Данный образец допускается хранить до обработки при температуре не выше минус 16 °С до 1 месяца и температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ФОРМАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Ввиду того, что приготовленная смесь для проведения ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) не подлежит хранению, рекомендуется планировать исследование таким образом, чтобы реагенты использовались в полном объеме. Ниже приведена таблица, позволяющая оптимально спланировать исследование.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Формат постановки	***Количественный*** 		***Скрининговый (качественный)*** 	
	Одна панель *(Ротор 36)*	Две панели *(Ротор 72)*	Одна панель *(Ротор 36)*	Две панели *(Ротор 72)*
Количество исследуемых клинических образцов	*5 образцов*	*11 образцов*	*10 образцов*	*22 образца*
Экстракция РНК	*12 экстракций* 5 клинических образцов в двух повторах, низкоконцентрированный положительный контроль-(ПКО-1), а также отрицательный контроль в одном повторе	*24 экстракции* 11 клинических образцов в двух повторах, низкоконцентрированный положительный контроль (ПКО-1), а также отрицательный контроль в одном повторе	*12 экстракций* 10 клинических образцов, низкоконцентрированный положительный контроль (ПКО-1), а также отрицательный контроль в одном повторе	*24 экстракции* 22 клинических образца, низкоконцентрированный положительный контроль (ПКО-1), а также отрицательный контроль в одном повторе
Постановка ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)	*18 реакций на ПЦР-смеси-1 bcr-abl* *16 реакций на ПЦР-смеси-1 N-abl* 12 экстрагированных образцов и 1 ПЦР К- в обе смеси, 5 и 3 ДНК-калибраторов в одном повторе каждый (в зависимости от смеси), соответственно.	*36 реакций на ПЦР-смеси-1 bcr-abl* *32 реакций на ПЦР-смеси-1 N-abl* 24 экстрагированных образца и 2 ПЦР К- в обе смеси, 5 или 3 ДНК-калибраторов в двух повторах каждый (в зависимости от смеси).	*14 реакций на ПЦР-смеси-1 bcr-abl* *14 реакций на ПЦР-смеси-1 N-abl* 12 экстрагированных образцов, ПЦР К- и ДНК-калибратор К3 для смеси *N-abl* и ПЦР К- и ДНК-калибратор К5 для смеси *M-bcr-abl* в одном повторе каждый.	*26 реакций на ПЦР-смеси-1 bcr-abl* *26 реакций на ПЦР-смеси-1 N-abl* 24 экстрагированных образца ПЦР К-, ДНК-калибратор К3 для смеси *N-abl* и ПЦР К- и ДНК-калибратор К5 для смеси *M-bcr-abl* в одном повторе каждый.

Примечание: **Одна панель** – приведен расчет для постановки с использованием компонентов комплекта «РЕВЕРТА-L» (RT-mix, DTT лиофилизированный) «АмплиСенс» (ПЦР-смесь-1-FRT-*M-bcr-abl*, ПЦР-смесь-1-FRT-*N-abl*, ПЦР-буфер-FRT, Полимераза (TaqF)) по **одной** пробирке каждого. **Две панели** – приведен расчет для постановки с использованием компонентов по **две** пробирки каждого.

КОНТРОЛЬ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.

Положительные контрольные образцы (ПКО-1 и ПКО-2) – представляют собой количественно охарактеризованные фрагменты мРНК *bcr-abl*, защищенные оболочкой РНК-содержащего фага. Данные контрольные образцы позволяют оценить качество прохождение всех этапов исследования, а также работоспособность реагентов. Оценка осуществляется при сравнении заданных концентраций контролей, указанных в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

паспорте к набору реагентов с результатами, полученными в ходе исследования. Необходимо проводить постановку положительного контрольного образца ПКО-1 (низкоконцентрированный) всякий раз, когда происходит обработка образцов. Положительный контрольный образец ПКО-2 (высококонцентрированный) рекомендуется исследовать 1 раз (в начале использования) для данного набора реагентов.

