

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО НПО «Литех»

Н.С.Прозоровский

14.06.2008г.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 200 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для обнаружения
ДНК вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus)
методом полимеразной цепной реакции

ЭБАРПОЛ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ЭБАРПОЛ» предназначен для качественного обнаружения ДНК вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus) в биологическом материале человека (слюна) методом полимеразной цепной реакции.

Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2. Набор реагентов «ЭБАРПОЛ» может быть использован в клинической диагностике носительства вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus), а также для оценки эффективности проводимой терапии.

1.3. Набор имеет форматы: Базовый и Флуоропол, различающиеся комплектацией (числом реакционных доз - постановочных реакций, степенью готовности компонентов к постановке амплификации) и способом детекции амплифицированного фрагмента ДНК (электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле или флуоресцентная детекция на адаптированных для этого приборах).

Формат Базовый. Набор рассчитан на проведение анализа 50, или 100, или 200 клинических образцов, 5, или 10, или 20 проб положительного контрольного образца ДНК вируса Эпштейн-Барра и 5, или 10, или 20 проб отрицательного контрольного образца (всего 60, или 120, или 240 определений) и последующей детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

Формат Флуоропол. Набор рассчитан на проведение анализа 100 клинических образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК вируса Эпштейн-Барра, 10 проб отрицательного контрольного образца, 10 проб фоновых образцов (всего 130 определений) и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «лю конечной точке» реакции или «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. Набор реагентов «ЭБАРПОЛ» основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus) путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.
3. Детекция продуктов амплификации. Осуществляется двумя способами в зависимости от формата набора:

- методом электрофореза в агарозном геле (формат Базовый);
- методом флуоресцентной детекции (формат Флуоропол), который позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации ДНК-фрагмента в процессе реакции. Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе за счет специфической гибридизации ампликонов с олигонуклеотидным зондом, несущим флуоресцентную метку. В ходе последующей полимеразной реакции происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе. Программное обеспечение, прилагаемое к амплификатору или флуоресцентному детектору, позволяет проводить корректную обработку данных для выявления ДНК вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus).

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

100% специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам последовательности гена gp 350 вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus), а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарным участком ампликона (специфического продукта амплификации). Использование набора «ЭБАРПОЛ» позволяет выявлять только вирус Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus) и исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.2. Чувствительность анализа

С помощью набора «ЭБАРПОЛ» можно обнаружить 10^4 геном-эквивалентов/мл и более ДНК-матриц вируса Эпштейн-Барра (Epstein-Barr virus) в прошедшей обработке (выделение ДНК) пробе.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение “Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР” (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. биологический материал человека может являться источником инфекционных или вирусных заболеваний.

5. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора реагентов входят три комплекта:

5.1. Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК):

Реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции («ДНК-ЭКСПРЕСС») (на 100 анализируемых проб).

Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС» состоит из 100 пробирок типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 200 мкл реагента.

5.2. Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации.

Данные комплекты выпускаются в различных форматах, в зависимости от числа реакционных доз (постановочных реакций), степени их готовности к постановке амплификации (см табл. 1).

Таблица 1

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Формат Базовый Маркировка (50)	1. Реакционная смесь*..... 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК...	1 пробирка – 165 мкл 1 пробирка – 31 мкл 1 пробирка – 2 мл 1 пробирка – 2,2 мл 1 пробирка – 60 мкл
Формат Базовый Маркировка (100)	1. Реакционная смесь*..... 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК....	1 пробирка – 310 мкл 1 пробирка – 31 мкл 1 пробирка – 2 мл 1 пробирка – 2,2 мл 1 пробирка – 60 мкл
Формат Базовый Маркировка (200)	1. Реакционная смесь*..... 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК....	1 пробирка – 620 мкл 1 пробирка – 55 мкл 2 пробирки – по 2 мл 2 пробирки – по 2,2 мл 1 пробирка – 100 мкл
Формат Флуоропол Маркировка КТ (по конечной точке)	1. Реакционная смесь** 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК.... 6. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»	1 пробирка – 680 мкл 1 пробирка – 30 мкл 1 пробирка – 2 мл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 200 мкл
Формат Флуоропол Маркировка РВ (в реальном времени)	1. Реакционная смесь** 2. Таq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК.... 6. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»	1 пробирка – 1360 мкл 1 пробирка – 60 мкл 2 пробирки – по 2 мл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл 1 пробирка – 200 мкл

Комплекты для проведения амплификации включают готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси (формат Базовый) входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- внутренний контроль (рекомбинантная плазмида, содержащая фрагмент-вставку определенного размера);

**В состав реакционной смеси (формат Флуоропол) входят:

- раствор дНТФ;

- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую к применению расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь.

5.3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции.

Таблица 2

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Комплект №1	1. Агароза 2. Раствор бромистого этидия 3. 50-кратный TAE-буфер	1 флакон – 4,0 г 1 пробирка – 30 мкл 2 флакона - по 13 мл
Комплект №2	1. 2% агарозный гель (40 лунок) 2. 50-кратный TAE-буфер	3 планшета 1 флакон – 25 мл

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из биопробы

Для всех форматов

- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС»
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эпландорф, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации.

2.1. Для всех форматов

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2.2. Для формата Флуоропол

- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации.

3 этап - детекция продуктов амплификации.

3.1. Методом электрофореза в агарозном геле для формата Базовый.

- комплект реагентов для электрофоретической детекции (комплект № 1 или комплект № 2);
- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-транслюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- весы технические;
- вода дистиллированная;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- емкость пластиковая большого объема для дезактивации буфера и гелей.

3.2. Методом флуоресцентной детекции для формата Флуоропод «по конечной точке»

- флуоресцентный детектор.

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Образцы слюны в объеме 1-1,5 мл собирают в одноразовую сухую стерильную пробирку. Материал для исследования должен быть свежим. *Не охлаждать и не замораживать!*

7.2. Предварительная обработка клинического материала

Пробирки с образцами слюны отцентрифугировать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 10-15 минут при 12000 об/мин, тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне 20-30 мкл (не более 50 мкл). К осадку в пробирке добавить все содержимое (200 мкл) из одной пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС», тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

7.3. Выделение ДНК.

7.3.1. Пробирку с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС», содержащую анализируемый материал, тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 10 секунд.

7.3.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до температуры + 98°C, и прогреть при температуре + 98°C в течение 10 минут.

Примечание: перед помещением пробирок в термостат необходимо проверить, чтобы во всех пробирках был защелкнут замочек на крышках. Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру процесса не менее + 98°C.

7.3.3. После прогрева пробирки перенести в центрифугу и центрифугировать при 12000-16000 g (8000 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 15 секунд.

7.3.4. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Полученные пробы можно хранить при температуре +2-8°C не более одной недели или при температуре -18...-20°C не более 6 месяцев.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Проведение ПЦР-амплификации с использованием комплекта реагентов формата Базовый.

8.1.1. Приготовить и пронумеровать пробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца.

8.1.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Таq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

8.1.3. Приготовить амплификационную смесь (формат Базовый) согласно приведенной таблице (табл. 3):

Таблица 3

Кол-во пробирок	Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Тaq-полимераза, мкл
1	17,5	2,5	0,2
5	87,5	12,5	1
10	175	25	2
15	263	37,5	3
20	350	50	4
25	438	62,5	5

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

8.1.4. После добавления Таq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

8.1.5. Внести по 20 мкл амплификационной смеси во все пробирки, подготовленные для амплификации.

8.1.6. Добавить во все пробирки по 20 мкл минерального масла.

8.1.7. Внести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. 7.3.4) в соответствующую пробирку с амплификационной смесью под слой масла, используя индивидуальные наконечники с фильтрами.

8.1.8. Внести в пробирку для положительного контрольного образца ДНК 5 мкл положительного контрольного образца ДНК, а в пробирку для отрицательного контрольного образца – 5 мкл разбавителя.

8.1.9. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500- 3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C) на микроцентрифуге-вортексе.

8.1.10. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+94°C – 30 секунд

+94°C – 40 секунд

+64°C – 40 секунд

+72°C – 40 секунд

количество циклов 3

+92°C – 10 секунд

+62°C – 10 секунд

+72°C – 10 секунд

количество циклов 32

+72°C – 1 минута

Примечание. Приведенная программа отработана для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «ЭБАРПОЛ».

8.2. Проведение ПЦР-амплификации с использованием комплекта реагентов формата Флуоропол.

8.2.1. Приготовить и, по возможности, пронумеровать бесцветные пробирки, соответствующие типу прибора (согласно инструкции к прибору).

8.2.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

8.2.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 (табл. 4), и тщательно перемешать пипетированием или на микроцентрифуге-вortexе.

Таблица 4

Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Объем рабочей смеси, мкл
15	5	20
30	10	40
60	20	80
300	100	400
600	200	800
900	300	1200
1200	400	1600

8.2.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести необходимый объем (согласно инструкции к прибору) рабочей смеси.

8.2.5. Для приготовления амплификационной смеси в оставшуюся рабочую смесь добавить Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющейся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием или на микроцентрифуге-вortexе (табл. 5).

Таблица 5

Объем рабочей смеси, мкл	Taq-полимераза
20	0,2
40	0,4
80	0,8
400	4
800	8
1200	12
1600	16

8.2.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, указанных в инструкции к прибору объем амплификационной смеси (табл. 6).

Таблица 6

Объем амплификационной смеси на образец, мкл	Объем образцов, мкл			Примеры приборов
	Исследуемый	Отрицательный контрольный образец	Положительный контрольный образец ДНК	
20	5	5	5	Терцик/Джи (ДНК-технология)
40	10	10	10	MiniOpticon, IQ5 (BioRad)
80	20	20	20	Cobas Taqman 48 (Roche)

8.2.7. При необходимости (согласно инструкции к прибору) добавить во все пробирки указанное количество минерального масла.

8.2.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами в объеме 1/4 от внесенной амплификационной смеси:

- а) в фоновые пробирки – реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС» (входит в состав набора);

- б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

8.2.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C) на микроцентрифуге-вортксе.

8.2.10. В случае проведения ПЦР с детекцией результата «по конечной точке» реакции перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе

+94 °C	1 минута 30 секунд	} 40 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	10 секунд	
+72 °C	40 секунд	
+72 °C	2 минуты	
+10°C	Хранение	

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Термик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «ЭБАРПОЛ».

8.2.11. При проведении ПЦР с детекцией результата «в реальном времени» амплификацию следует проводить по следующей программе.

+94 °C	1 минута 30 секунд	} 40 циклов
+94 °C	10 секунд	
+64 °C	10 секунд	
+72 °C	40 секунд	
+50 °C	считывание	

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата в режиме «реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора.

8.3. Детекция продуктов амплификации (для формата Базовый).

8.3.1. Проведение электрофореза

8.3.1.1. Заполнить камеру для электрофореза 1xTAE буфером, приготовленным на дистиллированной воде разбавлением 50xTAE буфера в 50 раз.

Примечание. При использовании «Комплекта для электрофоретической детекции № 2» проведение электрофореза начинать с п. 8.3.1.5.

8.3.1.2. К 2 г агарозы добавить 2 мл 50xTAE буфера и 100 мл дистиллированной воды.

8.3.1.3. Расплавить агарозу на электрической плитке, или на водяной бане, или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл раствора агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешать.

8.3.1.4. Охладить агарозу до температуры $+50-60^{\circ}\text{C}$ при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) и залить в планшет для заливки гелей. Для получения карманов в агарозном геле установить гребенку на планшет, используя зажим типа "бульдог". После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.

8.3.1.5. Нанести в карманы геля по 10 мкл продукта амплификации в последовательности, соответствующей нумерации проб.

8.3.1.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/см длины геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта не менее 1,5-2 см.

8.3.2. Регистрация результатов электрофореза

8.3.2.1. Вынуть гель из планшета и перенести гель на стекло ультрафиолетового трансиллюминатора.

ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.

8.3.2.2. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос оранжево-красного цвета.

ВНИМАНИЕ! Просмотр геля следует проводить только через защитный экран или защитные очки, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги и вреден для глаз.

8.3.2.3. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

8.4. Детекция продуктов амплификации (для формата Флуоропол).

8.4.1. Детекция продуктов амплификации для формата Флуоропол «по конечной точке».

При проведении ПЦР с детекцией результатов «по конечной точке» реакции следует, по окончании реакции, перенести пробирки из амплификатора в прибор для флуоресцентной детекции результатов реакции (ПЦР-детектор) и провести измерения согласно инструкции к прибору. Анализ проводится управляющей программой ПЦР-детектора автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений.

Для ПЦР-детектора «ДЖИН» установлены следующие пороговые значения:

Возбудитель	-	+	ВК
Epstein-Barr virus	2,45	2,85	2,25

Примечание. Приведенные характеристики и пороговые значения отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик» и ПЦР-детекторе «ДЖИН». По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «ЭБАРПОЛ».

8.4.2. Детекция продуктов амплификации для формата Флуоропол «в реальном времени».

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов для форматов Базовый.

9.1.1. В отрицательном контрольном образце должна выявляться только одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю, размером 550 п.н. Появление второй полосы на уровне положительного контрольного образца ДНК свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

В положительном контрольном образце ДНК должны выявляться две полосы:

- 1) полоса оранжево-красного цвета размером 378 п.н., соответствующая положительному контрольному образцу ДНК вируса Эпштейн-Барра;
- 2) полоса оранжево-красного цвета размером 550 п.н., соответствующая внутреннему контролю.

Анализируемые пробы.

Отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контрольного образца ДНК (378 п.н.) свидетельствует об отсутствии ДНК вируса Эпштейн-Барра в анализируемой пробе.

Наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу ДНК (378 п.н.), свидетельствует о присутствии ДНК вируса Эпштейн-Барра в анализируемой пробе.

Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса оранжево-красного цвета размером 550 п.н., соответствующая внутреннему контролю

***Примечание.** Если в пробе присутствует большое количество ДНК искомого возбудителя, то на гель-электрофореграмме должна наблюдаться интенсивная полоса на уровне положительного контрольного образца ДНК, но при этом может не наблюдаться полосы внутреннего контроля; такие пробы следует интерпретировать как положительные.*

Если в анализируемом образце отсутствует как полоса, соответствующая по подвижности положительному контрольному образцу ДНК, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР; неадекватная работа амплификатора; ошибка выполнения процедуры проведения анализа и др.). В этом случае необходимо провести повторный анализ, начиная со стадии выделения ДНК.

