УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 15.05.2012 № 2356-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«15» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения
ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *CMV*-скрин/монитор-FL»

АмплиСенс®

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 9
ФОРМАТ FRT 11
СОСТАВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 12
А. Подготовка пробирок для амплификации 13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 24

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	– экзогенный внутренний контрольный образец
ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
К–	– отрицательный контроль ПЦР
К+	– положительный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
CMV	– цитомегаловирус человека
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *CMV*-скрин/монитор-FL»** предназначен для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) путем амплификации специфического фрагмента ДНК вируса методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смывов и мазков из ротоглотки, мочи, бронхоальвеолярного лаважа, цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *CMV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из плазмы периферической крови,

[1] В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС

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

амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смывов и мазков из ротоглотки и бронхоальвеолярного лаважа проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *CMV* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК, амплификацию и количественное определение ДНК

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

цитомегаловируса человека (*CMV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Линейный диапазон измерения набора реагентов: **500 – 10 000 000 копий/мл**. Если результат больше, чем 10.000.000 копий/мл, то он выдается как ***результат более 10 000 000 копий ДНК CMV/мл***. Если результат меньше чем, 500 копий/мл, то он выдается как ***результат менее 500 копий ДНК CMV/мл***.

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность
Плазма периферической крови, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), слюна, смывы и мазки из ротоглотки, моча, бронхоальвеолярный лаваж	РИБО-преп	400 копий/мл
Цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов	РИБО-преп	5 копий ДНК *CMV* на 10^5 клеток

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК цитомегаловируса человека. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании референсного штамма AD 169, а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в

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

отношении ДНК других вирусов (Эпштейн-Барр вирус человека, вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус герпеса 6 и 8 типа, вирус Варицелла-Зостер, *Parvovirus* B19 и др.), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и др.) и ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, 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 Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

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

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 2.
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
5. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции

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

нуклеиновых кислот.

6. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS® easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axygen, США) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации. (ЗОНА 2):

8. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
9. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
10. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
11. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
12. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми прибором).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.
16. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР

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

объемом 0,2 мл или 0,1 мл:

а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) - при использовании прибора планшетного типа;

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служит цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов, слюна, смывы и мазки из ротоглотки, плазма периферической крови, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), моча, бронхоальвеолярный лаваж.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- <u>цельная периферическая и пуповинная кровь</u>

Перед экстракцией необходимо провести предобработку крови: в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 минут, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком.

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

Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

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

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

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета [2]	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *CMV* скрин/монитор		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
РНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**KSG1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
РНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

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

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *CMV*-скрин/монитор-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца - ВКО STI-87 (в каждый образец добавляется 10 мкл ВКО STI-87). В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (30 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

   ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

   В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и **15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).**
2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в <u>качественном</u> формате необходимо проводить постановку <u>двух</u> контрольных точек этапа амплификации ПЦР**: положительный **(KSG2)** и отрицательный контроль ПЦР **(РНК-буфер)**. **А для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в <u>количественном</u> формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации ПЦР: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два повтора и** отрицательный контроль ПЦР **(РНК-буфер)**. Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.
3. В отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FL *CMV* скрин/монитор и заранее подготовленную смесь ПЦР-**

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

смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:

– **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *CMV* скрин/монтор,**

– **5 мкл** смеси **ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).**

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в Приложении 1.

ВНИМАНИЕ! При одновременном исследовании 60 образцов возможна упрощенная схема приготовления смеси: все содержимое одной пробирки с ПЦР-смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *CMV* скрин/монитор.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, полученной в результате экстракции из клинических или контрольных образцов.
6. Для проведения качественного анализа:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** –внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**;
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл KSG2.**

   Для проведения количественного анализа:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** –внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**;
   б) **калибраторы KSG1 и KSG2** – внести в две пробирки по **10 мкл** калибратора **KSG1** и в две пробирки по **10 мкл** калибратора **KSG2**.

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

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 1а и 1б).

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

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа[3]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
Hold/ Удерж. темп-ры	**95**	**15 мин**	–	**1**
Cycling 1/ Циклирование	**95**	**5 с**	–	**5**
	60	**20 с**	–	
	72	**15 с**	–	
Cycling 2/ Циклирование	**95**	**5 с**	–	**40**
	60	**20 с**	FAM, JOE, ROX	
	72	**15 с**	–	

Таблица 1б

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа[4]

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

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

По каналу – **FAM** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК *β-глобинового гена* (ВКО Glob)**, по каналу **JOE** – **ДНК *CMV* (ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека),** по

[3] Например, Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

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

каналу **ROX** – накопление продукта амплификации участка **ДНК ВКО STI-87 (ВКО STI-87).**

При экстракции тотальной ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) учитываются результаты по двум каналам: по каналу – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК *β-глобинового гена* (ВКО Glob)**, по каналу **JOE** – **ДНК *CMV* (ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека).**

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора) мочи, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом учитываются результаты по двум каналам: по каналу **JOE** –**ДНК *CMV* (ПКО ДНК *CMV* и ДНК человека),** по каналу **ROX** – накопление продукта амплификации участка **ДНК ВКО STI-87 (ВКО STI-87).**

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов (см. приложения к инструкции для используемого прибора).

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в «реальном времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.

Результат амплификации по каналу считается *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct*).

При экстракции тотальной ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК *CMV* обнаружена***,* если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct,* не превышающее порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в методических

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

рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *CMV*-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК *CMV* не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК ВКО Glob более **2000** копий/реакция.

- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE**, и по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение *Ct* более указанного во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК ВКО Glob менее **2000** копий/реакция**.** В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

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

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

Для количественного теста в случае, если ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакция количественный положительный или отрицательный **результат считается недостоверным**.

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

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+ (см. табл. 2). Для количественного теста результаты по ПК должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 2

Результаты для контролей ПЦР-исследования при экстракции тотальной ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов)

Контроль	Контроли-руемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM		JOE	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК *CMV* на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) провести по формуле:

$$\lg\left\{\frac{число_копий_ДНК_CMV_в_ПЦР-пробе}{число_копий_ДНК_Glob_в_ПЦР-пробе}\ 2*10^5\right\}= \lg\{\text{копий ДНК } CMV/10^5 \text{ клеток}\}$$

Для выражения относительной концентрации ДНК *CMV* в копиях на стандартное количество клеток (например, на 10^5) используется коэффициент пересчета:

10^5 клеток = $2*10^5$ геномов человека

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

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости или спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК *CMV* обнаружена***,*** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct,* не превышающее порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (*CMV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *CMV*-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК *CMV* не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX** значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше.

- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE**, и по каналу для флуорофора **ROX** значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает значение, указанное во вкладыше. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

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

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

повторах значений – результат считается **сомнительным**.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+ (см. табл. 3). Для количественного теста результаты по ПК должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 3

Результаты для контролей ПЦР-исследования при экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом

Контроль	Контроли-руемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		JOE		ROX	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации ДНК *CMV* на мл образца для плазмы периферической крови, амниотической и спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа проводится по формуле:

КП ДНК *CMV* = [К ДНК *CMV* / К STI-87] х коэффициент ВКО (копий/мл)

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

К ДНК *CMV* - количество копий ДНК *CMV* в пробе ДНК;
К$_{STI-87}$ - количество копий ДНК STI-87 в пробе ДНК;
коэффициент ВКО – соответствует числу копий ВКО ДНК STI-87 в пробе ДНК и указан во вкладыше к каждой серии наборов реагентов и специфичен для каждого лота.

К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны концентрации ПКО *CMV* и ДНК человека, ВКО STI-87 и ДНК-калибраторов, необходимые для расчета концентраций исследуемых проб и оценки достоверности полученных результатов, а также значения порогового цикла *Ct.*

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *CMV* скрин/монитор, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *CMV* скрин/монитор хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *CMV*-скрин/монитор-FL»** направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail:products@pcr.ru)[5].

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1» Е.Л.Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

[5] 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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

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

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии		Максимальное число тестов
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Производитель		Дата изготовления

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