ДНК-калибраторы (К1, К2, К3, К4, К5) – представляют собой количественно охарактеризованные препараты плазмид, содержащих вставку кДНК участка химеры *bcr-abl* и участка гена нормализатора *abl*. Используются для построения калибровочной прямой ПЦР для обеих ПЦР-смесей *M-bcr-abl* и *N-abl*, а также в качестве положительных контролей ПЦР.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) – представляет собой образец, исходно не содержащий РНК *bcr-abl* и РНК *abl*, прошедший все этапы пробоподготовки. Позволяет оценить качество и чистоту работы, а также валидность данных.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.

Проводится в ЗОНЕ-1 –комнате для обработки клинического материала.

Объем клинического материала для выделения РНК – 150-200 мкл.

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «Rnase-free», «Dnase-free».

В случае исследования в ***количественном формате*** экстракция РНК и постановка ОТ-ПЦР проводится в двух повторах для каждого образца.

В случае исследования в ***скрининговом (качественном) формате*** осуществляют экстракцию РНК из одной половины забранного материала, вторую сохраняют при температуре не выше минус 16 °С для обеспечения возможности проведения повторного исследования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Порядок работы.

1. Лизис.

Вариант 1. Кровь с ЭДТА.

а) Обработка крови реагентом «Гемолитик»:

При невозможности отобрать лейкоцитарное кольцо провести этап отмывки клеток белой крови при помощи реагента «Гемолитик». Для этого в отдельную пробирку объемом 10 мл для каждого образца внести **7,0 мл гемолитика** и добавить **2,5 мл цельной крови**. Полученный раствор перемешать на вортексе и центрифугировать 5 мин при 3 тыс. об/мин. Супернатант отобрать, не задевая осадка.

Добавить в каждую пробирку с осадком клеток **800 мкл раствора D**. Лизированный таким образом образец может храниться при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

Разделить полученный лизат на 2 равные части: для этого отобрать по 400-450 мкл лизата в чистые пробирки на 1,5 мл

б) Обработка клеток крови «лейкоцитарного кольца» (без использования «Гемолитика»):

Отобрать необходимое количество пробирок объемом 1,5 мл и внести в них по **800 мкл раствора D.** Поместить в приготовленные пробирки около **200 мкл** отобранных белых клеток крови (не позднее чем через 48 часов после забора крови при условии хранения цельной крови при температуре от 2 до 6 °С). Лизированный таким образом образец может храниться при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 месяца и при температуре не выше минус 68 °С в течение 1 года.

Разделить полученный лизат на 2 равные части: для этого отобрать по 400-450 мкл лизата в чистые пробирки на 1,5 мл.

Вариант 2. Кровь с РНК-стабилизатором.

Обработку начать с разделения образца на 2 равные части. Для этого в 2 отдельные пробирки на 5 мл отобрать по 4,5 мл образца.

Произвести центрифугирование 10 мин при 5000g. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадка.

Добавить в каждую пробирку с осадком **400 мкл раствора D**.

ВНИМАНИЕ! После добавления **раствора D** осадок полностью не растворяется. Полное растворение осадка происходит после

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

добавления **ацетата натрия** и **раствора А**.

2. **Подготовка положительных и отрицательных контролей (ПКО-1 или ПКО-2, ОКО)**. В две пробирки внести по **400 мкл раствора D** и **50 мкл ОКО.** Затем в одну из пробирок внести **10 мкл ПКО-2 *bcr-abl*-rec** (или **ПКО-1 *bcr-abl*-rec**). Перемешать на вортексе, осадить.
3. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **40 мкл ацетата натрия**. Перемешать на вортексе. Центрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
4. Добавить к раствору **400 мкл раствора А**, перемешать на вортексе. Центрифугировать для удаления капель с крышки пробирки
5. Добавить к раствору **130 мкл раствора В**. Перемешать на вортексе 1-2 минуты (раствор может быть от молочно-белого цвета до цвета какао с молоком в зависимости от количества попавших в образец эритроцитов).
6. Поставить пробирки в морозильную камеру с температурой не выше минус 16 °С на 10 минут.
7. Центрифугировать пробирки 10 мин при 13–16 тыс. об/мин (если количество пробирок нечетное, уравновесить центрифугу пробиркой на 1,5 мл, содержащей примерно 1 мл воды). В процессе центрифугирования раствор разделится на две фазы: нижнюю, содержащую белки и ДНК, и верхнюю – водную, содержащую РНК.
8. Во время центрифугирования образцов отобрать новые пробирки объемом 1,5 мл в количестве соответствующем количеству обрабатываемых образцов (включая контрольные). Внести в каждую по **400 мкл раствора С**.

ВНИМАНИЕ! В две пробирки с раствором С, в дальнейшем предназначенных для экстракции ПКО-2 (или ПКО-1) и ОКО необходимо внести по **10 мкл тРНК 1 мкг/мкл** (препарата нагрузочной РНК).

9. С образцов после центрифугирования аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно 400 мкл), используя наконечники с аэрозольным барьером и перенести в пробирки, содержащие **раствор С**. Верхняя фаза образцов ПКО-1, ПКО-2 и ОКО переносится в пробирки, содержащие **раствор С** и **тРНК**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Перемешать на вортексе, центрифугировать для удаления капель с крышки пробирки и поставить в морозильную камеру с температурой не выше минус 16 °С на 20 минут.
11. Центрифугировать пробирки 10 минут при 14 – 16 тыс. об/мин. Визуально найти положение осадка РНК (если пробирка была помещена в центрифугу «хвостиком» или меткой на крышке пробирки вверх, то осадок после центрифугирования будет находиться на дне пробирки строго под «хвостиком» или меткой). Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Если осадок не виден глазом, отобрать надосадочную жидкость не касаясь стенок, оставив на дне пробирки примерно 20 мкл.
12. На время центрифугирования поместить флакон с раствором для отмывки 3 в морозильную камеру с температурой не выше минус 16 °С.
13. Осадок ресуспендировать в **800 мкл холодного раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе, центрифугировать 10 мин при 14 – 16 тыс. об/мин. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадка.
14. Подсушить осадок в термостате для микропробирок при температуре 56 °С в течение 5-7 минут. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
15. Растворить осадок в **30 мкл РНК-элюента *bcr-abl*,** прогреть при температуре 56 °С в течение 2-3 минут. Супернатант содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Раствор РНК можно хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ЭТАП 2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР.

Проводится в ЗОНЕ 2 – комнате для подготовки и проведения ОТ и амплификации (ПЦР).

I. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.

(Общий объем реакции – 25 мкл, объем РНК-пробы – 15 мкл)

При работе с РНК необходимо использовать только

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

ВНИМАНИЕ! ***«****РНК-элюент bcr-abl» содержит компоненты, необходимые для прохождения реакции обратной транскрипции. Недопустимо использование РНК, разведенной в других растворах для элюции РНК*.

Порядок работы:

1. Отобрать необходимое количество микропробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **DTT лиофилизированным** добавить **125 мкл RT-mix** и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить **6 мкл ревертазы (MMlv)**, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в микропробирки по **10 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечник с аэрозольным барьером добавить **15 мкл РНК-пробы** в пробирку с реакционной смесью, используя наконечник с барьером. Осторожно перемешать.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) по программе:

Этап	Температура	Продолжительность этапа
1	50°C	15 мин
2	95°C	3 мин

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение недели или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

II. Постановка ПЦР.

(Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем кДНК-пробы – 10 мкл)

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество микропробирок для ПЦР на 0,2 мл или 0,1 мл. Расчет количества микропробирок осуществляется исходя из того, что каждый образец

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

исследуется в двух ПЦР-смесях (ПЦР-смесь-1-FRT *M-bcr-abl* и ПЦР-смесь-1-FRT *N-abl*). Кроме того, осуществляется постановка отрицательных контролей (по одному для каждой ПЦР-смеси-1-FRT), ДНК стандартов в количественном формате (5 для ПЦР-смесь-1-FRT *M-bcr-abl* и 5 для смеси ПЦР-смесь-1-FRT *N-abl*) или положительных контролей ПЦР в качественном формате (по одному для каждой ПЦР-смеси-1-FRT). Если число необходимое пробирок N, то:



в случае исследования в **количественном формате:**
N = Количество образцов кДНК *2 + 10



в случае исследования в **скрининговом (качественном) формате**
N = Количество образцов кДНК *2 + 4

2. В случае исследования **одной (двух) панели образцов** подготовить реакционные смеси исходя из следующего**:**
   - **ПЦР-буфера-FRT** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (0,02 мл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-буфером-FRT (0,3 мл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены.
   - В пробирку с **ПЦР-смесью-1-FRT M-*bcr-abl*** добавить **145 мкл** приготовленной смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF). Перемешать на вортексе, осадить капли.
   - Аналогично в пробирку с **ПЦР-сместью-1-FRT *N-abl*** добавить **145 мкл** приготовленной смеси ПЦР-буфера-FRT и полимеразы (TaqF). Перемешать на вортексе, осадить капли.