9.2. Анализ и интерпретация результатов для формата Флуоропол.

9.2.1. При проведении детекции «по конечной точке» реакции анализ проводится управляющей программой автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений. Результат выводится в соответствующем месте протокола, зависящем от конкретной программы.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7

	Результат	Специфика*	ВК*	Интерпретация
К+	+	Сигнал>«+»	любой	Реакция прошла.
	-	Сигнал<«-»	Сигнал>«ВК»	Реакция не прошла.
	нд (па, N/A)	Сигнал<«-»	Сигнал<«ВК»	НЕОБХОДИМА перестановка.
	?	«-»<Сигнал <«+»	любой	
К-	нд (па, N/A)	Сигнал<«-»	Сигнал<«ВК»	Контаминация отсутствует.
	-	Сигнал<«-»	Сигнал>«ВК»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
	+	Сигнал>«+»	любой	Специфическая контаминация.
	?	«-»<Сигнал <«+»	любой	НЕОБХОДИМА перестановка.
Анализируемый образец	+	Сигнал>«+»	любой	Положительная проба.
	-	Сигнал<«-»	Сигнал>«ВК»	Отрицательная проба.
	?	«-»<Сигнал <«+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд (па, N/A)	Сигнал<«-»	Сигнал<«ВК»	Недостовверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	фон	Не интерпретируется.		

* Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:

- для специфического сигнала (Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;
- для внутреннего контроля – с пороговым значением внутреннего контроля «ВК».

В столбце *Результат* выводится качественный результат анализа, определенный на основе сравнения полученных после нормировки значений сигнала с пороговыми.

В столбцах *Специфика* и *ВК* выводятся численные значения сигнала в соответствующих каналах, нормированные на фон (усредненный фон принимается равным 1, нормировочные коэффициенты для каждого канала выводятся под соответствующим столбцом). Те же значения в графическом виде представлены на диаграмме.

Примечание. При возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.

9.2.2. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в реальном времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа выбирается согласно таблице 8.

Таблица 8

	Канал	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл
Внутренний контроль	F2	HEX	2	35
Эпштейн-Барр вирус	F1	FAM	1	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления фоновых сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления фоновых сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.2.3. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9.

	Ct FAM	Ct HEX	Результат
K+	< КЦ	любой	Специфическая реакция прошла.
K-	HЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	HЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Анализируемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	HЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	HЗ или > КЦ	HЗ или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.
Фон	НЕ ИНТЕРПРЕТИРУЕТСЯ		

В таблице использованы следующие обозначения:

St FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

St HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

НЗ – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

КЦ – конечный цикл – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией после него полностью аналогично ситуации, когда пересечение не зарегистрировано вовсе.

Примечание. Приведенные характеристики КЦ и пороговые значения представлены на примере прибора Cobas Taqman 48. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «ЭБАРПОЛ».

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до +25°C не более 5 суток.

10.2. Комплекты для проведения амплификации всех форматов должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 суток.

10.3. Комплект для электрофоретической детекции № 1 должен храниться при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности, комплект № 2 - при температуре +2-8°C в течение всего срока годности.

10.4. Срок годности набора – 6 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.5. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре +2-8°C не более одной недели или при температуре -18-20°C не более 6 месяцев.

10.6. 1хТАЕ буфер можно хранить при комнатной температуре не более 1 недели.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)246-45-01, или e-mail: info@lytech.ru

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (495)120-60-95; 120-60-96.

Директор ООО НПФ «Литех»

Прозоровский Н.С.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава

Долгов В.В.

Подпись Долгов В.В.
Удостоверенный специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
Подпись 11.10.08

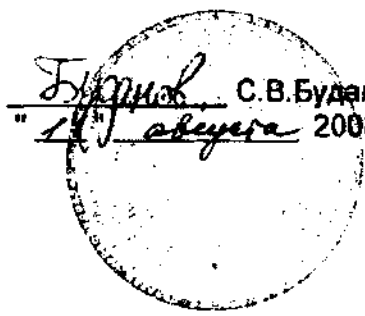
Код ОКП 93 9817

«СОГЛАСОВАНО»

«УТВЕРЖДАЮ»

И.О. Генерального директора
ФГУ «НЦ ЭСМП»
Росздравнадзора

Директор ООО НПФ «ЛИТЕХ»


С.В.Буданов
"14" августа 2008 г.


Н.С.Прозоровский
2008 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ

ДНК вируса Эпштейн-Барра (*Epstein-Barr virus*)

МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

(ЭБАРПОЛ)

Технические условия

ТУ 9398-022-17253567-2008

Введены впервые

Срок действия: с "14" августа 2008 г.
до "14" августа 2013 г.

2008 г.

Подпись и дата	
Имя, № дубл.	
Взамен имя, №	
Подпись и дата	
Имя, № подл.	

Настоящие технические условия распространяются на Набор реагентов для обнаружения ДНК вируса Эпштейн-Барра (*Epstein-Barr virus*) (ЭБАРПОЛ) в биологических пробах человека (слюна) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), далее по тексту - набор.

Набор имеет форматы: Базовый и Флуоропол, предназначенные для качественного выявления ДНК вируса Эпштейн-Барра (*Epstein-Barr virus*) и различающиеся комплектацией [число реакционных доз (постановочных реакций), степень их готовности к постановке амплификации] и способом регистрации амплифицированного фрагмента ДНК (флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» на адаптированных для этого приборах или электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле).

В состав набора входят следующие комплекты реагентов:

1) комплект для пробоподготовки (выделение ДНК), включающий:

реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ДНК-ЭКСПРЕСС) - универсальный для всех форматов;

2) комплект реагентов для проведения ПЦР- амплификации (по следующим форматам):

а) формат Базовый, включающий:

- реакционную смесь, содержащую внутренний контроль;
- Taq-полимеразу;
- разбавитель;
- минеральное масло;
- положительный контрольный образец ДНК вируса Эпштейн-Барра;

б) формат Флуоропол, включающий:

- реакционную смесь, содержащую флуоресцентные зонды;
- Taq-полимеразу;

Име. № подл	Име. № дубл	Взамен име. №	Подпись и дата	Подпись и дата	ТУ 9398- 022- 17253567-2008								
					Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	Набор реагентов для обнаружения Вируса Эпштейн-Барра (<i>Epstein-Barr virus</i>) методом полимеразной цепной реакции (ЭБАРПОЛ). Технические условия.	Литера	Лист	Листов
					Разраб.	Петрунин Д.Д.	<i>Лев</i>				A	2	38
					Прое.						ООО НПФ "ЛИТЕХ"		
Н. контр.													
					Утв.	Прозоровский Н.С.	<i>Н/С</i>						

- разбавитель;
- положительный контрольный образец ДНК вируса Эпштейн-Барра;
- реагент ДНК-ЭКСПРЕСС (фоновый образец).

3) комплекты реагентов для детекции.

