«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«23» декабря 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
(РеалБест ДНК Borrelia miyamotoi
(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*»** предназначен для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов **«РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100»** или **«РеалБест экстракция 1000»**,

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналогами.

Набор реагентов **«РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*»** может быть применён в клинической практике для анализа клинического материала *(образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, мочи, биоптатов, синовиальной жидкости, ликвора)*, а также для исследования клещей.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для данных участков ДНК *Borrelia miyamotoi* гибридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'–3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

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

Учёт эффективности выделения ДНК *Borrelia miyamotoi* из образцов обеспечивается выделением ДНК из клинических проб совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)**.

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) − на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагмента ДНК *Borrelia miyamotoi* − 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 фл. по 4 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

- плёнкой оптической – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** – выявление 100 копий ДНК *Borrelia miyamotoi* в стандартном образце предприятия *(СОП рег. № 05-2-489)* – 100%.

3.2. **Специфичность** выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* по стандартной панели предприятия отрицательных сывороток *(СПП ОКС рег. № 05-2-214)* – 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность**: клинические исследования, проведённые в двух независимых учреждениях на 40 положительных образцах *(суспензиях клещей)*, показали 100% чувствительность *(доверительный интервал 93%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

3.4. **Диагностическая специфичность**: клинические исследования, проведённые в двух независимых учреждениях на 40 отрицательных образцах *(суспензиях клещей)*, показали 100% специфичность *(доверительный интервал 93%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б *(Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4)*.

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III−IV групп патогенности *(опасности)* и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I−IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ-ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной

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

очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (*фирма «Bio-Rad», США*), ДТ-96 (*«НПФ ДНК-Технология», Россия*) или их аналоги;
- ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (*фирма «Ламинарные системы», Россия*);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия)*;
- термошейкер, оснащенный термоблоком для пробирок вместимостью 2 мл и позволяющий проводить встряхивание при 600–1300 об/мин и температуре 60–90 °С *(«Thermo Shaker TS-100», фирма «BioSan», Латвия; или аналогичный)*;
- пипетки полуавтоматические *(дозаторы механические)* одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками *(фирма «Biohit», Финляндия)*;
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» с регулируемой скоростью вращения *(«Bio-Vortex V-1 plus», фирма «BioSan», Латвия; или аналогичный)*;
- медицинский отсасыватель *(В40, фирма «Висма-Планар», Беларусь; или аналогичный)*;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия)*;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером *(фирма «Biohit», Финляндия)*;
- магнитный штатив для пробирок на 2 мл *(АО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный)*;
- штативы для пробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»; или аналогичный)*;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл *(фирма «SSI», США, кат. № 2340; или аналогичные)*;
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (*фирма «Axygen», США, кат. № PCR-02-C или аналогичные*).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала *(образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, мочи, биоптатов, синовиальной жидкости, ликвора)* с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100»** или **«РеалБест экстракция 1000»** в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО **и отрицательный контрольный образец (ОКО)**, который является компонентом набора для выделения ДНК.

Подготовка суспензий клещей см. **Приложение 1**.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 2 суток.

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18–60) °С до 3-х месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке *(не вскрывая!)* при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО*

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

и 1 ПКО) пробирок ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой, избегая преждевременного вскрытия и повреждения краёв пробирок с ГРС.

Внимание! *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС сразу упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим!*

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °С составляет 3 месяца.

7.2. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли)* пробирок с ГРС для ПЦР пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! *Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!*

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной ДНК**. Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов **ДНК *Borrelia miyamotoi***, **ДНК ВКО** и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Задать протокол проведения амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 миуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации **ДНК *Borrelia miyamotoi*** и **ДНК ВКО**:

– для регистрации результатов амплификации **ДНК ВКО** следует выбрать канал детекции **«FAM»**;

– для регистрации результатов амплификации **ДНК *Borrelia miyamotoi*** следует выбрать канал детекции **«ROX»**.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой **«РеалБест диагностика»** программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учёт результатов проводить в соответствии с **разделом 9** данной инструкции и **Приложением 2**.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В **ПКО** программа должна фиксировать:

нарастание сигнала амплификации **ДНК *Borrelia miyamotoi*** в канале **«ROX»** и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** в канале **«FAM»** и определять значение порогового цикла **Ct ВКО**.

9.2. В **ОКО** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** в канале **«FAM»** и определять значение порогового цикла **Ct** ВКО. При этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации ДНК *Borrelia miyamotoi* в канале **«ROX»**.

9.3. **В каждом исследуемом образце** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** канал **«FAM»** и определять **Ct** ВКО.

9.4. Вычислить (**Ct** ВКО)$_{ср}$ как среднее значение **Ct** ВКО всех анализируемых образцов *(включая ПКО и ОКО)*. Отбраковке подлежат значения **Ct** ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения (**Ct**

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

ВКО)$_{ср}$. После отбраковки пересчитать (**Ct** ВКО)$_{ср}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается **отрицательным**, не содержащим ДНК возбудителя инфекции, если для этого образца значение **Ct** в канале **«ROX» больше 40 или не определяется.**

Если для такого образца значение **Ct** ВКО отличается от значения (**Ct** ВКО)$_{ср}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК *(в случае исследования клеща – провести выделение из аликвоты оставшейся суспензии клеща).*

9.6. Анализируемый образец считается **положительным**, содержащим **ДНК *Borrelia miyamotoi,*** если для этого образца значение **Ct** в канале **«ROX» меньше или равно 40.**

9.7. Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

*По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест ДНК Borrelia miyamotoi»,** следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:*
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30;
тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;

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

- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Подготовка суспензий клещей.

Оборудование для подготовки суспензий клещей:

- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты *(например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»)*;
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл *(«Хеликон», Россия)*;
- штатив-холодильник IsoFreeze двусторонний SSI-5610-43 или штатив плавающий SSI-5100-43 *(SSI, США)*;
- хладоэлемент или ёмкость со льдом;

металлические пестики для измельчения клещей *(АО «Вектор-Бест», Россия, кат. № Е-9259)*.

Исследуемых клещей поместить в пронумерованные пробирки типа Eppendorf объёмом 1,5 мл.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (масло, бензин и т.п.), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку (см. пункт а). В случае, если клещ не загрязнён, можно сразу приступить к приготовлению суспензии (см. пункт б).

а) Предварительная промывка клещей: Добавить в каждую пробирку с клещом **300 мкл 96% этанола**, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, не касаясь клеща, используя отдельные наконечники для каждой пробы. Далее внести в пробирки по **500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия**, встряхнуть пробирки на шейкере и сбросить капли со стенок пробирок коротким центрифугированием; удалить жидкость из пробирок с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, используя отдельные наконечники для каждой пробы.

б) Приготовление суспензии клещей:

Внимание! *Для предотвращения деградации нуклеиновых кислот (НК), выделяемых из клеща, следует избегать нагревания анализируемого образца до температуры выше 8°С на всех стадиях приготовления суспензий клещей. При подготовке клещей к анализу следует использовать предварительно охлаждённый до температуры (2–8) °С РПО.*

Метод 1: Заморозить пробирки с клещами в жидком азоте (*не менее 5 минут*). Достать одну замороженную пробирку и сразу тщательно измельчить клеща, с помощью отдельного стерильного пестика, совмещая вращательные движения с надавливанием. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку **250 мкл охлаждённого РПО**. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере *(5–10 секунд)*. Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать **100 мкл суспензии для выделения НК** и проведения анализа.

Метод 2: В пробирки с клещами внести по **30 мкл раствора РПО** *(в случае анализа напитавшихся клещей, клещей больших размеров внести по 50 мкл РПО)*. Поместить пробирки в охлаждённый до минус (20–30) °С штатив-холодильник или штатив плавающий *(с предварительно сформированными лунками)*, и выдержать в морозильной камере не менее 20 минут при минус (20–30) °С. Далее поместить штатив с анализируемыми образцами в ёмкость со льдом или на хладоэлемент. Достать одну пробирку с клещом, замороженным в РПО, и максимально быстро, не дожидаясь оттаивания раствора, тщательно измельчить клеща с помощью отдельного стерильного пестика. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку **200 мкл охлаждённого РПО**. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в

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

дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере *(5–10 секунд)*. Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать **100 мкл суспензии для выделения НК** и проведения анализа.

Выдержать пестики в дезинфицирующем растворе не менее 2 часов, промыть водой и протереть салфеткой, смоченной 70% этиловым спиртом. Перед работой металлическую часть каждого пестика прокалить над пламенем спиртовки.

Выделение НК из клещей проводить с помощью набора **«РеалБест экстракция 100»** согласно инструкции.

Хранение клещей и образцов суспензий клещей:

– при температуре (2–8) °С – в течение 1 суток;
– при температуре минус (18–60) °С – в течение 2 недель;
– при температуре ниже минус 60 °С – длительно (до 1 года).

Транспортировка клещей и образцов суспензий клещей должна осуществляться в специальных термоконтейнерах с хладоэлементом, термосах с термопакетами, льдом.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Проведение анализа на приборе «ДТ-96»

(НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений:

В режиме **«Работа с прибором»** в меню **«Настройки»** выберите пункт **«Экспозиция измерений»**.

В открывшемся окне выберите канал **«FAM»**, измените значение экспозиции на **«250»**, для каналов **«HEX»** и **«ROX»** установите значение экспозиции **«1000»**. Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав **«ДА»**.

Внимание! *Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.*

2. Программирование амплификатора:

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку **«Создать»** во вкладке **«Запуск программы амплификации»**.

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов **«РеалБест ДНК»:**

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
2 стадия: 95 °С – 2 минуты;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

Для наборов **«РеалБест РНК»:**

1 стадия: 45 °С – 30 минут;
2 стадия: 94 °С – 1 минута;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд).*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

2.3. В ячейке **«Имя программы»** ввести название созданного протокола амплификации *(например, PCR и RT-PCR)* и нажать **«ОК»**. В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать **«сохранить»**.

2.4. В ячейке **«Объём рабочей смеси»** указать значение **«50»**.

2.5. Во вкладке **«Протокол»** сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню **«Тест»** выбрать **«Создать / редактировать тест»**, затем **«Копировать текущий тест»** с именем TEST и присвоить

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

имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте **«1.Анализ»** выставить тип анализа *(количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором)* и метод **«Геометрический (Ср)»**.

Для качественного анализа в пункте **«4.Контроли»** выставить «1»; для количественного анализа со стандартами *(при постановке с КО1, КО2)* в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** выставить «2», в ячейке **«2.Дубли»** – «3», в пункте **«4.Контроли»** в ячейке **«$К^+$»** выставить «3», в ячейке **«$К^-$»** – «1».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** поставить «0».

В пункте **«5.Объём рабочей смеси в пробирке»** выставить значение «50».

В пункте **«6. Флуорофоры»** обозначить **внутренний контроль (ВК)** по каналу **«FAM»** и специфику по каналу **«HEX»** или **«ROX»** в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать **«ОК»**.

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку **«Добавить тест»**, из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать **«Применить»**.

2.6. Программа перейдет на вкладку **«Запуск программы амплификации»**, запустить амплификацию кнопкой **«Запуск программы»**. Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «**Запуск программы**» в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «**FAM**» и «**ROX**» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу **Геометрический (Ср)**.

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число	i	Обратитесь к Инструкции по применению
!	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

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