   В случае исследования **двух панелей** смеси готовят аналогично, но в двойном объеме.
3. В случае исследования **иного количества образцов** расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
   - **7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT;**
   - **7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT;**
   - **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

   При расчете необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше. Для исследования N образцов кДНК (каждый в одном повторе) необходимо

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

смешать:

Количественный формат		***Качественный (скрининговый) формат***	
Смесь для выявления *M-bcr-abl*	Смесь для выявления *N-abl*	Смесь для выявления *M-bcr-abl*	Смесь для выявления *N-abl*
(N+**7**) * 7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *M-bcr-abl* (N+**7**) * 7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT (N+**7**) * 0,5 мкл полимеразы (TaqF)	(N+**5**) * 7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *N-abl* (N+**5**) * 7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT (N+**5**) * 0,5 мкл полимеразы (TaqF)	(N+**3**) * 7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *M-bcr-abl* (N+**3**) * 7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT (N+**3**) * 0,5 мкл полимеразы (TaqF)	(N+**3**) * 7,0 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *N-abl* (N+**3**) * 7,5 мкл ПЦР-буфера-FRT (N+**3**) * 0,5 мкл полимеразы (TaqF)
7 = 5 ДНК-стандартов + 1 отрицательный контроль + 1 запас	5 = 3 ДНК-стандарта + 1 отрицательный контроль + 1 запас	3 = 1 положительный контроль + 1 отрицательный контроль + 1 запас	3 = 1 положительный контроль + 1 отрицательный контроль + 1 запас

4. Внести в каждую микропробирку для ПЦР, предназначенную для детекции транскрипта *M-bcr-abl* по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси *M-bcr-abl* и в каждую микропробирку для ПЦР, предназначенную для детекции гена-нормализатора *abl* по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси *N-abl*
5. Используя наконечник с аэрозольным барьером, добавить по **10 мкл образца кДНК** в пробирку с реакционной смесью *M-bcr-abl*, затем в пробирку с реакционной смесью *N-abl*.
6. Вне зависимости от количества исследуемых панелей (одна или две) необходимо поставить контрольные точки:



В случае исследования в ***количественном формате:***
необходимо поставить 5 контрольных образцов – калибраторов – для смеси *M-bcr-abl*. Для этого в 5 пробирок вносят 5 **ДНК-калибраторов (К1, К2, К3, К4, К5)** по **10 мкл** каждого
поставить 3 контрольных образца – калибратора – для смеси *N-abl*. Для этого в 3 пробирки вносят 3 **ДНК-калибратора ПКО (К1, К2, К3)** по **10 мкл** каждого.



В случае исследования в ***скрининговом (качественном) формате***:
необходимо поставить положительные контроли ПЦР. Для этого в одну пробирку со смесью *M-bcr-abl* и в одну пробирку

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

со смесью *N-abl* внести по **10 мкл ДНК-калибратора ПКО (К3).**

Б. Проведение амплификации (ПЦР).

1. Поместить пробирки в амплификатор.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицы 1, 2).

Таблица 1. Программа амплификации для «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия)

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Повторов*
Hold	95	15 мин	–	1
Cycling	95	15 с	–	45
	60	45 с	JOE/ Yellow	

– Задать измерение флуоресценции перед первым измерением (Perform calibration before first acquisition);

– Задать параметры калибровки для каналов JOE/Yellow в диапазоне 3FI-5FI.