Используемые форматы детекции:

а) комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов ПЦР амплификации (используется для форматов Базовый):

комплект № 1, включающий:

- агарозу;
- 50-кратный ТАЕ-буфер;
- раствор бромистого этидия.

или комплект № 2, включающий:

- 2% агарозный гель, содержащий бромистый этидий;
- 50-кратный ТАЕ-буфер.

б) флуоресцентная детекция (используется для формата Флуоропол) позволяет проводить автоматическую регистрацию накопления специфических фрагментов ДНК в процессе амплификации в реакционном растворе за счет специфической гибридизации ампликонов с олигонуклеотидным зондом, несущим флуоресцентную метку; обработка и интерпретация результатов осуществляется программным обеспечением амплификатора или флуоресцентного детектора и не требует использования комплекта реагентов для электрофоретической детекции. Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

Формат Базовый - Набор рассчитан на проведение анализа клинических образцов с последующей детекцией амплифицированного фрагмента ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

Формат Флуоропол - Набор рассчитан на проведение анализа клинических об-

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398- 022 -17253567-2008	Лист 3

разцов с последующей флуоресцентной детекцией амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами "по конечной точке" или "в реальном времени" на адаптированных для этого приборах.

Набор выпускается в виде 5 различных вариантов комплектаций.

Комплектация № 1 (формат Базовый) - Набор рассчитан на проведение анализа 50 клинических образцов, 5 проб положительного контрольного образца ДНК Вируса Эпштейн-Барра и 5 проб отрицательного контрольного образца (всего 60 определений).

Комплектация № 2 (формат Базовый) - Набор рассчитан на проведение анализа 100 клинических образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК Вируса Эпштейн-Барра и 10 проб отрицательного контрольного образца (всего 120 определений).

Комплектация № 3 (формат Базовый) - Набор рассчитан на проведение анализа 200 клинических образцов, 20 проб положительного контрольного образца ДНК Вируса Эпштейн-Барра и 20 проб отрицательного контрольного образца (всего 240 определений).

Комплектация № 4, 5 (формат Флуоропол) - Набор рассчитан на проведение анализа 100 клинических образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК Вируса Эпштейн-Барра, 10 проб отрицательного контрольного образца, 10 проб фоновых образцов (всего 130 определений) и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами "по конечной точке" или "в реальном времени" на адаптированных для этого приборах.

Область применения набора - клиническая медицина.

Пример обозначения набора при его заказе и в документации другого изделия:
"Набор ЭБАРПОЛ по ТУ 9398– 022 -17253567-2008, код ОКП 93 9817".

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Набор должен соответствовать требованиям настоящих технических условий.

Име. № подл	Подпись и дата	Взам. инв. №	Име. № дубл	Подпись и дата	ТУ 9398– 022 -17253567-2008					Лист
										4
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата						

1.2. Набор должен изготавливаться по производственному регламенту № 122, утвержденному Директором ООО НПФ "ЛИТЕХ" при НИИ ФХМ МЗ РФ 20 марта 2008 г.

1.3. По органолептическим и физико-химическим показателям набор должен соответствовать характеристикам и нормам, указанным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма	Методы контроля
1	2	3
1. Внешний вид		п. 4.1
1.1. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС	Прозрачная жидкость розового цвета	
1.2. Реакционная смесь		
1.2.1. Формат Базовый	Прозрачная вязкая жидкость темно-красного цвета	
1.2.2. Формат Флуоропол	Прозрачная слегка вязкая жидкость желтоватого цвета	
1.3. Таq-полимераза	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	
1.4. Разбавитель		
1.4.1. Формат Базовый	Прозрачная жидкость розового цвета	
1.4.2. Формат Флуоропол	Прозрачная бесцветная жидкость или прозрачная жидкость желтоватого цвета	
1.5. Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость или прозрачная вязкая жидкость желтоватого цвета	
1.6. Положительный контрольный образец ДНК	Прозрачная жидкость светло-розового цвета	
1.7. Агароза	Порошок белого цвета	
1.8. Агарозный гель	Желеобразная бесцветная пластина, имеющая лунки для внесения образцов.	
1.9. 50-кратный ТАЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	
1.10. Раствор бромистого этидия	Прозрачная жидкость темно-красного цвета	

Име. № подл. Подпись и дата. Взам. инв. №. Име. № дубл. Подпись и дата.

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата

1	2	3
2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ		
2.1. Чувствительность, геном-эквивалентов * / мл, не менее	10000	п. 4.2
2.2. Специфичность		
2.2.1. Формат Базовый		
2.2.1.1. Положительный контрольный образец ДНК	1 полоса оранжево-красного цвета размером 378 н.п., соответствующая положительному контрольному образцу ДНК вируса Эпштейн-Барра ; 1 полоса оранжево-красного цвета размером 550 н.п., соответствующая внутреннему контролю	п. 4.2.3.3
2.2.1.2. Отрицательный контрольный образец	1 полоса оранжево-красного цвета размером 550 н.п., соответствующая внутреннему контролю	п. 4.2.3.3
2.2.2. Формат Флуоропол		
2.2.2.1. Положительный контрольный образец ДНК	Флуоресцентный сигнал должен регистрироваться по двум каналам: 1) специфический фрагмент ДНК вируса Эпштейн-Барра — по каналу FAM (выше порогового значения); 2) внутренний контроль — по каналу HEX (ниже порогового значения);	п. 4.2.5.3
2.2.2.2. Отрицательный контрольный образец	Флуоресцентный сигнал должен регистрироваться по двум каналам ниже порогового значения.	п. 4.2.5.3

*Геном-эквивалент—количество ДНК, содержащееся в одном микроорганизме.

1.4. Комплектность.

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению;

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398– 022 -17253567-2008	Лист
						6

Име. № посп	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата

- **внутренний контроль:** рекомбинантная плазмида, полученная на основе вектора pGEM (лабораторный регламент № 40, ООО НПФ "Литех"), содержащая фрагмент-вставку размером 530 н.п. (лабораторный регламент № 95, ООО НПФ

Лист
7

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата

д) положительный контрольный образец ДНК (для всех форматов): плазмидная ДНК со встроенным фрагментом ДНК вируса Эпштейн-Барра, выделенная из клеток E.coli, выращенных на культуральной среде (лабораторный регламент № 96, ООО НПФ "ЛИТЕХ",), растворенная в разбавителе соответствующего формата (концентрация 0,1 нг/мл, содержит 500 фемтограмм ДНК/5 мкл).

