

НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ВІРУСУ ЕПШТЕЙНА-БАРР

EBV DNA Quantitation (QT)

Кат. №: **EBVDNAQT.CE.25**
Кількість тестів: **25**

Дата випуску інструкції: **05-2022**
Версія: **7**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Кількісне визначення ДНК ВЕБ (QT)

ПЛР у режимі реального часу для кількісного визначення геному вірусу Епштейна-Барр

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір для **Кількісного визначення ДНК ВЕБ** методом ПЛР у режимі реального часу з кат. № **EBVDNAQT.CE.25** призначений для кількісного виявлення ДНК вірусу Епштейна-Барр у плазмі та цільній крові людини, зібраної в ЕДТА, з одночасним контролем реакції екстракції/ампліфікації за допомогою **Внутрішнього контролю (IC)**.

Аналіз EBVDNAQT.CE.25 був стандартизований відповідно до 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для ВЕБ (код NIBSC 09/260) щоб виразити концентрацію зразків також у міжнародних одиницях (МО/мл (IU/ml)).

В. ВСТУП

Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ) є поширеним γ-герпесвірусом, який вражає понад 90% населення світу, залишаючи більшість людей з невиразною інфекцією протягом усього життя. Хоча більшість первинних інфекцій ВЕБ протікає безсимптомно, вірус, в основному у осіб з ослабленим імунітетом, таких як реципієнти трансплантата та хворі на СНІД, є основним фактором, що провокує розвиток широкого спектру В-клітинних лімфопроліферативних захворювань (лімфома Беркітта, карциноми носоглотки, і не-Ходжкінські лімфоми).

Геном ВЕБ являє собою лінійну дволанцюгову молекулу ДНК з приблизно 175 парами кілобаз. Він кодує серію продуктів, які взаємодіють із різноманітними антиапоптотичними молекулами, цитокінами та перетворювачами сигналів або мають гомологію з ними, таким чином сприяючи інфекції ВЕБ, іморталізації та трансформації.

Раннє виявлення ВЕБ має вирішальне значення для ефективного лікування та внесення змін до імуносупресивної медикаментозної терапії, що може призвести до регресії проліферативного захворювання. Стратегії лікування посттрансплантаційного лімфопроліферативного розладу, пов'язаного з ВЕБ, включають зниження імуносупресії, яка часто є успішною при трансплантації суцільних органів, використання моноклональних антитіл проти В-клітин, звичайну хіміотерапію та опромінення. Сучасні методи лікування ВЕБ-асоційованих не-Ходжкінських лімфом включають хіміотерапію та променеви терапію.

Було продемонстровано, що молекулярний аналіз, такий як ПЛР-аналіз в реальному часі, є корисним інструментом для діагностики первинної інфекції ВЕБ через високу чутливість, специфічність, простий у використанні та швидкий метод.

Кількісне вимірювання ДНК ВЕБ має важливе значення для диференціації низького рівня інфекції у здорових носіїв від високого рівня, характерного для захворювання, пов'язаного з ВЕБ.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір, кат. № EBVDNAQT.CE.25, заснований на аналізі в реальному часі, що використовує специфічні Праймери та Проби.

ДНК ВЕБ, виділену з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, ампліфікують за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Ампліфікований продукт виявляють і визначають кількісно за стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для унікальної геномної послідовності ВЕБ.

Гетерологічний Внутрішній контроль (IC) служить контролем екстракції/ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації інгібіторів реакції.

Надається стандартна крива, що дозволяє визначити вірусне навантаження.

D. КОМПОНЕНТИ

Набір, кат. № EBVDNAQT.CE.25, містить реанти для 25 тестів.