Таблица 2. Программа амплификации для «iQ iCycler», «iQ5» («Bio-Rad», США); «Mx3000P», «Mx3005P» («Stratagene», США); «ABIPrism» 7700 («Applied Biosystem», США)

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Повторов*
1	95	15 мин	–	1
2	95	20 с	–	47
	60	55 с	HEX	

3. После окончания реакции приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к прибору. В пробирках с ПЦР-смесью-1-FRT *M-bcr-abl* регистрируют накопление продукта амплификации участка кДНК *M-bcr-abl* (ПКО), в пробирках с ПЦР-смесью-1-FRT *N-abl* – кДНК гена-нормализатора/внутреннего контроля (ВКО) *abl*.

Скрининговый (качественный) формат



Наличие характерных сигмообразных кривых накопления

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

флуоресцентного сигнала, пересекающих пороговую линию в пробирках с ПЦР-смесью-1-FRT *M-bcr-abl* свидетельствует о наличии мРНК транскрипта *bcr-abl* в образце – ***положительном результате исследования***.

Отсутствие положительного сигнала в ПЦР-смеси-1-FRT *M-bcr-abl* при валидном значении сигнала гена-нормализатора по смеси *N-abl* свидетельствует об ***отрицательном результате исследования***

Сигнал гена нормализатора считается валидным, если значение порогового цикла «Ct» (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) в ПЦР-смеси-1-FRT *N-abl* для данного образца меньше значения порогового цикла положительного контроля **(ДНК-калибратор ПКО (К3)).**

Результаты не подлежат учету если:

1. Сигнал гена-нормализатора является невалидным. Требуется перестановка данного образца, начиная с первого этапа анализа. В случае воспроизведения результата требуется перезабор материала
2. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля (ОКО) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

Количественный формат



На основании значений порогового цикла *«Ct»* (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов сначала для смеси *M-bcr-abl*, затем для смеси *N-abl* (заданные концентрации калибраторов идентичны для обеих смесей) происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий кДНК *bcr-abl* и *N-abl* в образце ПЦР *(см. руководство к соответствующему термоциклеру для ПЦР в реальном времени)*.

Полученные значения используют для расчета нормализованной концентрации РНК *M-bcr-abl* в

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

исследуемых и контрольных образцах по следующей схеме:

1. **рассчитать отношение для всех образцов**
   Число копий кДНК M-bcr-abl / число копий кДНК N-abl
2. **рассчитать среднее значение отношения концентраций *M-bcr-abl/abl* для двух повторов образца**

Результаты не подлежат учету если:

3. Значение *концентрации abl* (ген-нормализатор) менее 10000 копий / реакция: образец не валидный, требуется перестановка данного образца, начиная с первого этапа анализа. В случае воспроизведения результата требуется перезабор материала.
4. Отличие отношений концентрации *M-bcr-abl/N-abl* для двух повторов одного образца более чем четырехкратное. Т.е.
   (повтор-1 M-bcr-abl/N-abl) / (повтор-2 M-bcr-abl/N-abl) > 4 или < 0,25
   - За исключением образцов, для которых измеренное число копий *M-bcr-abl* менее 25.
5. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98: требуется перестановка всех проб, начиная с первого этапа анализа.
6. Рассчитанные концентрации ПКО-1/ПКО-2 не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше: требуется перестановка всех образцов, начиная с первого этапа анализа.
7. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля (ОКО) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

Дополнительную информацию можно узнать в следующих статьях:

a. Hughes T, Deininger M et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood. 2006 Jul 1;108(1):28-37;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

b. Gabert J, Beillard E et al Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection *in leukemia – a Europe Against Cancer program*. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318-57.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

Аналитическая чувствительность.

Оценка чувствительности набора реагентов проведена с использованием контрольных РНК-содержащих фаговых препаратов b3a2 (содержит 13 и 14 экзон *bcr* и 2 экзон *abl*) и b2a2 (содержит 13 экзон *bcr* и 2 экзон *abl*) с известной концентрацией. Экстракции РНК и постановке ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» подвергались 2-кратные разведения контрольных фаговых препаратов в присутствии 10^7 лейкоцитов на экстракцию.

