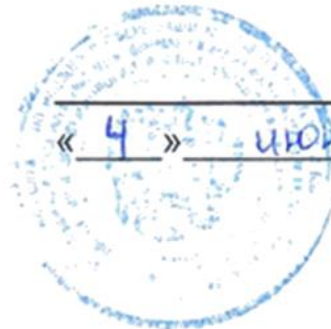


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

В.Г. Акимкин



« 4 » июля 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® ННУ7-скрин/монитор-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 3 |
| НАЗНАЧЕНИЕ | 3 |
| ПРИНЦИП МЕТОДА | 4 |
| ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ | 5 |
| АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 6 |
| ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ | 10 |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ | 11 |
| СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ | 13 |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ..... | 14 |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.. | 17 |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК | 19 |
| ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА | 20 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 21 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ..... | 21 |
| ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)..... | 23 |
| СОСТАВ..... | 23 |
| АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» | 23 |
| А. Подготовка проб для амплификации..... | 23 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»..... | 25 |
| В. Анализ и интерпретация результатов | 26 |
| ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L) | 31 |
| СОСТАВ..... | 31 |
| АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» | 31 |
| А. Подготовка проб для амплификации..... | 31 |
| Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» | 32 |
| В. Анализ и интерпретация результатов | 34 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ..... | 39 |
| ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ | 39 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ..... | 41 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|--|--|
| ВКО-FL | - экзогенный внутренний контрольный образец |
| ВКО Glob | - эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека) |
| ГЭ | - геномные эквиваленты |
| ДНК | - дезоксирибонуклеиновая кислота |
| дНТФ | - дезоксирибонуклеозидтрифосфат |
| K1, K2 | - ДНК-калибраторы |
| K- | - отрицательный контроль ПЦР |
| ОК | - отрицательный контроль экстракции |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| ПК | - положительный контроль экстракции |
| ПКО | - положительный контрольный образец |
| ПО | - программное обеспечение |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| РУ | - регистрационное удостоверение |
| УДГ | - урацил-ДНК-гликозилаза |
| ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора | - Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека |
| FL | - ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией |
| FRT | - флуоресцентная детекция в режиме «реального времени» |
| ВГЧ-7 (HHV7) | - вирус герпеса человека 7 |

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® HHV7-скрин/монитор-FL предназначен для количественного определения ДНК вируса герпеса человека 7 (*Human betaherpesvirus 7*, ВГЧ-7, HHV7) в биологическом материале (плазма крови, цельная кровь, слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговая жидкость) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекцию, вызванную ВГЧ-7, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания. Противопоказания отсутствуют, за исключением

случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК экзогенного и эндогенного ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Экстракция ДНК проводится в присутствии экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. В качестве эндогенного внутреннего контроля используется участок ДНК β -глобинового гена человека (ВКО Glob), который позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала, его транспортировки и хранения. Являясь участком генома человека, ДНК ВКО Glob должна всегда присутствовать в биологическом материале, содержащем клетки человека (цельная кровь и мазки со слизистой оболочки ротоглотки).

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК ВГЧ-7 возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между логарифмом исходной концентрации ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, *Ct*). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени, аттестованными по методике Изготовителя. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

| Канал для флуорофора | FAM | JOE | ROX |
|----------------------|---|-----------------|---|
| ДНК-мишень | ДНК участка β-глобинового гена (ВКО Glob) | ДНК ВГЧ-7 | ДНК ВКО-FL |
| Область амплификации | β-глобиновый ген | <i>MCP</i> -ген | Искусственная нуклеотидная последовательность |

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон измерения и предел обнаружения

Таблица 2

| Вид исследуемого материала | Транспортная среда | Объем образца для экстракции, мкл | Комплект для экстракции ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Предел обнаружения, копий/мл | Диапазон измерения, копий/мл |
|--|--|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Плазма крови | — | 100 | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | 200 | 500 – 1x10 ⁷ |
| | — | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |
| | — | 200 | «МАГНО-сорб» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | | |
| | — | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |
| Цельная кровь | — | 100 | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | | |
| | — | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |
| Слюна | — | 100 | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | | |
| | — | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |
| Мазки со слизистой оболочки ротоглотки | «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» | 100 | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | | |
| | | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |
| Спинно-мозговая жидкость | — | 100 | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | | |
| | — | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |
| | — | 200 | «МАГНО-сорб» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN | | |
| | — | | | «ПЦР-комплект» вариант FRT-L | | |

