

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

«26» Сентября 2017 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»

ОГЛАВЛЕНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ	3
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	5
СОСТАВ.....	5
ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.	13
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.	13
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР- АМПЛИФИКАЦИИ.	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	19
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	21

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® Геноскрин HLA В*5701-FL» предназначен 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». Положительный результат тестирования будет получен в случае наличия аллели HLA В*5701 как в гомо- так и в гетерозиготном состоянии. Возможности дискриминации гомо- и гетерозиготного состояния при использовании данного набора реагентов не существует. 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 %).

Принцип тестирования основан на выделении тотальной ДНК человека, проведении амплификации участка локуса В главного комплекса гистосовместимости человека и участка гена β-глобина человека методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для выявления аллели HLA В*5701 используются аллель специфические олигонуклеотиды, таким образом, положительный результат реакции амплификации (накопление флуоресцентного сигнала) свидетельствует о наличии HLA В*5701 без необходимости дальнейшего анализа пробы. Амплификация участка гена β-глобина человека используется в качестве эндогенного внутреннего контроля, отражающего качество взятия, транспортировки, хранения и обработки клинического материала.

Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и ПЦР-амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации 2 предназначена для проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект

реагентов «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) для выделения ДНК из клинического материала производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 10^3 клеток/мл.

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, Гемолитик (1 флакон), «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **2** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «РИБО-преп» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная бесцветная жидкость ¹	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

В составе формы **1** к комплекту реагентов «РИБО-преп» прилагается:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контроли.

¹При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT HLA	Прозрачная бесцветная жидкость	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
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,07	2 пробирки
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 рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Для исследования используется следующий клинический материал:

– свежая цельная кровь

Взятие крови проводится в количестве 2 мл в одноразовую пробирку с 0,2 мл 3 % раствора ЭДТА. Закрытую пробирку с цельной кровью переворачивают 3-4 раза для равномерного перемешивания с ЭДТА. Допускается хранение образца цельной крови при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч. При выделении ДНК из крови проводится обработка Гемолитиком.

– мазок из ротоглотки

Мазок берут сухим стерильным зондом с ватным тампоном. После получения материала рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку вместимостью 1,5-2,0 мл с крышкой с 0,5 мл «Транспортной среды для хранения и

транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-09). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают. Допускается хранение образца при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 сут.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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 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, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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 фильтром³. 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.
- 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 клиничко-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

³ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «РИБО-преп»).

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «РИБО-преп»).

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

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- 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 выделения ДНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации, а также гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. Амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или амплификатор планшетного типа, например, «iQ5» («BioRad», США), или эквивалентные.
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок.

Для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, «iQ5»). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США).

4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром (например, «Ахуген», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки клинического материала).

Объем исследуемого материала для выделения ДНК - 0,1 мл.

Примечание – Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

A1. Подготовка клинического материала при выделении ДНК из крови.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл для обработки проб и контролей и промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по **1,0 мл гемолитика** и по **0,1 мл** исследуемых образцов цельной крови соответственно маркировке. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин; затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе; оставить на 5 мин.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин.
4. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Полученный осадок лейкоцитов может быть немедленно лизирован или заморожен при температуре не выше минус 16 °С на 2 нед, а при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

A2. Подготовка клинического материала при выделении ДНК из мазков из ротоглотки.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл для обработки проб и контролей и промаркировать. Пробирки с мазками из ротоглотки в «Транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков» тщательно перемешать, а затем коротко осадить на вортексе.
2. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести по 100 мкл исследуемых образцов соответственно маркировке.

Б. Лизис клинического материала.

1. Промаркировать одну дополнительную пробирку отрицательного контроля (ОК) и внести в нее **100 мкл ОКО**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**.
2. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
3. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
4. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
5. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
6. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
7. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
8. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
10. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.
12. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
13. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 90 мкл.

14. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение недели при температуре от 2 до 8 °С, и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения полимеразной цепной реакции).

Объем ДНК-пробы - 10 мкл; общий объем реакции - 25 мкл.