Вариант мРНК	Чувствительность, копий мРНК на экстракцию	Чувствительность, копий мРНК на мл
b2a2	24 (19,5 – 28,5)	237 (189 – 282)
b3a2	48 (37,5 – 52,5)	474 (378 – 525)

Чувствительность, копий мРНК на экстракцию – количество частиц контрольного фага, которое необходимо добавить в экстракцию, для обеспечения положительного результата анализа в 100% случаев в присутствии 10^7 лейкоцитов. За величину чувствительности принято разведение контрольного фага, воспроизводимо определяемое как положительное в 12 повторах из 12. При соблюдении протокола набора реагентов данная величина отражает минимальное детектируемое количество копий мРНК в ½ лейкоцитарной массы забранного образца периферической крови или ½ образца костного мозга. Таким образом, при обработке 2,5 мл периферической крови чувствительность детекции составляет 20-30 копий мРНК/мл (по протоколу исследование проводится в 2х повторах, в одну экстракцию попадают лейкоциты из 1,25 мл цельной крови).

Чувствительность, копий мРНК на мл – пересчитанная величина чувствительности на 1 мл препарата (исходя из того, что в экстракцию попадает 0,1 мл образца). Данная величина чувствительности может быть актуальна, например, при исследовании цельной крови без отбора лейкоцитарной массы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

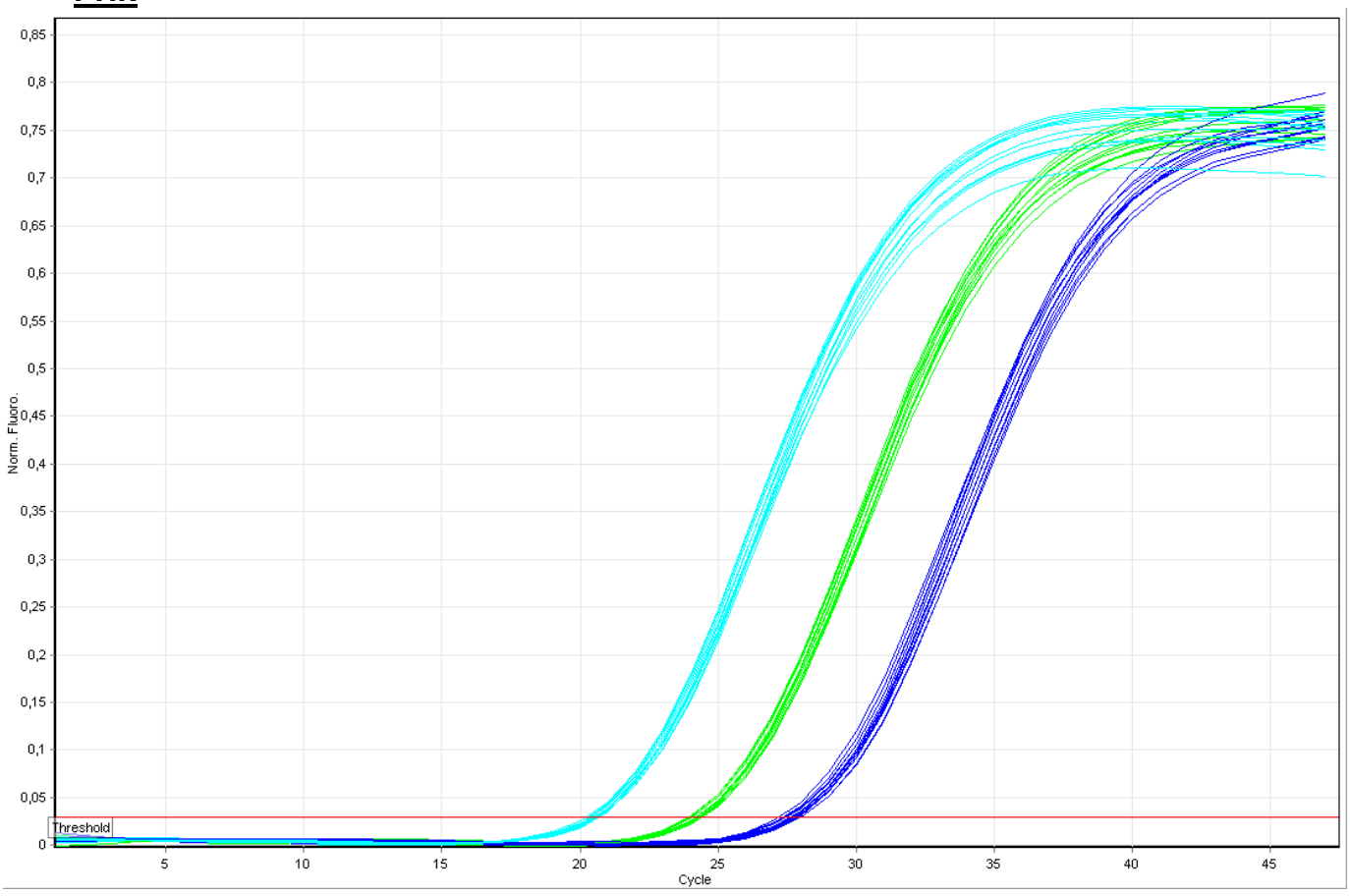
Аналитическая специфичность.