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие,

транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участок ДНК ВГЧ-7 (клинический образец, содержащий ДНК ВГЧ-7 в концентрации не менее 10^4 копий/мл, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также ДНК человека:

- Штаммы *Human gammaherpesvirus* 4 NIBSC №09/260, *Human polyomavirus* 1 NIBSC №14/212, *Human polyomavirus* 2 NIBSC №14/114, *Primate erythroparvovirus* 1 NIBSC № 99/802, *Human betaherpesvirus* 5 NIBSC № 09/162 из коллекции NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, UK) в концентрации не менее 5×10^5 МЕ/мл;
- Штаммы *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™ из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^7 копий/мл;
- Клинические изоляты панели штаммов и изолятов, находящейся в распоряжении ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: *Enterovirus* spp., *Human alphaherpesvirus* 1, *Human alphaherpesvirus* 2, *Human alphaherpesvirus* 3, *Human betaherpesvirus* 6A, *Human betaherpesvirus* 6B, *Rubella virus*, *Human respiratory syncytial virus*, *Human metapneumovirus*, *Human parainfluenza virus* types 1-4, *Human coronavirus* (NL-63, 229E, HKU-1, OC43), *Human rhinovirus*, *Human adenovirus* B, C, E, *Human bocavirus*, *Influenza virus* A, *Influenza virus* B в концентрации не менее 1×10^4 копий/мл;
- ДНК человека, производства Sigma-Aldrich, США, в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих веществах указана в

разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования образцов негативной плазмы крови, в которых предварительно не была выявлена ДНК ВГЧ-7, а затем был добавлен стандартный образец предприятия, содержащий ДНК ВГЧ-7, до конечных концентраций ДНК ВГЧ-7 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 копий/мл (см. табл. 3, 4).

Таблица 3

Повторяемость

| АмплиСенс® HNV7- скрин/монитор- FL | Комплект для экстрак- ции | Выяв- ляемый патоген | Исходное значение концент- рации, копий/мл | Коли- чество повто- ров | Среднее значение концентра- ции, lg | Стандарт- ное отклонение (SD) | Кoeffи- циент вариа- ции (CV), % |
|---|------------------------------------|----------------------------|--|----------------------------------|---|--|--|
| Форма 1 | «РИБО- преп» | ВГЧ-7 | 1×10^6 | 10 | 5,9 | 0,03 | 0,4 |
| | | | 1×10^5 | 10 | 5,0 | 0,02 | 0,5 |
| | | | 1×10^4 | 10 | 4,0 | 0,04 | 0,9 |
| | «МАГНО- сорб» | ВГЧ-7 | 1×10^6 | 10 | 6,1 | 0,03 | 0,5 |
| | | | 1×10^5 | 10 | 5,3 | 0,08 | 1,4 |
| | | | 1×10^4 | 10 | 4,2 | 0,09 | 2,1 |
| Форма 2 | «РИБО- преп» | ВГЧ-7 | 1×10^6 | 10 | 6,0 | 0,03 | 0,6 |
| | | | 1×10^5 | 10 | 4,9 | 0,06 | 1,3 |
| | | | 1×10^4 | 10 | 4,1 | 0,08 | 2,0 |
| | «МАГНО- сорб» | ВГЧ-7 | 1×10^6 | 10 | 6,1 | 0,04 | 0,7 |
| | | | 1×10^5 | 10 | 5,1 | 0,06 | 1,2 |
| | | | 1×10^4 | 10 | 4,0 | 0,08 | 1,9 |