Компонент	Вміст	EBVDNAQT.CE.25 25 тестів
А КОД: ALL/ММ-5 КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ПРОЗОРИЙ	Майстер-мікс	х 1 флакон/0.4 мл (ml)
В КОД: EBV/СВ КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЖОВТИЙ	Ліофілізовані Праймери/Проби	х 1 флакон (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
С КОД: ALL/С КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ	МГ Вода	х 3 флакони/1.5 мл (ml)
NTC КОД: ALL/NTC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: БІЛИЙ	Негативний контроль	х 1 флакон/1.5 мл (ml)
STD Кількісний стандарт (6.72x10 ⁴ копій/мкл (μl))	Ліофілізований Кількісний стандарт	х 3 флакони (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
І.С. Внутрішній контроль	Ліофілізований Внутрішній контроль	х 1 флакон (розчинити з об'ємом ALL/С, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладка інструкції	Інструкція по застосуванню	1

Важлива примітка: За запитом DiaPro може надати реанти для 50, 100, 150 тестів, як зазначено нижче:

1. Компонент А	х1 флакон/0.825 мл (ml)	х2 флакони/0.825 мл (ml)	х3 флакони/0.825 мл (ml)
2. Компонент В	х2 флакони	х4 флакони	х6 флаконів
3. Компонент С	х5 флаконів/1.5 мл (ml)	х4 флакони/1.5 мл (ml)	х7 флаконів/1.5 мл (ml)
4. NTC	х1 флакон/1.5 мл (ml)	х1 флакон/1.5 мл (ml)	х1 флакон/1.5 мл (ml)
5. IC	х2 флакони	х4 флакони	х6 флаконів
6. STD	х6 флаконів	х4 флакони	х6 флаконів
7. Інструкція	1	1	1
Кількість тестів	50	100	150
Код	EBVDNAQT.CE.50	EBVDNAQT.CE.100	EBVDNAQT.CE.150

E. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір EBVDNAQT.CE.25 необхідно зберігати при +2...8 °C (°C).

Після розчинення **Компонент В** (кодування EBV/СВ) і **Компонент ІС** (кодування ALL/IC) стабільні протягом 4 місяців при -20 °C (°C). Після розчинення **Компонент STD** (кодований EBV/STD) стабільний протягом 2 тижнів при -20 °C (°C). Якщо компоненти повинні використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аліквотах, слід уникати повторного розморожування та заморожування. Допускається лише одне розморожування.

F. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Відкалібровані мікродозатори (0.5 мкл (μl) < об'єм < 1000 мкл (μl)).
- Набір для екстракції ДНК.
- МГ EtOH.
- Термоблок.
- Мікроцентрифуга.
- Штативи для пробірок.
- Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
- Безнуклеазні мікропробірки.

9. 0.2 мл (ml) мікропробірки або мікропланшети для ПЛР, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
10. Одноразові рукавички без тальку.
11. Термоциклер для ПЛР у реальному часі (*).
12. Абсорбуючі паперові серветки.
13. Вортекс або подібні інструменти для змішування.

(*): **Увага:** Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

Г. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом завідувача лабораторією.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі.
7. Компоненти А і В є світлочутливими. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації стола, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не замінювалися.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або агрегатів. Якщо ні, порекомендуйте завідувачу лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці зовнішнього контейнера.
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками плазми/крові людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте позитивні матеріали (зразки, контроль та амплікони) окремо від інших реагентів і використовуйте окреме приміщення для обробки.
17. Розчиніть ліофілізовані реагенти коректною кількістю (зазначеною на етикетках) Компонента С (код: ALL/C), який постачається в наборі.
18. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше, зберігаючи компоненти на льоду або в охолоджувальному блоці.
19. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.
20. Використання одноразового пластикового посуду рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур

екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.

22. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
23. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

Н. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма або сироватка готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Не спостерігалось впливу внаслідок підготовки зразка з цитратом або EDTA.
Увага: Гепарин (≥ 10 МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР.
Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати гепаринізовані зразки пацієнтів.
3. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків.
4. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
5. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до зростання хибних результатів.
6. Плазму, якщо вона не використовується негайно, після збору необхідно аліквотувати та зберігати при -20 °C (°C). Зразки можна зберігати замороженими при температурі -80 °C (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може вплинути на результат тесту.
7. Зразки плазми для екстракції ДНК необхідно відбирати відповідно до звичайних лабораторних процедур, транспортувати та зберігати при $+2-8$ °C (°C) протягом максимум 4 годин. Зразки плазми можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або при -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду.
8. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 300 мкл (μ l)) і зберігати замороженими при -20 °C (°C) максимум 30 днів або -70 °C (°C) протягом більш тривалого періоду. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
9. Використовуючи заморожені зразки, розморожуйте їх безпосередньо перед етапом екстракції, щоб уникнути можливої деградації нуклеїнової кислоти.
10. Зразки цільної периферичної крові для екстракції ДНК повинні бути зібрані в EDTA згідно з рекомендаціями лабораторії, транспортуватися та зберігатися при $+2-8$ °C (°C) протягом максимум 3 днів. Не заморожуйте зразки цільної периферичної крові, щоб уникнути лізису клітин і втрати вірусного титру.

І. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Майстер-мікс:

Компонент А. Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі та центрифугуйте протягом короткого періоду часу, щоб зібрати весь об'єм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Праймери/Проби:

Компонент В.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

MG вода:

Компонент С. Готовий до використання.

Негативний Контроль:

NTC. Готовий до використання.

Стандартна крива:

STD.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований STD з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі розчиненим принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.
- Підготуйте 4 безнуклеазні флакони для приготування стандартної кривої.
- Налаштуйте серійне розведення STD 1:10 у Компоненті С (ALL/C), щоб отримати точки стандартної кривої, як описано в таблиці нижче:

Підготовка Стандартної кривої		
STD	Калібратор 67200 копій/мкл (µl)	Додайте об'єм Компонента С (MG вода), як написано на етикетці флакона
STD 1	6720 копій/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD) + 90 мкл (µl) Компонента С (MG вода)
STD 2	672 копії/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 1) + 90 мкл (µl) Компонента С (MG вода)
STD 3	67.2 копії/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 2) + 90 мкл (µl) Компонента С (MG вода)
STD 4	6.72 копії/мкл (µl)	10 мкл (µl) (STD 3) + 90 мкл (µl) Компонента С (MG вода)

Внутрішній контроль:

I.C.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Повністю розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його розчиненим на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЦО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікродозатори** повинні бути відкалібровані для доставки коректного об'єму, необхідного для аналізу, і піддаватися регулярній дезактивації (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%.
2. **Набір для екстракції:** Набір, кат. № EBVDNAQT.CE.25, був валідований для використання в поєднанні з Набором QIAamp DNA Mini, код: 51306 (QIAGEN), набором Nucleospin Blood, код: 740951 (Macherey Nagel) з автоматичним приладом для екстракції NucliSENS easyMAG і робочою станцією OMNIA LH 75 PRO (реагенти для екстракції постачаються з приладом). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.
3. **Термоциклери в режимі реального часу та програмне забезпечення приладів.** Набір, кат. № EBVDNAQT.CE.25, був валідований для використання в поєднанні з Термоциклерами реального часу ABI7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), CFX96 RTS, програмним забезпеченням CFX manager версія 1.7 (Biorad), системою ПЛР в режимі реального часу Gentier 96E та похідними версіями OEM, система програмного забезпечення Realab (Tianlong). Для використання набору, кат. № EBVDNAQT.CE.25, кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

Важлива примітка: Нові версії програмного забезпечення для приладів ПЛР у режимі реального часу слід валідувати для можливих потреб у налаштуваннях специфічних аналізів (див. розділ P).

M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або агрегатами, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (Вода молекулярного класу), як описано у відповідному розділі (I).
4. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтеся посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікродозатори на необхідний об'єм.
7. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
8. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

N.1 Екстракція ДНК

Крок екстракції геномної ДНК ВЕБ має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

Набори для ручної екстракції

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма/Кров	Nucleospin Blood	740951	MN™
Плазма/Кров	Набір QIAamp DNA mini®	51306	Qiagen™

Набори для автоматичної екстракції

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник	Прилад
Кров	Загальний протокол		Biomerieux	NucliSENS easyMAG

Матеріал	Опис	Виробник	Прилад
Плазма/Кров	Набір для екстракції постачається разом з приладом	Masmec	OMNIA LH 75 PRO

Виділення ДНК необхідно проводити тільки відповідно до Інструкції з експлуатації (QIAGEN™, MN™, Biomerieux, Masmec).

Важлива примітка: IC набору, кат. № EBVDNAQT.CE.25, використовується в процедурі виділення як контроль екстракції для оцінки правильності виконання процедури екстракції ДНК (див. розділ Q).

