«УТВЕРЖДАЮ»

Главный технолог
Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио»

_____М. Ю. Сорокина
«23» октября 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ДНК вируса простого герпеса (*HSV*) и цитомегаловируса (*CMV*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro

«АмплиПрайм® *HSV / CMV*»

АмплиПрайм®

ООО «НекстБио»,
Российская Федерация, 111394,
город Москва, улица Полимерная, дом 8, стр. 2

IVD

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 24
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 25
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 25
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 26
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100) 28
  СОСТАВ 28
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 28
    А. Подготовка пробирок для амплификации 28
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 29
    В. Анализ и интерпретация результатов 31
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 2 и 3 («ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 или FEP-100-0,5) 37
  СОСТАВ 37
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» 37
    А. Подготовка пробирок для амплификации 37
    Б. Проведение амплификации 39
    В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке» 39
    Г. Интерпретация результатов 40
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 4 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN) 43
  СОСТАВ 43
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 43
    А. Подготовка пробирок для амплификации 43
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 44
    В. Анализ и интерпретация результатов 46
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 5 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L) 52
  СОСТАВ 52
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 52
    А. Подготовка пробирок для амплификации 52
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 53
    В. Анализ и интерпретация результатов 55
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 6 (комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN) 61
  СОСТАВ 61
  АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 62
    А. Подготовка пробирок для амплификации 62
    Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 63
    В. Анализ и интерпретация результатов 64
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 70
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 71
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 72
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 73

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
К1, К2	- ДНК-калибраторы
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» предназначен для качественного (формы комплектации набора 1, 2, 3, 4, 5, 6) и количественного определения (формы комплектации набора 1, 4, 5, 6) ДНК вируса простого герпеса (*HSV*) и цитомегаловируса (*CMV*) в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), ротоглотки, конъюнктивы; моча, слюна, секрет предстательной железы, цельная кровь, плазма крови, ликвор; отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек человека) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на герпесвирусную или цитомегаловирусную инфекцию вне зависимости от формы и стадии заболевания.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL[1]) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется либо непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», либо после окончания ПЦР (детекция по «конечной точке») – с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора.

Количественное определение ДНК *HSV* и *CMV* возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией 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 совместно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Концентрацию ДНК *HSV* и *CMV* возможно определить в двух вариантах. В **первом варианте** определяются абсолютные значения концентраций ДНК микроорганизмов, отражающие количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в 1 мл биологического образца (ГЭ/мл). **Второй вариант** расчета концентрации применим для биологического материала, содержащего клетки человека, и требует проведения

[1] ВКО-FL входит в состав комплектов реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ». При использовании комплектов реагентов для экстракции «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» и «АмплиПрайм РИБО-преп» необходимо использовать дополнительный реагент ВКО-FL, который не входит в состав данных комплектов реагентов.

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

параллельного тестирования пробы ДНК с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованного Производителем. Во втором варианте рассчитываются нормированные значения концентрации ДНК микроорганизмов, отражающие количество клеток микроорганизмов относительно клеток слизистой оболочки человека.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится 3 реакции – амплификация участков ДНК *HSV* и *CMV*, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *HSV* и *CMV*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 3 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**
ДНК-мишень	ДНК *HSV*	ДНК *CMV*	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	*gpB* gene	*Pol gene*	искусственно синтезированная последовательность

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 (пробирки 0,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,5 (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L.

Форма 6 включает комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-

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

комплект» вариант FRT-100 FN.

Формы комплектации 1, 4, 5 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном и количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 4 может быть использована совместно с автоматическими станциями приготовления реакционных смесей.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 6 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и позволяет выявлять ДНК в качественном и количественном формате.

Форма комплектации 6 может быть использована совместно с автоматическими станциями пробоподготовки и приготовления реакционных смесей.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность и линейный диапазон

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл[2]	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100 FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
				CMV	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$

[2] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ):
– в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы, отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек человека), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл;
– в пересчете на 1 мл образцов мочи, слюны, секрета предстательной железы, цельной крови, плазмы крови и ликвора.

[3] Форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ».

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

	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ЭДЭМ»[4]	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$5x10^3$	–
				CMV	$5x10^3$	–
отделяемое слизистых оболочек ротоглотки, конъюнктивы	АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
				CMV	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ЭДЭМ»[4]	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$5x10^3$	–
				CMV	$5x10^3$	–
моча	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$2x10^3$	$4x10^3 – 1x10^7$
				CMV	$2x10^3$	$4x10^3 – 1x10^7$
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ЭДЭМ»[4]	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$1x10^4$	–
				CMV	$1x10^4$	–
слюна	–	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
				CMV	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
секрет предстательной железы	–	АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$2x10^3$	$4x10^3$ - $1x10^7$
				CMV	Не используется[5]	
отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек	АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
				CMV	Не используется[5]	
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»[3]	«АмплиПрайм ЭДЭМ»[4]	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$5x10^3$	–
				CMV	Не используется[5]	
цельная кровь	–	«АмплиПрайм® ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	$5x10^3$	$1x10^4 – 1x10^7$
				CMV	$5x10^3$	$1x10^4 – 1x10^7$
плазма крови	–	«АмплиПрайм РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*HSV*	Не используется[5]	
				CMV	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$
ликвор	–	«АмплиПрайм РИБО-преп»	ПЦР-комплект» вариант	*HSV*	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$

[4] Используется только при качественном определении.