Порядок работы

А. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР:

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с учетом количества исследуемых, контрольных образцов. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
2. Приготовить реакционную смесь. Для этого смешать в отдельной стерильной пробирке реагенты из расчета на одну пробу:
 - **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT HLA;**
 - **5,0 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL;**
 - **0,5 мкл Полимеразы (TaqF).**

Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну точку больше (см. табл. 1).

Таблица 1.

Количество исследуемых образцов	Объем реактивов на указанное количество исследуемых точек с запасом на один образец (мкл)		
	ПЦР-смесь-1-FRT HLA	ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Полимераза (TaqF)
6	70	35	3,5
11	120	60	6,0
18	190	95	9,5

3. Смесь тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в микропробирки по **15 мкл готовой реакционной смеси**. Остатки реакционной смеси выбросить.

Б. Проведение амплификации:

1. В пробирки с реакционной смесью, используя наконечники с фильтрами, **внести по 10 мкл ДНК**, выделенной из

клинических или контрольных проб этапа выделения ДНК. Осторожно перемешать пипетированием.

2. Для каждой панели необходимо поставить 2 контрольных образца:
 - а) **отрицательный контроль (К-)** - вместо ДНК-пробы внести в подготовленную пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**;
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК HLA В*5701 и ДНК человека**.
3. Установить пробирки в реакционный модуль.
4. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации для приборов роторного типа⁴

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	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	

Программа амплификации для приборов планшетного типа⁵

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	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, HEX/JOE	

5. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам - анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для

⁴ Например, RotorGene 3000 и RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)

⁵ Например, iQiCycler, iQ5 (BioRad, США)

проведения ПЦР в режиме «реального времени». По одному из каналов (JOE/HEX/Yellow) регистрируют накопление продукта амплификации участка ДНК HLA B*5701 (специфика), а по другому (FAM/Green) – ДНК – β -глобинового гена человека (внутренний контроль). Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «C_t» в соответствующей графе в таблице результатов.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла (C_t или C_p) для данного канала менее указанного во вкладыше к набору реагентов, *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения C_t или C_p), *сомнительным* во всех других случаях.

*(см. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в реальном времени и Методические Рекомендации по применению набора реагентов для выявления аллели 5701 локуса В главного комплекса гистосовместимости человека (HLA B*5701) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс Геноскрин HLA B*5701-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2016).*

Учет результатов в контрольных образцах.

1. Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов «ОК», «К+» и «К-» (см. табл. 2).

Таблица 2.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результат амплификации по каналу	
		Green/FAM	JOE/HEX/Yellow
OK	Выделение ДНК	отрицательный	отрицательный
К-	ПЦР	отрицательный	отрицательный
К+	ПЦР	положительный	положительный

Учет результатов в исследуемых клинических образцах.

- Образец считается положительным**, если на канале JOE/HEX/Yellow получен положительный результат и значение Ct не более чем на 5 циклов превышает значение Ct на канале FAM/Green.
- Образец считается отрицательным**, если на канале JOE/HEX/Yellow получен отрицательный результат или значение Ct превышает значение Ct на канале FAM более чем на 5 циклов.

Возможные ошибки.

- В пробе с положительным контролем ПЦР отсутствует положительный сигнал по любому из каналов. Возможная причина: ошибки, допущенные на этапе постановки ПЦР. Необходимо повторное проведение анализа, начиная с этапа ПЦР.
- В исследуемом образце не определено значение порогового цикла Ct по каналу ВКО. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
- В исследуемом образце значение порогового цикла Ct по каналу ВКО **более значения, указанного во вкладыше**. В этом случае образец считается **сомнительным**. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирования ПЦР. Требуется повторное проведение анализа, начиная с этапа выделения.
- В отрицательном контроле (выделения или ПЦР) детектируется положительный сигнал по любому из каналов, что свидетельствует о контаминации реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем

пробам считаются недействительными. Необходимо повторно провести анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разуконплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп» и Гемолитик хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре не выше минус 16 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель 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 комплекта реагентов «АмплиСенс® Геноскрин HLA В*5701-FL» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁶.

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

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Федерального научно-методического
центра по профилактике и борьбе со СПИД



В.В. Покровский

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Дата изменения



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению



Изготовитель



Дата изготовления



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению