

«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

« 20 » июля 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления аллели 5701 локуса В
главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*5701)
в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® Геноскрин HLA В*5701-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	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	10
ВЗЯТИЕ ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ...	13
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	14
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	15
СОСТАВ.....	17
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	19
А. Подготовка проб для амплификации	19
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	21
В. Анализ и интерпретация результатов	22
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	26
ПРИЛОЖЕНИЕ А	27

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномный эквивалент (геном)
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
К–	– отрицательный контроль ПЦР
МУ	– методические указания
К+	– положительный контроль ПЦР
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОТ	– обратная транскрипция
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СанПиН	– санитарные правила и нормы
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
Ct	– cycle threshold (пороговый цикл)
HLA	– Human Leukocyte Antigens (человеческие лейкоцитарные антигены)
FL	– ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Геноскрин HLA В*5701-FL» предназначен для определения аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*5701) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Положительный результат тестирования будет получен в случае наличия аллели HLA В*5701 как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии. Возможность дискриминации гомо- и гетерозиготного состояния при использовании данного набора реагентов отсутствует. Необходимо учитывать, что положительный результат тестирования при использовании данного набора реагентов может быть получен при наличии родственных редко встречаемых аллелей: В*5514, В*5706, В*5708, В*5710, В*5713-В*5716, В*5718, В*5719 и В*5814 (менее 0,1 %).

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подтвержденной ВИЧ-инфекцией, с целью правильного назначения соответствующей схемы терапии.

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

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции тотальной ДНК человека из образцов исследуемого материала и одновременной амплификации участка локуса В главного комплекса гистосовместимости 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, транспортировки, хранения и обработки клинического материала.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-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».

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух ДНК-мишеней. Результаты

амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК участка β -глобинового гена (BKO Glob)	ДНК аллели 5701 локуса В
Область амплификации	β -глобиновый ген	аллель 5701 локуса В

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего предобработку клинического материала (цельная кровь), экстракцию ДНК и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма 2 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать реагенты для предобработки и комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 100 тестов, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), клеток/мл
Свежая цельная кровь, мазок из ротоглотки	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и

хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК следующих микроорганизмов/вирусов в концентрации не более 1×10^7 копий/мл (ГЭ/мл) и не менее 1×10^3 копий/мл (ГЭ/мл): аденовирус типы 2, 3, 7, цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барр, вирус ветряной оспы, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус иммунодефицита человека первого типа, вирус герпеса человека типы 6, 8, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус краснухи, папилломавирус человека типы 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 51, 52, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*.

При тестировании образцов РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов неспецифичных реакций выявлено не было.

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проводилась с использованием панели из 13 генно-инженерных конструкторов ДНК, содержащих различные комбинации аллелей HLA-B человека, предоставленной Институтом иммунологии и инфекционных заболеваний, Университета Мердок, Австралия (Institute for Immunology and Infectious Diseases, Murdoch University).

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой стандартный образец предприятия, содержащий ДНК HLA В*5701 с концентрацией $1,3 \times 10^6$ копий/мл, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

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 различных приборах и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	40	100
Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов была использована зашифрованная панель из 384 образцов ДНК, предоставленная Институтом иммунологии и инфекционных заболеваний, Университета Мердок, Австралия. 200 образцов являлись замороженными образцами клеток цельной крови человека, и 184 образца – замороженными мазками из ротоглотки.

В качестве референтного метода при исследовании панели образцов применялась ПЦР со специфическими праймерами (SSP, sequence-specific primers), дальнейшим секвенированием (SBT, sequence based typing) и определением генотипа аллели HLA B*5701.

33 образца исследуемой панели не содержали ДНК человека при использовании как референтного метода, так и исследуемого набора реагентов. Таким образом, общее количество истинно положительных (содержащих аллель HLA B*5701) и истинно отрицательных образцов (не содержащих аллель HLA B*5701) составило 351.

Результаты представлены в табл. 4, 5.

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® Геноскрин HLA B*5701-FL» в сравнении с референтным методом

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® Геноскрин HLA B*5701-FL»		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Цельная кровь, мазки из ротоглотки	Всего исследовано 351 образец	положительных	34	0
		отрицательных	0	317

Таблица 5

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® Геноскрин HLA B*5701-FL»

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Цельная кровь, мазки из ротоглотки	100 (89,72-100) %	100 (98,84-100) %

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.