У процедурах екстракції необхідно дотримуватися використання наступних об'ємів:

Опис	Об'єм зразка мкл (µl)	Об'єм IC (мкл ((µl)))	Об'єм елювання мкл (µl)
Nucleospin Blood	200	5	100
Набір QIAamp DNA mini®	200	5	100
Система NucliSENS easyMAG	100	5	55
OMNIA LH 75 PRO	200	5	100

Не використану під час аналізу ДНК, зібрану зі зразків, слід зберігати замороженою (-20 °C (°C)/-80 °C (°C)).

Для цього застосування

- **Набір Nucleospin Blood та Набір QIAamp DNA mini:** Додайте 5 мкл (μl) І.С. до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.
- Система NucliSENS easyMAG: Додайте 5 мкл (μl) І.С. до зразка після етапу лізису та перед додаванням діоксиду кремнію (загальний протокол) або додайте 55 мкл (μl) І.С. прямо в пробірку з діоксидом кремнію (550 мкл (μl) діоксиду кремнію + 550 мкл (μl) H₂O) і розподіліть 100 мкл (μl) суміші в зразки. Дотримуйтеся інструкції з експлуатації, наданих виробником набору для екстракції.

N.2 Постановка реакції

Для налаштування ПЛР виконайте процедуру, описану в наступному параграфі.

N.2.1 Підготовка ПЛР

Важливо: Приклад схеми розподілу наведено в Розділі О. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі І.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Стандартної кривої (підготовленої, як описано в Розділі І).

Важлива примітка: Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в дублях.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Ампліфікаційну Суміш** для **Зразків, NTC та стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (І.С. як Екстракційний/Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	15 мкл (μl)	180 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	24 мкл (μl)
C	Вода MG	3 мкл (μl)	36 мкл (μl)
Загальний об'єм		20 мкл (μl)	240 мкл (μl)

N.2.2 Процедура ампліфікації

- Додайте 20 мкл (μl) Ампліфікаційної суміші в кожну реакційну пробірку або лунку мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (μl) **Зразків, NTC та стандартної кривої** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Центрифугуйте реакційні пробірки протягом короткого періоду часу при 2000 об/хв (rpm).
- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.
- Після операцій налаштування, описаних у Розділі N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

Важлива примітка: Ліофілізовані компоненти після розчинення в Компоненті С (MG вода) стабільні не більше 3 годин при зберіганні на льоду або при температурі 2-8 °C (°C). Наприкінці робочого дня належним чином викиньте залишки матеріалу Точок розведення STD. Невикористаний об'єм Компонента В, STD та І.С. можна заморозувати при -20 °C (°C) і використовувати, як описано в Розділі Е.

N.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

N.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	2 хвилини
2	1	95 °C (°C)	10 хвилин
3	50	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилина

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

N.3.2 Вибір Детекторів

Детектори слід вибирати відповідно до того, що описано в таблиці нижче, і згідно з посібниками з експлуатації використовуваних термоциклерів реального часу.

Детектори	ВЕБ	Внутрішній Контроль (IC)	Пасивний Стандарт
Прилад	Флуорофор	Флуорофор	
ABI 7500 SDS	FAM - жодного	JOE - жодного	ROX
BIORAD CFX96®	FAM	VIC	-
TIANLONG GENTIER	FAM	JOE	-

Відповідно до інструкції з експлуатації запропонованого термоциклера для визначення в режимі реального часу (ABI 7500 Applied Biosystems, BioRad CFX96, Gentier Tianlong) виберіть тип зразка та завантажте Детектори, як зазначено в таблиці нижче:

Тип зразка	STD	ЗРАЗОК (Невідомий)	STD
	Детектори	Детектори	Детектори
ВСІ ПРИЛАДИ	ВЕБ	ВЕБ IC	ВЕБ

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Слідкуйте за тим, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з відповідними налаштуваннями згідно з посібником користувача, наданого виробником.

О. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

	Мікропланшет або пробірки		
	1	2	3
A	STD 1	Зразок 4	
B	STD 2	Зразок 5	
C	STD 3	Зразок 6	
D	STD 4	Зразок 7	
E	NTC	Зразок 8	
F	Зразок 1	Зразок 9	
G	Зразок 2	Зразок 10	
H	Зразок 3	Зразок 11	

Скорочення: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива ДНК ВЕБ, Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що аналізуються.