Оценена на 240 образцах периферической крови здоровых доноров. Во всех случаях выявлялся валидный сигнал внутреннего контроля (гена-нормализатора *abl*) и не выявлялся сигнал *bcr-abl*.

Воспроизводимость.

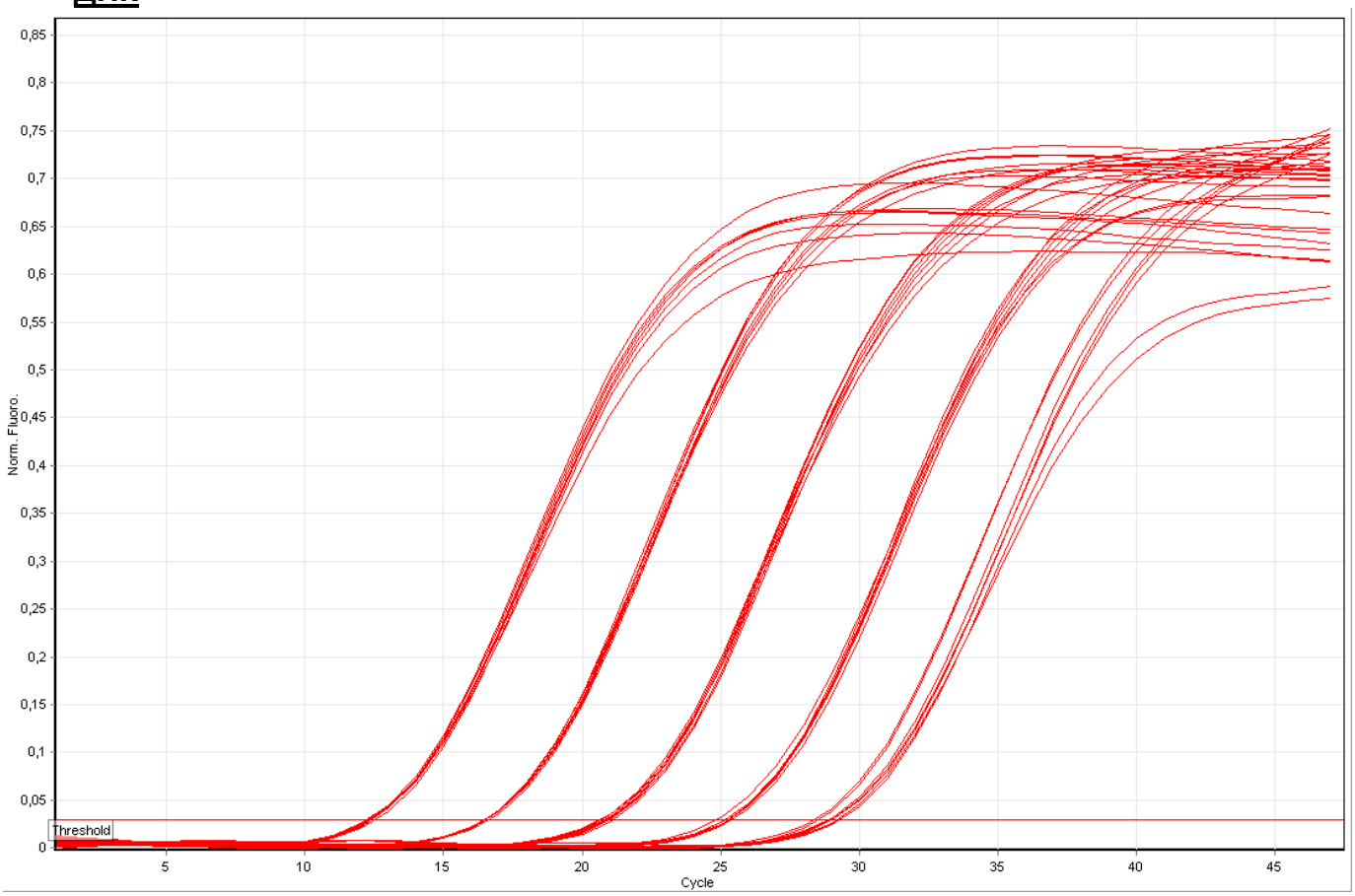
	Концентрация, копий/мл	n	Среднее Ct	Ст.откл Ct	CV%
РНК	$8.91 * 10^5$	12	20,51	0,15	0,73
	$8.91 * 10^4$	12	24,27	0,17	0,70
	$8.91 * 10^3$	12	27,72	0,24	0,87
ДНК	$1.82 * 10^7$	7	12,40	0,10	0,83
	$7.94 * 10^6$	7	16,58	0,05	0,30
	$4.57 * 10^5$	7	20,93	0,15	0,01
	$3.16 * 10^4$	7	25,26	0,18	0,71
	$3.02 * 10^3$	7	28,93	0,33	1,14