Таблица 4

Воспроизводимость

| АмплиСенс® HNV7- скрин/монитор-FL | Комплект для экстракции | Выяв- ляемый патоген | Исходное значение концентрации, копий/мл | Количество повторов | Среднее значение концентрации, lg | Стандартное отклонение (SD) | Кoeffициент вариации (CV), % |
|---|-------------------------------|----------------------------|---|------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Форма 1 | «РИБО- преп» | ВГЧ-7 | 1x10 ⁶ | 80 | 6,0 | 0,08 | 1,3 |
| | | | 1x10 ⁵ | 80 | 5,0 | 0,10 | 2,1 |
| | | | 1x10 ⁴ | 80 | 4,0 | 0,09 | 2,3 |
| | «МАГНО- сорб» | ВГЧ-7 | 1x10 ⁶ | 80 | 6,1 | 0,14 | 2,4 |
| | | | 1x10 ⁵ | 80 | 5,1 | 0,20 | 4,0 |
| | | | 1x10 ⁴ | 80 | 4,1 | 0,16 | 4,0 |
| Форма 2 | «РИБО- преп» | ВГЧ-7 | 1x10 ⁶ | 80 | 6,1 | 0,12 | 2,0 |
| | | | 1x10 ⁵ | 80 | 5,1 | 0,15 | 3,0 |
| | | | 1x10 ⁴ | 80 | 4,0 | 0,14 | 3,4 |
| | «МАГНО- сорб» | ВГЧ-7 | 1x10 ⁶ | 80 | 6,1 | 0,10 | 1,6 |
| | | | 1x10 ⁵ | 80 | 5,0 | 0,12 | 2,5 |
| | | | 1x10 ⁴ | 80 | 4,0 | 0,10 | 2,4 |

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах, на разных сериях набора реагентов.

Правильность

Правильность была определена путем тестирования образцов негативной плазмы крови, в которых предварительно не была выявлена ДНК ВГЧ-7, а затем был добавлен стандартный образец предприятия, содержащий ДНК ВГЧ-7, до конечной концентрации 1,3x10⁶ копий/мл (см. табл.5).

Таблица 5

Правильность

| АмплиСенс® HNV7- скрин/монитор-FL | Количество повторов | Среднее значение измерения, lg | Установленное значение, lg | Систематическая погрешность (B), % |
|---|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| Форма 1 | 25 | 6,00 | 6,00 | 0,00 |
| Форма 2 | 25 | 6,04 | 6,00 | 0,67 |

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы образцы биологического материала детей с первичной инфекцией в возрасте от года до трех лет с подтвержденным диагнозом по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ 10): B08.2 Экзантема внезапная (шестая болезнь), а именно: 180 образцов цельной крови, 180 образцов слюны и 180 мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Для подтверждения диагностической чувствительности в спинномозговой жидкости и образцах плазмы крови были протестированы по 180 негативных образцов с добавлением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК ВГЧ-7, до концентраций ДНК ВГЧ-7 от 500 до 1×10^7 копий/мл.

Для подтверждения диагностической специфичности использовано по 180 образцов плазмы крови, цельной крови, слюны, мазков со слизистой оболочки ротоглотки условно-здоровых доноров крови, а также 180 образцов спинномозговой жидкости пациентов без вирусной инфекции.

В качестве референтного метода использовалась система QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР (QX100 droplet digital PCR) (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, РУ № ФСЗ 2012/13278).

Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

**Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® HHV7-скрин/монитор-FL
в сравнении с референтным методом**

| Вид исследуемого материала | Результаты применения АмплиСенс® HHV7-скрин/монитор-FL | | Результаты применения референтного метода | |
|--|--|---------------|---|---------------|
| | | | положительных | отрицательных |
| Плазма крови | Всего исследовано 360 образцов | положительных | 180 | 0 |
| | | отрицательных | 0 | 180 |
| Цельная кровь | Всего исследовано 360 образцов | положительных | 180 | 0 |
| | | отрицательных | 0 | 180 |
| Слюна | Всего исследовано 360 образцов | положительных | 180 | 0 |
| | | отрицательных | 0 | 180 |
| Мазки со слизистой оболочки ротоглотки | Всего исследовано 360 образцов | положительных | 180 | 0 |
| | | отрицательных | 0 | 180 |
| Спинномозговая жидкость | Всего исследовано 360 образцов | положительных | 180 | 0 |
| | | отрицательных | 0 | 180 |

Таблица 7

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® HHV7-скрин/монитор-FL**

| Вид исследуемого материала | Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %) | Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %) |
|--|--|---|
| Плазма крови | 100 (98,3 – 100) % | 100 (98,3 – 100) % |
| Цельная кровь | 100 (98,3 – 100) % | 100 (98,3 – 100) % |
| Слюна | 100 (98,3 – 100) % | 100 (98,3 – 100) % |
| Мазки со слизистой оболочки ротоглотки | 100 (98,3 – 100) % | 100 (98,3 – 100) % |
| Спинномозговая жидкость | 100 (98,3 – 100) % | 100 (98,3 – 100) % |

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г,

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
4. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green Vac-Tube, Green Cross Medical Science Corporation («Грин Кросс Медикал Сайнс Корпорейшн»), Корея).
5. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green-Vac[®], Shina Corporation («Шина Корпорейшн»), Корея).
6. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичная).
7. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша, или аналогичная).
8. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

9. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (ПУ № ФСР 2010/09505) для предобработки цельной периферической и пуповинной крови.
10. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
14. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
15. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
16. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
17. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
19. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

20. Комплект реагентов для экстракции ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции «Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция ДНК из исследуемых образцов») – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
21. Комплект реагентов для экстракции ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции «Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция ДНК из исследуемых образцов») – «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265).
22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

23. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 FN:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
24. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
26. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
27. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
28. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
29. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
30. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

31. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
32. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма крови,
- цельная кровь,
- слюна,
- мазки со слизистой оболочки ротоглотки,
- спинномозговая жидкость.

Плазма крови

Для получения образцов плазмы крови взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку с ЭДТА (специальная вакуумная система типа «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6% EDTA)). После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого центрифугируют пробирки с цельной кровью при 3 тыс об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре. Полученную плазму отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 5 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев.
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Цельная кровь

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку с ЭДТА (специальная вакуумная система типа «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6% EDTA)). После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть

вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом.

Допускается хранение образцов до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 72 ч с момента взятия материала.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Слюна

Перед получением слюны следует провести полоскание полости рта водой. Слюну забирать в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл или в пластиковые стерильные контейнеры объемом 50-60 мл в количестве не менее 0,5 мл.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие мазка проводят при помощи сухого стерильного зонда с тампоном вращательными движениями с поверхности небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия мазка рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Аккуратно обламывают полистирольную палочку на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставляют рабочую часть зонда с биологическим материалом в пробирке. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 72 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Спинномозговая жидкость

Спинномозговую жидкость получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Взятие спинномозговой жидкости в количестве не менее 1 мл проводят в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом не менее 2 мл или контейнеры.

Допускается хранение образцов до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Допускается транспортирование образцов цельной крови, плазмы крови, мазков со слизистой оболочки ротоглотки при температуре от 2 до 8 °С в течение 72 часов, образцов слюны и спинномозговой жидкости при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 часов.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы крови, слюны, мазки со слизистой оболочки ротоглотки и спинномозговой жидкости не требуют предварительной подготовки.

Образцы цельной крови требуют предварительной подготовки.

Отобрать 250 мкл цельной крови в одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Добавить 1 мл «Гемолитика». Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10-15 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, оставив 100 мкл осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку «Гемолитиком».

Полученный осадок должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции комплектом «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно).

Допускается хранение предобработанных образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 6 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 6 месяцев;
- при температуре не выше 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (плазма крови, цельная кровь, слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговая жидкость), используемом для исследования (см. табл. 8).

Были протестированы образцы без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего

вещества указана в табл. 8. Все образцы (плазма крови, цельная кровь, слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговая жидкость) содержали стандартный образец предприятия с концентрациями ДНК ВГЧ-7 1×10^5 и 2×10^2 копий/мл.

Таблица 8

| Вид исследуемого материала | Вид потенциального интерферента | Потенциальный интерферент | Протестированная концентрация в образце | Наличие интерференции |
|---|----------------------------------|---------------------------|---|-----------------------|
| Плазма крови, цельная кровь | Эндогенные вещества | Общий билирубин | 210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л) | Не обнаружено |
| | | Общий холестерин | 78 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л) | Не обнаружено |
| | | Триглицериды | 37,0 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л) | Не обнаружено |
| | | Гемоглобин | 250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л) | Не обнаружено |
| | Экзогенные вещества ⁴ | Калия ЭДТА | до 2,0 мг/мл | Не обнаружено |
| | | Лития гепарин | от 12 МЕ/мл | <u>Обнаружено</u> |
| Слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки | Экзогенные вещества | Хлоргексидин | 0,5 % | Не обнаружено |
| | | Стоматофит® | 1,5 % | Не обнаружено |
| | | Мирамистин® | 0,001 % | Не обнаружено |
| Спинно-мозговая жидкость | Эндогенные вещества | Глюкоза | 10 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,89 ммоль/л) | Не обнаружено |
| | | Лейкоциты | 500 кл/мм ³ (верхняя граница нормы – 20 кл/мм ³) | Не обнаружено |

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

⁴ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» – для экстракции ДНК из плазмы крови, цельной крови, слюны, мазков со слизистой оболочки ротоглотки и спинномозговой жидкости в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов,
- «МАГНО-сорб» – для экстракции ДНК из плазмы крови и спинномозговой жидкости в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ПКО HNV7** и **90 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку (подробнее см. в инструкции к комплекту «МАГНО-сорб»).

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **20 мкл ПКО HNV7** и **180 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN – комплект реагентов для амплификации участка ДНК ВГЧ-7 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

| Реагент | Описание | Объем, мл | Количество |
|--------------------------|---|-----------|------------|
| ПЦР-смесь-FL <i>HHV7</i> | Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета | 1,2 | 1 пробирка |
| ПЦР-буфер-Н | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| К1 <i>HHV7</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| К2 <i>HHV7</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| К– | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| ВКО-FL | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |
| ОКО | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 2 пробирки |
| ПКО <i>HHV7</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *HNH7*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *HNH7*** и **ПЦР-буфером-Н**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL *HNH7***, **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *HNH7*** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **ДНК-калибратор K1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл K1 *HNH7***.
 - б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл K2 *HNH7***.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
 - г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ПКО *HNH7*.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 9).

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ типа

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|---|-------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | – | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM, JOE, ROX | |

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 10

| Канал для флуорофора | FAM | JOE | ROX |
|----------------------|--------------|-----------|------------|
| Продукт амплификации | ДНК ВКО Glob | ДНК ВГЧ-7 | ДНК ВКО-FL |

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВГЧ-7, ДНК человека (ВКО Glob) и ДНК ВКО-FL в копиях/реакцию. Полученные значения используются для расчета количества копий ДНК ВГЧ-7 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО-FL в реакцию}} \times A \times B = \text{копий/мл}$$

где:

A – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

B – число копий ВКО в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

Полученные значения концентрации ДНК ВГЧ-7 (при экстракции из цельной крови) могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВГЧ-7 на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВГЧ-7 производят согласно формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК человека в реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-7 на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно определенного количества клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента B указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов АмплиСенс® *HNV7*-скрин/монитор-FL путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

| Результат | Интерпретация |
|--|---|
| Невалидный | Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК |
| Невалидный (при исследовании цельной крови) | Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование |
| Невалидный (при исследовании мазков со слизистой оболочки ротоглотки) | Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование |
| ДНК ВГЧ-7 не обнаружена | Значение <i>Ct</i> для ДНК ВГЧ-7 отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение <i>Ct</i> меньше граничного |
| менее 500 копий ДНК ВГЧ-7/мл | ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов. |
| X x 10 ^y копий ДНК ВГЧ-7/мл | ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов. |
| более 1x10 ⁷ копий ДНК ВГЧ-7/мл | ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К– (например, в 10 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца |

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат количественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

| Конт- роль | Контролиру- емый этап ПЦР-иссле- дования | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>) | | |
|---------------|---|--|--|--|
| | | FAM | JOE | ROX |
| ПК | Экстракция ДНК | <u>определено</u> меньше граничного | <u>определено</u> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон | <u>определено</u> меньше граничного |
| ОК | Экстракция ДНК | отсутствует | отсутствует | <u>определено</u> меньше граничного |
| К- | ПЦР | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| К1 | ПЦР | <u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация |
| К2 | ПЦР | <u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация |

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* и диапазон концентрации ПКО *HNVT* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
2. Рассчитанная концентрация ПКО *HNVT* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо

- предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК;
- б) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участка ДНК ВГЧ-7 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

| Реагент | Описание | Объем, мл | Количество |
|---------------------------|--------------------------------|-----------|----------------------------|
| ПЦР-смесь <i>HHV7-Lyo</i> | Порошок белого цвета | — | 96 пробирок объемом 0,2 мл |
| <i>K1 HHV7</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| <i>K2 HHV7</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| <i>K-</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| <i>ВКО-FL</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 | 1 пробирка |
| <i>ОКО</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 2 пробирки |
| <i>ПКО HHV7</i> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью *HHV7-Lyo*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированной с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K1 HNV7**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K2 HNV7**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО HNV7**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 13).

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного⁷ и планшетного⁸ типа**

| Цикл | Температура, °С | Время | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
|------|-----------------|--------|---|-------------------|
| 1 | 50 | 15 мин | – | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | – | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | – | 45 |
| | 60 | 20 с | FAM, JOE, ROX | |

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁷ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁸ Например, CFX 96 (Bio-Rad), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Изготовителем.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 14

| Канал для флуорофора | FAM | JOE | ROX |
|----------------------|--------------|-----------|------------|
| Продукт амплификации | ДНК ВКО Glob | ДНК ВГЧ-7 | ДНК ВКО-FL |

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВГЧ-7, ДНК человека в копиях/реакцию и ДНК ВКО-FL в копиях/реакцию. Расчет количества ДНК ВГЧ-7 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов проводится по формуле:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО-FL в реакцию}} \times A \times B = \text{копий/мл}$$

где:

A – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

B – число копий ВКО в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

При экстракции ДНК из образцов цельной крови полученные значения концентрации ДНК ВГЧ-7 могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВГЧ-7 на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВГЧ-7 производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК человека в реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-7 на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

Примечание – Нормированные значения концентраций

отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента В указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов АмплиСенс® *HNVT*-скрин/монитор-FL путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 15

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

| Результат | Интерпретация |
|---|--|
| Невалидный | Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК |
| Невалидный (при исследовании цельной крови) | Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию, и отсутствуют значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование |
| Невалидный (при исследовании мазков со слизистой оболочки ротоглотки) | Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию, и отсутствуют значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование |
| ДНК ВГЧ-7 не обнаружена | Значение <i>Ct</i> для ДНК ВГЧ-7 отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение <i>Ct</i> меньше граничного |
| менее 500 копий ДНК ВГЧ-7/мл | ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов |
| $X \times 10^y$ копий ДНК ВГЧ-7/мл | ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов |
| более $1,0 \times 10^7$ копий ДНК ВГЧ-7/мл | ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К- (например, в 10 раз) и |

| Результат | Интерпретация |
|-----------|---|
| | повторить тестирование. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца |

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 16 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 16

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

| Конт-роль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t) | | |
|-----------|--------------------------------------|--|--|---|
| | | FAM | JOE | ROX |
| ПК | Экстракция ДНК | <u>определено</u> меньше граничного | <u>определено</u> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон | <u>определено</u> меньше граничного |
| ОК | Экстракция ДНК | отсутствует | отсутствует | <u>определено</u> меньше граничного |
| К– | ПЦР | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| К1 | ПЦР | <u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация |
| К2 | ПЦР | <u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация | <u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация |

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
- Рассчитанная концентрация ПКО *HNVT* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - б) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует

участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить в холодильных камерах при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *HNH7*. ПЦР-буфер-Н и ПЦР-смесь-FL *HNH7* хранить в морозильных камерах при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *HNH7* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *HNH7*-Lyо хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹⁰.

¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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

Заведующий НПЛ ОмДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению