«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» января 2022 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Anaplasma phagocytophilum*,
ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
(РеалБест ДНК Anaplasma phagocytophilum/
Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis (комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*»** предназначен для выявления ДНК *Anaplasma phagocytophilum* (*возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека* (ГАЧ)), ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* (*возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека* (МЭЧ)), выделенных из биологических проб с помощью набора **«РеалБест экстракция 100»** методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

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

Набор реагентов **«РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*»** может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: образцов цельной крови, сыворотки *(плазмы)* крови, биоптатов, ликвора и суспензии 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 специфического фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе метода ПЦР в режиме реального времени лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается 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'-экзонуклеазной активности Taq-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 возбудителей инфекций в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК *Anaplasma*

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

phagocytophilum, ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* из клинического материала или суспензий клещей совместно с предварительно внесенным **внутренним контрольным образцом (ВКО).**

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 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:

- стрипированными крышками для пробирок или оптической плёнкой – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** – выявление 100 копий ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. **Специфичность** выявления ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, ДНК *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis (по стандартной панели предприятия образцов контрольных сывороток крови (СПП ОКС)* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а *(ГОСТ Р 51609-2000)*.

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, исследующих 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 предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов 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»)*.

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналог;
- ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (АО «Ламинарные системы», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5-2 мл («Eppendorf MiniSpin», «Eppendorf», Германия; или аналогичная);
- 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»,

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

«BioSan», Латвия; или аналогичный);
- встряхиватель для пробирок типа «Вортекс» с регулируемой скоростью вращения («Bio-Vortex V-1 plus», «BioSan», Латвия; или аналогичный);
- медицинский отсасыватель (В40, «Висма-Планар», Беларусь; или аналогичный);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками («Ленпипет», Россия; «Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- пестик металлический (АО Вектор-Бест, Россия; или аналогичный);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ («FinTip», Финляндия; «ТермоЭлектрон», Россия; или аналогичные);
- магнитный штатив для пробирок на 2 мл (АО Вектор-Бест, Россия; или аналогичный);
- штативы для пробирок вместимостью 1,5-2 мл и 0,25 мл («SSI», США; «Хеликон», Россия);
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл («SSI», США или аналогичные);
- контейнер с дезинфицирующим раствором («контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-Проект», Россия; или аналогичный), позволяющий осуществлять бесконтактный сброс наконечников со шланга отсасывателя
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа могут быть использованы: лейкоцитарная фракция человека, сыворотка *(плазма)* крови, биоптат, суспензия клещей.

6.2. Подготовка образцов клещей.

Исследуемых клещей, либо пулы клещей *(до 10 голодных – не пивших особей; до 3 пивших клещей) рода Ixodes* поместить в пронумерованные пробирки типа Eppendorf объёмом 1,5 мл. Клещей *рода Dermacentor* исследовать индивидуально.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей *(масло, бензин и т.п.)*, перед приготовлением суспензии следует провести их промывку *(см п. 6.2.1)*. В случае анализа не пивших клещей можно сразу приступить к приготовлению суспензии клещей *(см п. 6.2.2)*.

6.2.1. Предварительная промывка клещей.

Добавить в каждую пробирку с клещом **300 мкл** *(500 мкл при анализе пулов)* **96% этанола**, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью пипетки 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 центрифугированием при 7000 об/мин 15 секунд; удалить жидкость из пробирок с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя.

6.2.2. Приготовление суспензии клещей.

Для приготовления суспензий клещей следует использовать раствор РПО, входящий в состав набора.

Метод 1: Заморозить пробирки с клещами в жидком азоте *(минимум 5 минут)* или морозильной камере при температуре минус (50–80) °С в течение 20 минут. Достать одну замороженную пробирку и сразу тщательно растереть клеща *(пул клещей)*, прижимая материал ко дну пробирки с помощью отдельного стерильного пестика. Для этой процедуры удобно использовать металлические пестики производства АО «Вектор-Бест» *(Россия)*.

Для приготовления суспензии к измельченному образцу, не вынимая пестика, добавить раствор РПО:

– 250 мкл – в случае одиночного клеща *рода Ixodes*;

– 500 мкл – в случае одиночного клеща *рода Dermacentor*;

– 500 мкл – при гомогенизации пула клещей.

После проведения процедуры гомогенизации поместить пестик в дезинфицирующий раствор, вы-

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

держать не менее 2 часов, промыть водой, протереть салфеткой, смоченной 70% этиловым спиртом, и дать пестику высохнуть. Перед работой металлическую часть пестика прокалить над пламенем спиртовки.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере в течение 5–10 секунд. Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Центрифугированием при 10000 об/мин 15 секунд сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать для выделения НК **100 мкл суспензии клещей** рода ***Ixodes*** или **50 мкл суспензии клещей** рода ***Dermacentor***.