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

- 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 форма 2 набора реагентов безопасна.

При использовании по назначению формы 1 набора реагентов 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,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

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

Сведения о безопасности набора реагентов и Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, 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. Вакуумная система забора крови типа Vacuette.
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл.
3. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011).
4. Зонд-тампон стерильный в индивидуальной упаковке (полистирол с тампоном из вискозы).

Предварительная подготовка исследуемого материала

При работе с формой 1, включающей комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT:

5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 и/или 2,0 мл.
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
 8. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
 9. Вортекс.
 10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
 11. Автоматические дозаторы переменного объема.
 12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 13. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При работе с формой 2:

15. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (РУ № ФСР 2010/09505) для предобработки цельной периферической и пуповинной крови.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

При работе с формой 1, включающей комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «Гемолитик» (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT:

16. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
17. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл.
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл.
20. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
21. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А.
22. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс. g.
23. Вортекс.
24. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
25. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

26. Автоматические дозаторы переменного объема.
27. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
28. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
29. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
30. Одноразовый флакон на 10-20 мл.

При работе с формой 2:

31. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
32. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

33. 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 круглой 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.
34. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл.
35. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
36. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
37. Вортекс.
38. Автоматические дозаторы переменного объема.
39. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»)),

США), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

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

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

42. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь,
- мазки из ротоглотки.

Свежая цельная кровь

Взятие крови следует проводить в количестве 2 мл в одноразовую стерильную пробирку с раствором ЭДТА (K₂ЭДТА или K₃ЭДТА) в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке с антикоагулянтом тщательно перемешалась.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения предобработки:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной венозной крови!

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 500 мкл 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 её 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 2 недель;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки не требуют предварительной подготовки.

Образцы цельной крови требуют предварительной подготовки.

Отобрать **100 мкл цельной крови** в одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Добавить **1 мл гемолитика**. Закрыть пробирки, аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 мин при комнатной температуре, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе; оставить на 5 мин. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс. об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать, не задевая осадка, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции 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) или заморожен при температуре:

- от минус 24 до минус 16 °С – на 2 недели;
- не выше минус 68 °С - на длительное время.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной венозной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной венозной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов в качестве эндогенного внутреннего контроля используется ДНК β -глобинового гена (ВКО Glob). По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК β -глобинового гена, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

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. 6).

Были протестированы образцы цельной крови и мазки со слизистой оболочки ротоглотки без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 6.

Были протестированы образцы цельной крови и мазки со слизистой оболочки ротоглотки пациентов с подтвержденным наличием аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA B*5701). Параллельно исследовали образцы биологического материала, полученные от лиц с подтвержденным отсутствием аллели HLA B*5701, содержащие каждое эндогенное потенциально интерферирующее вещество и без добавления данных веществ (отрицательный контрольный образец).

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент (протестированная концентрация в образце)	Наличие интерференции
Цельная кровь	Эндогенные вещества	Гемоглобин (5 г/л)	Не обнаружено
		Триглицериды (37 ммоль/л)	Не обнаружено
		Билирубин (210 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Холестерин (77,6 ммоль/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	К ₂ ЭДТА (2 мг/мл) ⁴	Не обнаружено
		К ₃ ЭДТА (2 мг/мл) ⁶	Не обнаружено
		Лития гепарин (12 МЕ/мл) ⁶	<u>Обнаружено</u>
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	Эндогенные вещества	Муцин (6 мг/мл)	Не обнаружено
		Муцин (9 мг/мл)	Не обнаружено
		Гемоглобин (0,21 г/мл)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата 2,5%	Не обнаружено

⁴ 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.

СОСТАВ

СОСТАВ

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ⁵	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

К комплекту реагентов «РИБО-преп» вариант 100 прилагается реагент:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

Комплект реагентов входит в состав формы 1.

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации участка ДНК аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA В*5701) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT HLA	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК HLA В*5701 и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	4 пробирки

Комплект реагентов входит в состав форм 1, 2.

⁵ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

СОСТАВ

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).

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 используется комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 в соответствии с **Приложением А**.

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 - 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT HLA, 5,0 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL и 0,5 мкл Полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.6) плюс запас на несколько реакций (см. табл. 7).