Р. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Р.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати аналіз:

- Встановіть «Baseline/Початкові умови» (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	Автоматично встановлені початкові умови
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови
Tianlong Gentier 96E	Налаштування посилення початкових умов

– Встановіть вручну «Threshold/Попіг» флуоресценції FAM/JOE/VIC.

Можливі наступні результати:

FAM «Threshold/Попіг» флуоресценції	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.15
BIORAD™ CFX96®	300
Tianlong Gentier 96E	150

JOE/VIC «Threshold/Попіг» флуоресценції	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	0.10
BIORAD™ CFX96®	200
Tianlong Gentier 96E	100

Р.2 Аналіз даних

Перевірка калібраторів STD кривої проводиться кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити якість циклу. Необхідно виконати наступні вимоги.

Перевірка FAM	Вимоги
STD 1	Ct (Пороговий цикл) < 26.0

Перевірка FAM	Вимоги
Нахил	-3.9 < Нахил < -3.1

Перевірка FAM	Вимоги
Ефективність	R ² > 0.98

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція Внутрішнього Контролю JOE/VIC підтверджують виявлення ВЕБ, як описано в таблиці нижче:

ВЕБ FAM	Внутрішній Контроль JOE/VIC	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	24 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	24 < Ct < 40	ВІРНО
	Ct > 40 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація ДНК ВЕБ зразка (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. через конкуренцію реагентів.

**Проблеми можуть виникнути під час етапу екстракції (наявність інгібіторів або початковий зразок, що містить недостатню кількість клітин), що призводить до некоректного результату. Процедуру тестування необхідно повторити, починаючи з етапу Екстракції, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Для кожного позитивного зразка, виявленого з набором, кат. № EBVDNAQT.CE.25, можна застосувати коректне кількісне визначення вірусного навантаження ВЕБ, як зазначено в таблиці нижче:

Вірусне навантаження ВЕБ (МО/мл (IU/ml))	Інтерпретація результатів
Кількість > 5E+06	Вірусне навантаження ВЕБ > ULOQ
5E+02 ≤ Кількість ≤ 5E+06	КІЛЬКІСНА ОЦІНКА МО/мл (IU/ml) або копій/мл* (ml)
Кількість < 5E+02	Вірусне навантаження ВЕБ < LLOQ

***ВАЖЛИВА ПРИМІТКА:** Для кількісного визначення зразків див. розділ R.

ULOQ = Верхня межа кількісного визначення

LLOQ = Нижня межа кількісного визначення

Результати, отримані з набором, кат. № EBVDNAQT.CE.25, необхідно інтерпретувати з урахуванням клінічних симптомів та інших лабораторних параметрів, пов'язаних із станом пацієнта.

Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE/VIC	Результат	ПЕРЕВІРИТИ
ЗРАЗОК невідомий	+	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація ДНК ВЕБ (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. через конкуренцію реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	+/-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилки в процедурі або неправильного функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення ВЕБ і JOE/VIC для виявлення І.С.; 4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався; 6. щоб потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки; 7. щоб процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
STD	+	-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC правильний, тому що І.С. використовувався як контроль екстракції.
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в дозуванні або в процедурі	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб вибраними барвниками для виявлення були: FAM для виявлення ВЕБ; 4. щоб аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. щоб набір правильно зберігався; 6. щоб потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
NTC	-	-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	Негативний сигнал JOE/VIC є коректним, тому якщо І.С. використовувався як контроль екстракції.
NTC	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. щоб в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. щоб набір зберігався належним чином.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом завідуючого лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути передачі помилкових даних.

Якщо результати тесту співпадають з **КОРЕКТНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ АНАЛІЗУ**, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

R. КІЛЬКІСНА ОЦІНКА

Калібратори STD розглядаються як зразки пацієнтів, і той самий об'єм, 10 мкл (μl), використовується під час етапу ампліфікації.

Концентрація калібраторів STD виражається в копіях/мкл (μl).

Концентрація вірусного геному на мл (ml) для кожного зразка пацієнта розраховується за такою формулою:

$$\text{Результати (копії/мл (ml))} = \frac{\text{копії/мкл (μl) (дані запуску) x Об'єм елюйованого зразка (мкл (μl))}{\text{Об'єм екстрагованого зразка (мл (ml))}}$$

Приклад:

Результати (копії/мл (ml)) = 1500 x 100/0.2

Результати (копії/мл (ml)) = 7.5 E+05

Щоб перетворити результат вірусного навантаження зразків, виражений в копіях/мл (ml), в МО/мл (UI/ml), використовуйте відповідний коефіцієнт перетворення як зазначено в таблиці нижче:

Прилади для екстракції	Коефіцієнт перетворення	Результат (МО/мл (UI/ml)) (*)
Ручна екстракція	1.69	копії/мл (ml) ÷ 1.69
Автоматична екстракція	2.79	копії/мл (ml) ÷ 2.79

*відкалібровано за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ (код NIBSC 09/260).

5. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка робочих характеристик була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ВТС.

Оцінку робочих характеристик проводили в лабораторіях DiaPro на матеріалах, наданих референсними клінічними лабораторіями.

5.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість може бути виражена як **Межа виявлення** та як **Межа кількісного визначення**.

Межа виявлення (LOD): Це найменша кількість цільового значення, яку можна виявити з набором із заданою ймовірністю.

Для тестів АНК вона виражається як найменша концентрація **аналіту**, що за багаторазових повторів дає позитивний результат.

Межа виявлення (LOD) визначається шляхом тестування серійних розведень зразка, що містять відомі концентрації аналіту.

LOD - це найнижча концентрація аналіту, яку можна постійно виявляти (наприклад, у $\geq 95\%$ зразків у звичайних лабораторних умовах).

Для набору, кат. № EBVDNAQT.CE.25, **LOD** було визначено шляхом тестування серійних розведень (8 повторів для трьох різних запусків) 1-го міжнародного стандарту ВООЗ (код NIBSC 09/260).

Результати були проаналізовані за допомогою аналізу **Probit**, щоб визначити межу виявлення на рівні 95%.

Результати аналізу **PROBIT** є наступними:

Межа виявлення LOD (p=0.05)	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	197 МО/мл (UI/ml)
BIORAD™ CFX96®	238 МО/мл (UI/ml)
TIANLONG GENTIER 96E	127 МО/мл (UI/ml)

5.1.1 Межа кількісного визначення

Межа кількісного визначення була визначена шляхом вимірювання **лінійності, динамічного діапазону та відтворюваності**.

Лінійність - це міра ступеня наближення кривої до прямої. Вона виражається значенням **SLOPE/НАХИЛ**.

Динамічний діапазон - це діапазон концентрацій аналіту, для якого кінцеве вихідне значення (пороговий цикл Ct) системи прямо пропорційне концентрації аналіту з прийнятною правдивістю та точністю.

Межами динамічного діапазону є нижня і верхня межі кількісного визначення (**Межа кількісного визначення**).

Для набору, кат. № EBVDNAQT.CE.25, було підготовлено криву граничного розведення 1-го міжнародного стандарту ВООЗ для вірусу Епштейна-Барр (код NIBSC 09/260) з визначеними МО/мл (IU/ml). Точки розведення перевіряли в аналітичній системі та визначали їх Ct (пороговий цикл).

Верхня **межа кількісного визначення** становить $6.70 \log_{10} (5E+06 \text{ МО/мл (IU/ml)})$, а нижня межа кількісного визначення становить $2.700 \log_{10} (5E+02 \text{ МО/мл (IU/ml)})$.

***ВАЖЛИВА ПРИМІТКА:** Для кількісного визначення зразків зверніться до розділів Q і R.

5.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти та кількісно визначати тільки цільовий маркер.

Аналітичну специфічність аналізу ДНК ВЕБ вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення.
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з ВЕБ, та

програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів ВЕБ.

3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Зразки, отримані від пацієнтів, які страждають від інфекцій, викликаних потенційно інтерферуючими мікроорганізмами, були отримані з Референсного клінічного центру та протестовані.

Результати представлені в наступній таблиці:

Організм	Результат
ЦМВ	негативний
ВВВ	негативний
Вірус герпесу 8 типу	негативний
Вірус герпесу 6 типу	негативний
ВПГ-1	негативний
ВПГ-2	негативний

5.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

5.3.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що з набором буде отримано позитивний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований з набором.

Цей параметр вивчали шляхом дослідження 12 ДНК ВЕБ негативних зразків плазми і 28 ДНК ВЕБ негативних зразків цільної крові:

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	40
ХИБНОПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	40
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована **Діагностична Специфічність системи становить 100%**.

5.3.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що з набором буде отримано позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований з набором.

Для набору з кат. № EBVDNAQT.CE.25 параметр досліджували шляхом аналізу 3 ДНК ВЕБ позитивних зразків плазми та 10 ДНК ВЕБ позитивних зразків крові:

СПРАВЖНІЙ ПОЗИТИВНИЙ	13
ХИБНОНЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	13
ЧУТЛИВІСТЬ %	100

Крім того, були протестовані Панель вірусу Епштейна-Барр QCMD 2005 і QCMD 2010. Панель QCMD 2005 містить 7 позитивних зразків плазми та 1 негативний зразок плазми, панель QCMD 2010 містить 9 позитивних зразків плазми та 1 негативний зразок плазми.

На основі отриманих результатів розрахована **Діагностична Чутливість системи становить 100%**.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	100%

5.4 ТОЧНІСТЬ

Точність показує ступінь надійності системи. Кожній процедурі вимірювання властива випадкова зміна, яка називається «випадкова помилка». Випадкова помилка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання як стандартне відхилення (DevST) і коефіцієнт варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу відноситься до узгодження між повторними вимірюваннями одного і того ж матеріалу. У наборі, кат. № EBVDNAQT.CE.25, **точність** виражалася як варіабельність в аналізі та між аналізами. 4 точки розведення у 8 повторях були перевірені в одному запуску (в аналізі) і в трьох різних запусках (між аналізами).

Потім на основі отриманих результатів розраховували варіабельність в аналізі та між аналізами.

За відсутності встановлених міжнародних параметрів в Європейській IVD Директиві CTS ми визначили наступне значення прийнятності для ДНК ВЕБ:

Коефіцієнт варіації в аналізі (CV%) ≤ 10%.
Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) ≤ 10%.

Т. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворе дотримання протоколу. Зокрема, точне дозування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення та кількісного визначення ДНК ВЕБ.

Визначення ДНК ВЕБ у зразку пацієнта має значні медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.

Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

У. ЛІТЕРАТУРА

1. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive PCR. Stevens SJC, Vervoort MBHJ, van de Brule AJC, Meenhorst PL, Meijer CJLM, and Middeldorp JM. J Clin Microbiol Sept 1999: 2852-2857.
2. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. Hayden RT, Hokanson KM, Pounds SB, Bankowski MJ, Belzer SW, Carr J, Diorio D, Forman MS, Joshi Y, Hillyard D, Hodinka RL, Nikiforova MN, Romain CA, Stevenson J, Valsamakis A, and Balfour HH. J Clin Microbiol. Jan 2008: 157-163.
3. Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA. Ruiz G, Pena P, de Ory F, and Echevarria JE. J Clin Microbiol. May 2005: 2053-2057.
4. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, and Human Herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, Ono Y, Ando H, Fujimoto Y, Kiuchi T, Kojima S, Nishiyama Y, and Kimura H. J Clin Microbiol. May 2007: 1426-1432.
5. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. Carbone A, Gloghini A, Dotti G. The Oncologist 2008; 13: 577-585.
6. Current understanding of the role of Epstein-Barr virus (EBV) in lymphomagenesis and therapeutic approaches to EBV-associated lymphomas. Cohen JI, Bollard CM, Khanna R, and Pittaluga S. Leuk Lymphoma 2008; 49 (Suppl 1): 27-34.

СИМВОЛИ

ПОЯСНЕННЯ УМОВНИХ ЗНАКІВ			
	Каталоговий номер		Температура зберігання
	Виріб медичного призначення		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
	Знак відповідності CE		Дата виготовлення

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO
 Diagnostic Bioprobes Srl
 Via G. Carducci n° 27
 20099 Sesto San Giovanni
 (Milano) - Italy
 Phone +39 02 27007161
 Fax +39 02 44386771
 e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО
 Діагностік Біопробс s.r.l.
 вул. Г. Кардуччі, 27
 20099 Сесто Сан Джованні
 Мілан (MI) Італія
 тел.: +39 02 2700 7161
 факс: +39 02 44386771
 e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
 вул. Симона Петлюри, 25
 м. Івано-Франківськ, 76014
 тел.: +38 (0342) 775 122
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