Выделение ДНК из клещей проводить с помощью набора **«РеалБест экстракция 100»** согласно инструкции. На заключительном этапе выделенную НК образца растворить в **200 мкл элюирующего раствора**.

Метод 2: В пробирки с клещами рода *Ixodes* внести по **20 мкл раствора РПО** *(в случае анализа пивших клещей, больших размеров, клещей рода Dermacentor или пулов клещей внести 30–50 мкл РПО так, чтобы раствор покрывал их).* Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок, поместить пробирки в охлажденный до минус 20 °С штатив-холодильник и заморозить в морозильной камере при температуре минус 30 °С в течение 20 минут. Далее поместить штатив с анализируемыми образцами в ёмкость со льдом либо на охлаждённый хладоэлемент, или на термоизолирующую поверхность *(например, пенопласт).* Достать одну пробирку с клещом *(пулом клещей),* замороженным в РПО, и максимально быстро, не дожидаясь растаивания раствора, тщательно измельчить клеща с помощью отдельного стерильного пестика.

Далее порядок действий аналогичен описанным выше в методе 1, за исключением того, что при доведении объёма суспензии раствором РПО необходимо сделать поправку на объём РПО *(20–50 мкл)*, первоначально внесённый в пробирку для измельчения клеща.

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

6.3. Подготовка лейкоцитарной фракции.

В пробирку типа «Eppendorf» внести **1,5–2,0 мл цельной крови**, взятой с раствором ЭДТА, и центрифугировать в течение 10 минут при 800 об/мин; собрать верхний слой плазмы *(~500 мкл)* с лейкоцитами, перенести его в другую чистую пробирку и центрифугировать при 13000 об/мин в тече-ние 10 минут; удалить основную часть надосадочной жидкости, а осадок клеток и 200 мкл оставшейся на дне жидкости использовать для выделения НК с помощью набора **«Реал-Бест экстракция 100»** согласно инструкции.

6.4. Подготовка ликвора.

Спинномозговую жидкость *(1–1,5 мл)* центрифугируют при 13000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносят в контейнер с дезраствором, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости используют для выделения НК с помощью набора **«Реал-Бест экстракция 100»** согласно инструкции.

6.5. Хранение материала.

Клещей предпочтительно хранить в живом виде при температуре (2–8) °С во влажной среде в течение 1 недели. Подготовленный материал *(суспензии клещей)* хранить при температуре (2–8) °С в течение 2 часов.

В замороженном виде клещей и суспензии клещей хранить при температуре минус (18–60) °С в течение 2 недель; при температуре минус 60 °С *(и ниже)* не более 12 месяцев.

Внимание! *Допускается однократное замораживание-оттаивание образцов!*

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке *(не вскрывая!)* при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с готовой реакционной смесью. Отрезать

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

пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

Внимание! *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС 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 контрольные образцы)* пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! *Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Крышки или оптическая плёнка должны оставаться чистыми!*

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК** (*из пробирок, установленных в магнитный штатив*).

Плотно заклеить пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

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

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации **ДНК *Anaplasma phagocytophilum***, **ДНК *Ehrlichia muris*** и ***Ehrlichia chaffeensis*** и **ВКО**:

– для регистрации процесса амплификации **ДНК ВКО** следует выбрать канал детекции «**FAM».**

– для регистрации процесса амплификации **ДНК *Anaplasma phagocytophilum*** следует выбрать канал детекции «**HEX**».

– для регистрации процесса амплификации **ДНК *Ehrlichia muris*** и ***Ehrlichia chaffeensis*** следует выбрать канал детекции «**ROX».**

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

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов ПЦР в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой **«РеалБест диагностика»** *(программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).*

При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора и в соответствии с **Приложением**.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

– нарастание сигнала амплификации **ДНК *Anaplasma phagocytophilum*** *(канал «HEX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

– нарастание сигнала амплификации ДНК ***Ehrlichia muris*** и ***Ehrlichia chaffeensis*** *(канал «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определять значение порогового цикла **Ct ВКО**.

9.2. В **ОКО** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определять **Ct ВКО**, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам **«ROX» и «HEX»**.

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

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

9.5. Анализируемый образец считается **положительным**, содержащим ДНК *Ehrlichia muris* и/или *Ehrlichia chaffeensis*, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40**.

9.6. Анализируемый образец считается **положительным**, содержащим ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«HEX» меньше или равно 40**.

9.7. Результат анализа образца считается **отрицательным**, если для этого образца значение **Ct** по каналам **«ROX» и «HEX» больше 40 или не определяется.**

9.8. Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«ROX»** или **«HEX» 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, 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. Замораживание компонентов набора не допускается.

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

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

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, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:*

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58,
тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.
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;

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

- 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;
- 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

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 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

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

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) 334-35-90.

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