Лист
9

Комплектации реагентов для проведения ПЦР-амплификации

Таблица 2

Формат, Маркировка	Состав	Комплектация
Формат Базовый Маркировка (50)	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. Минеральное масло 5. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка—165 мкл 1 пробирка—31 мкл 1 пробирка—2 мл 1 пробирка—2,2 мл 1 пробирка—60 мкл
Формат Базовый Маркировка (100)	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. Минеральное масло 5. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка—310 мкл 1 пробирка—31 мкл 1 пробирка—2 мл 1 пробирка—2,2 мл 1 пробирка—60 мкл
Формат Базовый Маркировка (200)	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. Минеральное масло 5. Положительный контрольный образец ДНК	1 пробирка—620 мкл 1 пробирка—55 мкл 2 пробирки—по 2 мл 2 пробирки—по 2,2 мл 1 пробирка—100 мкл
Формат Флуоропол Маркировка КТ (по конечной точке)	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. Минеральное масло 5. Положительный контрольный образец ДНК 6. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»	1 пробирка—680 мкл 1 пробирка—30 мкл 1 пробирка—2 мл 2 пробирки—по 2 мл 1 пробирка—100 мкл 1 пробирка—200 мкл
Формат Флуоропол Маркировка РВ (в реальном времени)	1. Реакционная смесь 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. Минеральное масло 5. Положительный контрольный образец ДНК 6. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»	1 пробирка—1360 мкл 1 пробирка—60 мкл 2 пробирки—по 2 мл 2 пробирки—по 2 мл 1 пробирка—200 мкл 1 пробирка—200 мкл

3) Комплект для детекции продуктов ПЦР-амплификации.

а) комплект реагентов для детекции продуктов амплификации с использованием электрофореза (для формата Базовый):

комплект № 1:

- агароза (кат. № А 9918, фирма Sigma, США) - 1 флакон (4,0 г);
- раствор бромистого этидия, 1% (кат. № 11615, фирма Merck, Германия), готов к применению - 1 пробирка (30 мкл);
- 50-кратный ТАЕ-буфер [2 М трис-ацетат (кат. № Т 1258, фирма Sigma, США); 0,05 М этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (кат. № Е 9884, фирма Sigma, США)], рН 8,2, готов к применению - 2 флакона (по 13 мл);

ТУ 9398-022-17253567-2008

Лист

10

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен и №	Име. № дубл	Подпись и дата

- 50-кратный ТАЕ-буфер - 1 флакон (25 мл).

Флуоресцентная детекция продуктов ПЦР-амплификации в режиме «реального времени» на адаптированных для этого приборах проводится в процессе ПЦР-амплификации в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией и не требует дополнительного комплекта реагентов для детекции.

1.5. Упаковка.

1.5.2. Реакционная смесь формата Флуоропол, разбавитель, масло минеральное должны быть расфасованы в пробирки полипропиленовые вместимостью 2,0 мл с винтовой горловиной и навинчивающимися крышками, поступающими в комплекте с пробирками (кат. № 519-GRD, фирма QSP, США).

1.5.3. Агароза должна быть расфасована во флаконы полипропиленовые вместимостью 4,0 мл с винтовой горловиной и навинчивающимися крышками, поступающими в комплекте с флаконами (кат. № ВМ.04, фирма «Митра», Белоруссия).

1.5.4. 50-кратный ТАЕ-буфер должен быть расфасован во флаконы вместимостью 50 мл или 13 мл из бесцветного полипропилена с винтовой горловиной и навинчивающимися крышками, поступающими в комплекте с флаконами (кат. № ВМ.50, фирма «Митра», Белоруссия; или кат. № ВМ.13, фирма

TY 9398- 022 -17253567-2008

Листы

11

Имя № подл	Подпись и дата	Взамен инв. №	Имя № дубл	Подпись и дата

- наименования предприятия-изготовителя и его товарного знака;
- сокращенного названия набора;
- названия компонента;
- условий хранения;

Лист
12

- номера настоящих технических условий;
- номера и даты регистрационного удостоверения;
- номера серии.

1.6.4. На каждый ящик должна быть наклеена этикетка из бумаги писчей (ГОСТ 18510) с указанием:

- наименования предприятия-изготовителя и его товарного знака;
- полного и сокращенного названия набора;
- условий транспортирования и хранения;
- количества наборов в ящике.

1.6.5. На ящик, согласно ГОСТ 14192, наносят манипуляционные знаки: "Верх не кантовать", "Осторожно хрупкое", "Боится нагревания", "Биопрепараты", "Соблюдение интервала температур".

1.6.6. Графическое оформление маркировки пробирок, пакетов, флаконов, коробок и ящиков производят по ГОСТ 17768, фасовку - по ГОСТ 3885, маркировку - по ГОСТ Р 51088.

2. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

2.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а (ГОСТ Р 51609).

2.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

2.3. Меры предосторожности - соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

2.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или

Име. № подл.	Подпись и дата
Име. № дубл.	
Взамен име. №	
Подпись и дата	

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398-022-17253567-2008	Лист
						14

пластиковые перчатки, т.к. биологический материал человека может являться источником инфекционных или вирусных заболеваний.

2.5. При работе с трансиллюминатором следует надевать защитные очки.

2.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

2.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

3. ПРАВИЛА ПРИЕМКИ

3.1. Каждая серия наборов должна быть принята отделом технического контроля (ОТК) предприятия изготовителя.

3.2. Под серией следует понимать определенное количество наборов, одновременно изготовленных в одинаковых производственных условиях, оформленных единым номером и документом о качестве (паспортом) с указанием:

- наименования предприятия-изготовителя;
- полного и сокращенного названия набора;
- номера серии;
- количества наборов в серии;
- даты изготовления;
- срока годности;
- результатов контроля;
- номера и даты выдачи паспорта;
- обозначения настоящих технических условий;
- штампа ОТК.

3.3. ОТК предприятия-изготовителя контролирует качество расфасовки, упаковки, маркировки, комплектность поставки, а также соответствие

Име. № подл	Подпись и дата
Взам. инв. №	Подпись и дата
Име. № дубл	Подпись и дата

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398-022-17253567-2008	Лист 15
------	------	----------	---------	------	---------------------------	------------

органолептических и физико-химических показателей набора требованиям, указанным в настоящих технических условиях.

3.4. Для контроля качества наборов и создания архивных образцов ОТК методом случайного отбора составляет из разных мест каждой серии выборку, включающую три набора.

3.5. После проверки качества расфасовки, упаковки, маркировки и комплектности поставки один набор используют для контроля на соответствие требованиям настоящих технических условий. Остальные два набора хранят в архиве до истечения срока годности.

3.6. При неудовлетворительных результатах контроля хотя бы по одному из показателей, проводят повторный контроль по всем показателям двух наборов, взятых из той же серии. Результаты повторного контроля распространяют на всю серию. При неудовлетворительных результатах повторного контроля серию бракуют.

3.7. Контроль качества наборов при изготовлении осуществляет ОТК предприятия-изготовителя. Государственный контроль качества выпускаемой продукции проводит Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора.

4. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

Методы контроля набора - по ГОСТ Р 51352.

4.1. Внешний вид компонентов набора контролируют визуально.

4.2. Определение чувствительности и специфичности.

4.2.1. Материалы, оборудование, реагенты:

- ПЦР-бокс;
- автоматический термоциклер (амплификатор) "Терцик MC2" (фирма НПФ

Име. № подл.	Подпись и дата
Име. № дубл.	Подпись и дата
Взамен име. №	Подпись и дата
Име. № подл.	Подпись и дата

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398- 022 -17253567-2008	Лист
						16

- ПЦР-детектор "Джин" (фирма НПФ "ДНК-Технология", Москва);
- анализатор для проведения ПЦР в реальном времени COBAS TaqMan 48 (фирма Roche, Германия) с программным обеспечением;
- ультрафиолетовый трансиллюминатор (фирма НПП "Биоком", Москва);
- холодильник с морозильной камерой, обеспечивающей температуру -18-20°С (Минск 15М);
- прибор для горизонтального электрофореза "SE-2" (фирма "Хеликон", Москва);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500-3000 об/мин "FV-2400" (фирма "Биосан", Латвия, Рига);
- весы аналитические 0-200 г (фирма "Госметр", С-Петербург);
- микроцентрифуга, развивающая ускорение до 12000 об/мин (16000 g), "MiniSpin" (фирма Eppendorf, Германия);
- СВЧ-печь;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с переменным или фиксированным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более 3%) (фирма «ТермоЭлектрон», Санкт-Петербург);
- бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 0,5 мл для амплификации (кат. № 502-PLN, фирма QSP, США);
- бесцветные одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации (кат. № 03287343001, фирма Roche, Германия);
- пробирки пластиковые вместимостью 1,5 мл (кат. № 000-MICR-157, фирма Elka, Финляндия);

17

Имя. № подл	Подпись и дата	Взята инв. №	Имя. № дубл	Подпись и дата

Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Taq-полимераза, мкл
350	50	4,0

- 1) Каждый компонент следует вносить отдельным наконечником!
- 2) После внесения Taq-полимеразы, которое проводится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

4.2.2.5. Во все пробирки добавить по 20 мкл масла минерального.

4.2.2.7. В пробирку, маркированную КОЧ, добавить 5 мкл контрольного образца чувствительности .

4.2.2.8. В пробирку, маркированную ОК, добавить 5 мкл разбавителя.

4.2.2.9. Пробирки закрыть крышками и центрифугировать при 1500-3000 об/мин (2250-4000 g) при комнатной температуре (18-25°C) в течение 3-5 сек.

4.2.3. Проведение контроля (формат Базовый).

4.2.3.1. Проведение ПЦР-амплификации.

4.2.3.1.1. После окончания центрифугирования все пробирки поместить в прогретый до температуры 94°C программируемый амплификатор и провести амплификацию в следующем температурном режиме:

1) первичная денатурация ДНК при температуре 94°C - 30 сек -1 цикл;

Имя. № подл	Подпись и дата	Взамен инв. №	Имя. № дубл	Подпись и дата

- 3) 32 цикла в режиме:

- денатурация ДНК при температуре 92°C - 10 сек;
- отжиг праймеров при температуре 62°C - 10 сек;
- синтез новых цепей ДНК при температуре 72°C - 10 сек;

4) дополнительный синтез новых цепей ДНК при температуре 72°C - 1 мин.

В случае необходимости пробы после амплификации можно оставить на ночь, но тогда следует ввести дополнительный цикл: при температуре 2-8°C - 15 ч.

4.2.3.2. Проведение электрофореза.

4.2.3.2.1. Приготовление реагентов для проведения электрофореза.

4.2.3.2.1.1. Приготовление разведенного буферного раствора для проведения электрофореза.

В колбу коническую вместимостью 1,0 л внести 20 мл 50-кратного ТАЕ-буфера, добавить 980 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре (18-25°C) не более 1 недели.

4.2.3.2.1.2. Приготовление агарозного геля.

В колбу коническую термостойкую вместимостью 250 мл внести 2,0 г агарозы, добавить 2,0 мл 50-кратного TAE-буфера и 100 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать.

Колбу поместить в СВЧ-печь, довести содержимое до кипения и после того, как агароза полностью растворится, колбу с расплавленной агарозой вынуть из печи. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным и не содержать отдельных

					ТУ 9398-022-17253567-2008	Лист
						20
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата		

нерасплавленных частиц.

В колбу с расплавленной агарозой внести 10 мкл 1% раствора бромистого этидия и тщательно перемешать содержимое колбы равномерными вращательными движениями.

Расплавленную агарозу охладить до температуры примерно 50-60°C при комнатной температуре (18-25°C).

Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образца установить гребенку на планшет для заливки геля и зафиксировать гребенку с помощью зажимов типа "бульдог". Расплавленную агарозу, охлажденную до температуры 50-60°C, залить в планшет. После застывания агарозы (примерно через 30 мин) осторожно вынуть гребенку и перенести планшет с гелем на стол электрофоретической камеры.

В ванночку прибора для электрофореза залить 500 мл разведенного буферного раствора для электрофореза (см п. 4.2.3.2.1.1).

4.2.3.2.2. В соответствующую лунку агарозного геля внести по 10 мкл амплификата из соответствующей пробирки (см п. 4.2.3.1.1), гель поместить в камеру для электрофореза, подключить камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/см длины геля.

Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода к аноду. Контроль за электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта не менее 1,5 - 2 см.

Камеру отключить от источника питания, вынуть планшет с гелем, извлечь гель из планшета и осторожно перенести гель на стекло трансиллюминатора.

Примечание. Следует обязательно работать в резиновых перчатках!

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата	ТУ 9398— 022 -17253567-2008					Лист
					Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	21

Включить трансиллюминатор и проанализировать гель.

4.2.3.3. Учет результатов.

1. В отрицательном контрольном образце должна выявляться одна полоса оранжево-красного цвета размером 550 н.п., соответствующая по электрофоретической подвижности внутреннему контролю.

2. В положительном контрольном образце ДНК должны выявляться две полосы:

1) полоса оранжево-красного цвета размером 378 н.п., соответствующая по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу ДНК вируса Эпштейн-Барра.

2) полоса оранжево-красного цвета размером 550 н.п., соответствующая по электрофоретической подвижности внутреннему контролю.

3. В контрольном образце чувствительности должны выявляться две полосы:

1) полоса оранжево-красного цвета размером 378 н.п., соответствующая по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу ДНК Вируса Эпштейн-Барра.

2) полоса оранжево-красного цвета размером 550 н.п., соответствующая по электрофоретической подвижности внутреннему контролю.

Полученные результаты можно документировать с использованием видеокамеры.

4.2.4. Подготовка к контролю (формат Флуоропол).

4.2.4.1. Перед началом работы вынуть из морозильника комплект для проведения амплификации, содержимое пробирок с реагентами разморозить при комнатной температуре (18-25°C). Пробирку с Taq-полимеразой поместить в ледя-

Имя, № подл	Подпись и дата	Взамен инв. №	№ дубл	Подпись и дата	Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398-022-17253567-2008	Лист
											22

ную баню, а пробирки с амплификационной смесью и разбавителем тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

4.2.4.2. Промаркировать 1 пробирку ПК (положительный контрольный образец ДНК), 1 пробирку ОК (отрицательный контрольный образец), 1 пробирку КОЧ и 2 пробирки Ф (фоновые пробирки).

4.2.4.3. Приготовить из компонентов набора рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1, и тщательно перемешать пипетированием или на вортексе.

4.2.4.4. Внести необходимый объем рабочей смеси (объем зависит от используемого прибора) в фоновые пробирки.

4.2.4.5. В оставшуюся рабочую смесь внести Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющейся рабочей смеси. Полученную смесь тщательно перемешать пипетированием или на вортексе.

4.2.4.6. Внести в пробирки ПК, ОК и КОЧ необходимый (в зависимости от используемого для амплификации прибора) объем полученной амплификационной смеси.

4.2.4.7. Добавить во все пробирки по 25 мкл минерального масла.

4.2.4.8. Добавить в пробирки Ф реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»: в пробирку ОК - разбавитель; в пробирку ПК - положительный контрольный образец ДНК; в пробирку КОЧ - контрольный образец чувствительности. Объемы компонентов для различных приборов указаны в схеме 2.

Име. № подл	Подпись и дата
	Име. № дубл
	Взяли инв. №
	Подпись и дата

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата

ТУ 9398-022-17253567-2008

Лист
23

Схема 2.

Объем рабочей смеси на 1 образец, мкл	Объем образцов в мкл			Примеры приборов
	КОЧ	Отрицательный контрольный образец	Положительный контрольный образец ДНК	
20	5	5	5	Терцик/Джин (ДНК-технология)
80	20	20	20	Cobas Taqman 48 (Roche)

4.2.4.9. Закрыть пробирки крышками и центрифугировать в течение 3-5 сек при 1500-3000 об/мин на микроцентрифуге-вортексе при комнатной температуре (18-25°C).

4.2.5. Проведение контроля (формат Флуоропол).

4.2.5.1. Проведение ПЦР-амплификации.

4.2.5.1.1. Перенести пробирки в амплификатор и провести амплификацию по следующей программе:

для комплектов ПЦР с детекцией результата в «конечной точке» реакции на амплификаторе «Терцик» :

94 °C	1 мин 30 сек	
94 °C	10 сек	40 циклов
64 °C	10 сек	
72 °C	40 сек	
72 °C	2 мин	
10 °C	Хранение	

для ПЦР-комплектов «Флуоропол» с детекцией результата «в реальном времени» на амплификаторе COBAS Taqman 48:

94 °C	1 мин 30 сек	
94 °C	10 сек	40 циклов
64 °C	10 сек	
72 °C	40 сек	
50 °C	считывание	

4.2.5.2. Детекция продуктов амплификации.

4.2.5.2.1. Детекция продуктов амплификации «по конечной точке» .

Имя, № подл	Подпись и дата
Имя, № инв	Подпись и дата
Имя, № дубл	Подпись и дата
Имя, № инв	Подпись и дата
Имя, № дубл	Подпись и дата

ТУ 9398-022-17253567-2008

Лист

24

По окончании реакции пробирки с амплификационной смесью перенести в ПЦР-детектор «ДЖИН» и провести измерения согласно инструкции к прибору. Анализ проводится управляющей программой ПЦР-детектора автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений.

Для наборов ФЛУОРОПОЛ установлены следующие пороговые значения:

Таблица 3

Возбудитель	-	+	ВК
Epstein-Barr virus	2,45	2,85	2,25

4.2.5.2.2. Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» .

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

4.2.5.3. Учет результатов.

4.2.5.3.1. Учет результатов амплификации «по конечной точке» .

В столбце *Результат* выводится качественный результат анализа, определенный на основе сравнения полученных после нормировки значений сигнала с пороговыми.

В столбцах *Специфика* и *ВК* выводятся численные значения сигнала в соответствующих каналах, нормированные на фон (усредненный фон принимается равным 1, нормировочные коэффициенты для каждого канала выводятся под соответствующим столбцом).

В положительном контрольном образце ДНК (ПК) и контрольном образце чувствительности (КОЧ) результат должен выявляться в графе «Результат» как положительный (+); в отрицательном контрольном образце (ОК) - как отрицатель-

Имя, № подл	Подпись и дата
Имя, № дубл	
Взамен имя, №	
Подпись и дата	

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398-022-17253567-2008	Лист
						25

ный (-) или недостоверный (нд); результат, полученный при детекции фоновых пробирок, не интерпретируется.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

	Результат	Специфика	ВК	Интерпретация
ПК	+	Сигнал > порогового значения (+)	Сигнал < порогового значения ВК	Наличие специфической ДНК возбудителя. Отсутствие геномной ДНК человека.
КОЧ	+	Сигнал > порогового значения(+)	Сигнал < порогового значения ВК	Наличие специфической ДНК возбудителя. Отсутствие геномной ДНК человека.
ОК	нд	Сигнал < порогового значения(-)	Сигнал < порогового значения ВК	Отсутствие специфической ДНК возбудителя. Отсутствие геномной ДНК человека. Контаминация отсутствует.
фон	фон	Сигнал < порогового значения(-)	Сигнал < порогового значения ВК	Не интерпретируется.

4.2.5.3. Детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени» (на примере прибора Cobas Taqman 48).

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

При открытии файла с данными в анализирующей программе устанавливаются доступными для анализа циклы с 8 по 36. После этого программа на основании загруженных данных выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

Имя. № подл.	Подпись и дата	Взам. инв. №	№ дубл.	Подпись и дата

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398–022 -17253567-2008	Лист
						26

ла для всех образцов. Пороговая линия для отсечки шума и анализа выбирается согласно таблице 5.

Таблица 5

	Канал	Флуорофор	Пороговая линия	Конечный цикл
Внутренний контроль	F2	HEX	2	35
Epstein-Barr virus	F1	FAM	1	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления фонового сигнала с пороговой линией.

Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления фонового сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

5. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

5.1. Транспортирование реагента ДНК-ЭКСПРЕСС должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, принятых на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C.

5.2. Транспортирование комплектов для проведения амплификации должно производиться при температуре минус 18-20°C. Допускается транспортирование при температуре не выше 0°C не более 1 сут.

5.3. Транспортирование комплекта для электрофоретической детекции № 1 должно производиться при комнатной температуре (18-25°C), комплекта для электрофоретической детекции № 2 - при температуре 2-8°C.

Имя. № подл	Подпись и дата	Взамен ина. №	№ дубл	Подпись и дата						Лист 27
					ТУ 9398-022-17253567-2008					Лист 27
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата						

5.4. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до 25°C не более 5 сут.

5.5. Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 1 сут.

5.6. Комплект для электрофоретической детекции № 1 должен храниться при комнатной температуре (18-25°C) в течение всего срока годности, комплект № 2 - при температуре 2-8°C в течение всего срока годности.

6. УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

6.1. Набор должен применяться согласно Инструкции по применению, утвержденной Росздравнадзором " " 2008 г.

6.2. Разведенный буферный раствор для проведения электрофореза можно хранить при комнатной температуре не более 1 недели.

7. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

7.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими техническими условиями.

7.2. Срок годности наборов - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен инв. №	в. № дубл	Подпись и дата						
					ТУ 9398-022-17253567-2008					Лист
										28
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата						

**ПЕРЕЧЕНЬ ДОКУМЕНТОВ ССЫЛКИ НА КОТОРЫЕ ДАНЫ В НАСТОЯЩИХ
ТЕХНИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

ГОСТ 2.114-95	Единая система конструкторской документации. Технические условия.
ГОСТ 3-88	Перчатки резиновые хирургические.
ГОСТ 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.
ГОСТ 3164-78	Масло вазелиновое медицинское. Технические условия.
ГОСТ 3885-73	Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор проб, фасовка и маркировка.
ГОСТ 4214-90	Бумага клеящаяся. Технические условия.
ГОСТ 6259-75	Глицерин. Технические условия.
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная.
ГОСТ 7625-86	Бумага этикеточная. Технические условия.
ГОСТ 7933-89	Картон для потребительской тары. Технические условия.
ГОСТ 9142-90	Ящики из гофрированного картона. Общие технические условия.
ГОСТ 10354-88	Полиэтилен высокого давления. Технические условия.
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.
ГОСТ 14192-96	Маркировка грузов.
ГОСТ 17768-90	Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
ГОСТ 18251-87	Лента клеевая на бумажной основе. Технические условия.
ГОСТ 18510-87	Бумага писчая. Технические условия.
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры. Технические условия.
ГОСТ Р 51088-97	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия.
ГОСТ Р 51352-99	Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний.

Име. № подл.	Подпись и дата
Име. № дубл.	
Взамен име. №	
Подпись и дата	
Име. № подл.	

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398-022-17253567-2008	Лист
						29

ГОСТ Р 51609-2000	Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования.
ГОСТ Р 51695-2000	Полиэтилентерефталат. Общие технические условия.
ЗАО «Биосан», Новосибирск, кат. № N-dA 1000	Дезоксирибоаденозин-5'-трифосфорной кислоты динатриевая соль.
ЗАО «Биосан», Новосибирск, кат. № N-dC 1000	Дезоксирибоцитидин-5'-трифосфорной кислоты динатриевая соль.
ЗАО «Биосан», Новосибирск, кат. № N-dG 1000	Дезоксирибогуанозин-5'-трифосфорной кислоты динатриевая соль.
ЗАО «Биосан», Новосибирск, кат. № N-dT 1000	Дезоксириботимидин-5'-трифосфорной кислоты динатриевая соль.
Лабораторный регламент №10, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Получение Taq-полимеразы. М., 1995 г.
Лабораторный регламент №11, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Синтез олигонуклеотидных праймеров. М., 1995 г.
Лабораторный регламент № 12, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Получение флуоресцентного олигонуклеотидного зонда, содержащего флуорофоры FAM и DABSYL. М., 2005 г.
Лабораторный регламент № 13, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Получение флуоресцентного олигонуклеотидного зонда, содержащего флуорофоры HEX и DABSYL. М., 2005 г.
Лабораторный регламент № 40, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Получение рекомбинантной плазмиды на основе вектора pGEM. М., 1996 г.
Лабораторный регламент № 53, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Получение разбавителя. М., 2005 г.
Лабораторный регламент № 95, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Получение внутреннего контроля <i>Epstein-Barr virus</i> на основе вектора pGEM. М., 2005 г.
Лабораторный регламент № 96, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	Плазмидная ДНК со встроенным фрагментом ДНК <i>Epstein-Barr virus</i> , выделенная из клеток <i>E. coli</i> , выращенных на культуральной среде. М., 2005 г.
Лабораторный регламент № 119, ООО НПФ «ЛИТЕХ»	КОЧ - контрольный образец чувствительности (образец ДНК <i>Epstein-Barr virus</i> , содержащий 10^4 геном-эквивалентов микроорганизма в 1 мл образца). М., 2005 г.

					ТУ 9398– 022 -17253567-2008	Лист 30
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата		

Име. № подл	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата		навинчивающимися крышками
					Фирма Elkay, Финляндия, кат. № 000-MICR-157	Пробирки стерильные полипропиленовые вместимостью 1,5 кл.
					Фирма Merck, Германия, кат. № 11615	Этидиума бромид.
					Фирма Millipore, США, кат. № ZPMG 23004	Установка Milli Q для производства деионизованной воды.
					Фирма QSP, США, кат. № 516	Пробирки полипропиленовые вместимостью 0,5 мл с крышками.
					Фирма QSP, США, кат. № 502- PLN	Пробирки полипропиленовые амплификационные вместимостью 0,5 мл.
					Фирма QSP, США, кат. № 519-GRD	Пробирки полипропиленовые вместимостью 2,0 мл с крышками.
					Фирма QSP, США, кат. № L-510-GRD	Пробирки полипропиленовые вместимостью 1,5 мл с замком-защелкой.
					Фирма Roche, Германия кат. № 03287343001	Пробирки полипропиленовые амплификационные вместимостью 0,2 мл
					Фирма Sigma, США, кат. № A 3059	Альбумин бычий сывороточный.
Фирма Sigma, США, кат. № A 4915	Аммония сульфат.					
					ТУ 9398- 022 -17253567-2008	Лист
						31
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата		

Фирма Sigma, США, кат. № A 9918	Агароза.
Фирма Sigma, США, кат. № C 9877	Крезолового красного натриевая соль.
Фирма Sigma, США, кат. № D 5545	Дитиотрейтол.
Фирма Sigma, США, кат. № E 9884	Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль.
Фирма Sigma, США, кат. № P 1379	Твин-20.
Фирма Sigma, США, кат. № P 3911	Калия хлорид.
Фирма Sigma, США, кат. № T 1258	Трис-(оксиметил)-аминометан ацетат.
Фирма Sigma, США, кат. № T 6791	Трис-(оксиметил)-аминометан.
Фирма Sigma, США, кат. № 960-9	Магния хлорид.
Фирма Sigma, США, кат. № 74388	Нонидет P-40.

Име. № подп	Подпись и дата	Взамен име. №	Име. № дубл	Подпись и дата

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	ТУ 9398– 022 -17253567-2008	Лист 32
------	------	----------	---------	------	-----------------------------	------------

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ И СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЯ

Наименование	Тип, разряд
Автоматический термоциклер, диапазон температур 0 - 99°C	Терцик МС2, НПФ "ДНК-Технология", Москва
ПЦР-детектор	Джин, НПФ "ДНК-Технология", Москва
Ультрафиолетовый трансиллюминатор	Фирма НПП "Биоком", Москва
Прибор для горизонтального электрофореза	SE-2, фирма "Хеликон", Москва
Микроцентрифуга 0 - 12000 об/мин (0 - 16000 g)	MiniSpin, фирма Eppendorf, Германия)
Автоматический анализатор для проведения ПЦР в«реальном времени»	COBAS TaqMan48, фирма Roche, Германия
Холодильник с морозильной камерой -18...-20°C	Минск 15М
Холодильник бытовой	ЗИЛ
Пипетки полуавтоматические одноканальные с фиксированным или переменным объемом	ТУ П52.706.003 , фирма «ТермоЭлектрон», С-Петербург
СВЧ-печь	LG, Корея
Весы аналитические 0-200 г	Фирма "Госметр", С-Петербург
Микроцентрифуга-вортекс 0-3000	FV-2400, фирма «Биосан», Латвия, Рига
Секундомер	ГОСТ 5072-79

ПРИМЕЧАНИЕ. Допускается применение оборудования другого типа, по своим характеристикам не уступающего рекомендуемому.

Име. № подл.	Подпись и дата
Взам. инв. №	Име. № дубл.
Подпись и дата	

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата
------	------	----------	---------	------

ТУ 9398- 022 -17253567-2008

Лист
33

ЛИСТ РЕГИСТРАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ

[illegible]

Имя № подп	Подпись и дата	Взамен и № дубл	Подпись и дата

TY 9398- 022 -17253567-2008

Лист:

34

Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата
------	------	----------	---------	------