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

2. Разморозить все реагенты ПЦР-комплекта, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FRT HLA, ОТ-ПЦР-смеси-2-FL и Полимеразы (TaqF)**. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Приготовленная смесь не хранится.

Таблица 7

Схема приготовления реакционных смесей

			Объем реагентов на указанное количество исследуемых точек, мкл		
Объем реагента на одну реакцию, мкл			10,0	5,0	0,5
Число исследуемых образцов	Число экстрагируемых образцов ⁶	Число проб в ПЦР ⁷	ПЦР-смесь-1-FRT HLA	ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Полимераза (TaqF)
3	4	6	60	30	3,0
4	5	7	70	35	3,5
5	6	8	80	40	4,0
6	7	9	90	45	4,5
7	8	10	100	50	5,0
8	9	11	110	55	5,5
9	10	12	120	60	6,0
10	11	13	130	65	6,5
11	12 ⁸	14	140	70	7,0

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных проб (см. табл. 7).
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.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ПКО ДНК HLA В*5701 и ДНК человека**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

⁶ Число исследуемых образцов + 1 контроль этапа экстракции ДНК (N+1, N - количество исследуемых образцов).

⁷ Число исследуемых образцов + 1 контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля ПЦР (N+3, N - количество исследуемых образцов).

⁸ Панель из 12 пробирок для экстракции.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9).

Таблица 8

Программа амплификации для приборов роторного типа⁹

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	40 с	FAM/Green, JOE/Yellow	

Таблица 9

Программа амплификации для приборов планшетного типа¹⁰

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	50 с	FAM, JOE/HEX	

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁹ Например, RotorGene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия).

¹⁰ Например, iCycler iQ, iQ5 (BioRad, США), «ДТ-96»/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

В. Анализ и интерпретация результатов

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

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

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК участка β -глобинового гена (BKO Glob)	ДНК аллели 5701 локуса В

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 11:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	JOE	
<u>определено</u> меньше или равно граничному	<u>определено</u> и не превышает более чем на 5 циклов значение C_t по каналу FAM	Обнаружена аллель 5701 локуса В
<u>определено</u> меньше или равно граничному	отсутствует или превышает более чем на 5 циклов значение C_t по каналу FAM	Не обнаружена аллель 5701 локуса В
отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

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

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	отсутствует или больше граничного	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. таблицу 12) отсутствует. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для исследуемого образца не определено значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для исследуемого образца значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора FAM больше граничного. В этом случае образец считается **сомнительным**. Необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофора JOE и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. «РИБО-преп» вариант 100 и «Гемолитик» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT HLA хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT HLA хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик реагента 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 реагента, 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



Содержимого достаточно
для проведения n тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Дата изменения



Предел температуры



Обратитесь к инструкции
по применению



Изготовитель



Дата изготовления



Осторожно!



Не допускать воздействия
солнечного света

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» вариант 100

ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного комплекта реагентов имеет резкий запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Прогреть **раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

При использовании осадка лейкоцитов, полученного после подготовки образцов цельной крови:

2. В каждую пробирку с осадком лейкоцитов внести по **300 мкл раствора для лизиса**.
3. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **300 мкл раствора для лизиса**.

При использовании мазков из ротоглотки:

4. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Промаркировать пробирки.
5. В пробирки внести по **300 мкл раствора для лизиса**.
6. В пробирки внести по **100 мкл исследуемых образцов**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.

Для всех видов исследуемого материала:

7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) с **раствором для лизиса** внести **100 мкл ОКО**.
8. Закрывать крышки и перемешать на вортексе. Осадить капли жидкости с крышек пробирок кратковременным центрифугированием.
9. Содержимое пробирок прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
11. Центрифугировать пробирки на центрифуге в течение **5 мин при 12 тыс. g** (например, 13,4 тыс. об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf).

12. Осторожно, не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
13. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
14. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **12 тыс. g** в течение **1-2 мин.**
15. Осторожно, не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
16. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
17. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **12 тыс. g** в течение **2 мин.**
18. Осторожно, не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
19. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат при температуре **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка.
20. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Закрыть пробирки и перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
21. Центрифугировать пробирки на центрифуге при **12 тыс. g** в течение **1 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.
ДНК-пробы готовы к постановке ПЦР.
ДНК-пробы могут храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C. Допускается хранение препарата при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение года.