РНК



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ДНК



Оценка ошибки измерения концентрации мРНК при использовании в качестве стандартов ДНК-плазмид, а также ошибки измерения концентрации мРНК b3a2 при использовании b2a2-стандартов.

Ввиду того, что эффективности амплификации плазмидной ДНК и кДНК после реакции реверсии несколько отличаются, а также отличаются эффективности амплификации фрагментов b2a2 и b3a2 (ввиду отличий в длине), может наблюдаться небольшое искажение величины измеряемой концентрации.

Для оценки величины ошибки измерения концентрации были определены эффективности ПЦР на препаратах мРНК и кДНК вариантов b3a2 и b2a2.

Мишень	Эффективность реакции	Ожидаемая ошибка измерения концентрации для точки порядка $5*10^3$ копий/мл, разы (разность lg)
ДНК b2a2	0,930±0,020	1
РНК b2a2	0,910±0,010	1,104 (0,043 lg)
РНК b3a2	0,855±0,025	1,901 (0,279 lg)

За единицу принята ошибка измерения концентрации ДНК b2a2, так как данный вариант используется в качестве стандартов в наборе реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Точность определения концентрации РНК *bcr-abl* в экспериментальных условиях по ДНК стандартам.

Концентрация РНК-фага, определенная независимым методом		Тип фага (повторов)	Результат измерения концентрации в данном наборе реагентов относительно ДНК-стандартов			Ошибка, разность lg
частиц/мл	lg частиц/мл		Среднее, lg частиц/мл	Ст.откл	CV%	
$1.77 * 10^6$	6.25	b2a2 (5)	6.37	0,05	0.77	-0.12
$2.53 * 10^4$	4.40	b2a2 (5)	4.46	0.05	1.22	-0.06
$1,58 * 10^6$	6.20	b3a2 (5)	6.09	0.10	1.57	0.11
$2,79 * 10^4$	4.45	b3a2 (5)	4.09	0.09	2.19	0.36

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 1 год.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 сут. При получении разукомплектовать.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-золь-D» (кроме ацетата натрия, РНК-элюента *bcr-abl* и тРНК), ПЦР-буфер-FRT, ДНК-буфер и ДНК-калибраторы (из комплекта реагентов «АмплиСенс») хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L», «АмплиСенс» (кроме ПЦР-буфера-FRT, ДНК-буфера и ДНК-калибраторов), ацетат натрия, РНК-элюент *bcr-abl* и тРНК (из комплекта реагентов «РИБО-золь-D») хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять в по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru[3].

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 и эксплуатации 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.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Главный врач
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России — С.А. Богдан

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru