УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 15.05.2012 № 2353-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 вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *EBV*-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» 13
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 23
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 25

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+	– положительный контроль ПЦР
К–	– отрицательный контроль ПЦР
ОК	– отрицательный контрол экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПКО	– положительный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
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
EBV	– вирус Эпштейна-Барр
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *EBV*-скрин/монитор-FL»** предназначен для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) 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, бронхоальвеолярного лаважа, цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов).

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *EBV* 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.

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

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

Экстракция ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смывов и мазков из ротоглотки и бронхоальвеолярный 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 (экстракция ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *EBV* 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.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК, амплификацию и количественное определение ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) 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 EBV /мл***. Если результат меньше чем, 500 копий/мл, то он выдается как ***результат менее 500 копий ДНК EBV /мл***.

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*). Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании панели QCMD, а также при исследовании клинического материала с последующим

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

подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других вирусов (цитомегаловирус 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 Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

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

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с 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.

- 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 объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «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

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

выделения ДНК.

5. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции 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 на 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 зависимости от используемого прибора).
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

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

Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР 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), бронхоальвеолярный лаваж.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- цельная периферическая и пуповинная кровь

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 мин, 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

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

наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к набору 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 вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *EBV* 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 *EBV* 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 вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *EBV*-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 *EBV* и ДНК человека**.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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)**.

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

Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FL *EBV* скрин/монитор и заранее подготовленную смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).** Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
   – **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *EBV* скрин/монитор,**
   – **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 *EBV* 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, выделенной 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.

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

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

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/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

Таблица 1б

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

Цикл	*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, HEX/ JOE, ROX	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного

[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

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/Green** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК *β-глобинового гена* (ВКО Glob)**, по каналу **JOE/HEX/Yellow** – **ДНК *EBV* (ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека),** по каналу **ROX/Orange** – 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/Green** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК *β-глобинового гена* (ВКО Glob)**, по каналу **JOE/HEX/Yellow** – **ДНК *EBV* (ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека).**

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора), бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом учитываются результаты по двум каналам: по каналу **JOE/HEX/Yellow** – **ДНК *EBV* (ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека),** по каналу **ROX/Orange** – 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 режиме «реального 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*).

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

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

- **ДНК *EBV* обнаружена***,* если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** 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 вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *EBV*-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *EBV* не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM/Green** 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/HEX/Yellow**, и по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение *Ct* более указанного во вкладыше, а для количественного теста - количество геномов человека на реакцию не превышает **2000** копий/реакция. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу JOE/Yellow/HEX превышают порог, указанный во вкладыше,

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

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/Green** 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**.

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

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

Таблица 2

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

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green		JOE/HEX/Yellow	
		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 *EBV* на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) провести по формуле:

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

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

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

<u>При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости или спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смывов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним</u>

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

<u>контрольным образцом</u> результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК *EBV* обнаружена***,* если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** определено значение порогового цикла *Ct,* не превышающее значение порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *EBV*-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *EBV* не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX/Orange** 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/HEX/Yellow**, и по каналу для флуорофора **ROX/Orange** 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/Yellow/HEX 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 всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+ (см. табл. 3). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 3

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

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		JOE/HEX/Yellow		ROX/Orange	
		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 *EBV* на мл образца для плазмы периферической крови, амниотической и спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смывов и мазков из ротоглотки,

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

бронхоальвеолярного лаважа проводится по формуле:

КП ДНК *EBV* = [КДНК *EBV* / КSTI-87] х коэффициент ВКО (копий/мл)

К ДНК *EBV* - количество копий ДНК *EBV* в пробе ДНК;
КSTI-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 *EBV* 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 *EBV* скрин/монитор, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *EBV* скрин/монитор хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *EBV*-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» Управления делами Президента Российской Федерации Е.Л.Никонов

[5] Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» можно 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 *EBV* 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 *EBV* и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК *EBV.*

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
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

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