[5] Выявление данного микроорганизма в указанном виде биоматериала не имеет клинического значения.

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

			FEP-100, FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	*CMV*	$1x10^3$	$2x10^3 – 1x10^7$

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая чувствительность в отношении каждого из микроорганизмов сохраняется и в присутствии высокой концентрации ДНК другого анализируемого микроорганизма – до 10^9 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *EBV; HHV 6 и 7 типов; HPV; Gardnerella vaginalis; Lactobacillus spp.; Escherichia coli; Staphylococcus aureus; Streptococcus pyogenes; Streptococcus agalactiae; Candida albicans; Candida glabrata; Candida krusei; Mycoplasma hominis; Ureaplasma urealyticum; Ureaplasma parvum; Mycoplasma hominis; Mycoplasma genitalium; Neisseria flava; Neisseria subflava; Neisseria sicca; Neisseria mucosa; Neisseria gonorrhoeae; Chlamydia trachomatis; Treponema pallidum; Trichomonas vaginalis; Toxoplasma gondii*, а также геномной ДНК человека.

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

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования модельного образца биоматериала. Модельный образец биоматериала был приготовлен разведением стандартного образца предприятия в трех диапазонах концентраций (от $2x10^3$ до $5x10^3$, $1x10^4$ до $5x10^4$, от $1x10^5$ до $5x10^5$ ГЭ/мл) в биологическом материале, не содержащем ДНК каких-либо других возбудителей инфекций органов репродукции.

Правильность была определена путем тестирования стандартного образца предприятия в концентрации 5 х 10^4 ГЭ/мл.

Таблица 3

Воспроизводимость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
HSV	от $2x10^3$ до $5x10^3$	80	3,51	0,05	1,50
CMV		80	3,48	0,14	4,13
HSV	от $1x10^4$ до $5x10^4$	80	4,60	0,05	1,17
CMV		80	4,61	0,05	1,09
HSV	от $1x10^5$ до $5x10^5$	80	5,55	0,07	1,33

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

CMV		80	5,53	0,11	1,99

Таблица 4

Повторяемость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
HSV	от $2x10^3$ до $5x10^3$	40	3,53	0,04	1,20
CMV		40	3,55	0,03	0,76
HSV	от $1x10^4$ до $5x10^4$	40	4,56	0,04	0,94
CMV		40	4,61	0,02	0,38
HSV	от $1x10^5$ до $5x10^5$	40	5,48	0,02	0,36
CMV		40	5,47	0,01	0,26

Таблица 5

Правильность

Микроорганизм	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение	Систематическая погрешность (B)	
				lg	%
HSV	100	4,69	4,73	0,05	0,85
CMV	100	4,55	4,64	0,08	1,94

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 6

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV»* в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*»		Результаты применения референтного метода[6]			
			HSV		*CMV*	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	Всего исследовано 600 образцов	**положительных**	107	2	114	1
		отрицательных	1	490	1	484
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	Всего исследовано 250 образцов	**положительных**	115	1	101	2
		отрицательных	1	133	1	146
отделяемое конъюнктивы	Всего исследовано 300 образцов	**положительных**	103	1	101	1
		отрицательных	1	195	1	197
моча	Всего исследовано 400 образцов	**положительных**	110	2	112	1
		отрицательных	1	287	1	286
слюна	Всего исследовано 250 образцов	**положительных**	117	1	119	1
		отрицательных	1	131	1	129
секрет предстательной железы	Всего исследовано 600 образцов	**положительных**	105	2	0	0
		отрицательных	1	492	0	600
цельная кровь	Всего	**положительных**	100	0	100	0

[6] В качестве референтного метода использовались наборы реагентов «АмплиСенс® *HSV* I, II-FL» (РУ № ФСР 2007/00827), «АмплиСенс® *CMV*-FL» (РУ № ФСР 2012/13532).

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

	исследовано 250 образцов	**отрицательных**	0	150	0	150
плазма крови	Всего исследовано 250 образцов	**положительных**	0	0	100	0
		отрицательных	0	250	0	150
ликвор	Всего исследовано 250 образцов	**положительных**	100	0	100	0
		отрицательных	0	150	0	150
отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек	Всего исследовано 150 образцов	**положительных**	124	1	0	0
		отрицательных	1	24	0	150

Были использованы 600 образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, 250 образцов отделяемого слизистой оболочки ротоглотки, 300 образцов отделяемого конъюнктивы, 400 образцов мочи, 600 образцов секрета предстательной железы, 250 образцов слюны, 150 образцов отделяемого пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек, полученных от пациентов с подозрением на герпесвирусную или цитомегаловирусную инфекцию. При проведении исследований биоматериала цельной крови, плазмы крови и ликвора были использованы предварительно собранные для каждого биоматериала 100 образцов, содержащие ДНК *HSV,* и 100 образцов, содержащие ДНК *CMV*, а также 50 образцов каждого биоматериала, не содержащих ДНК данных вирусов.

Таблица 7

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*»

Тип образцов	**Диагностическая чувствительность[7] (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %**		**Диагностическая специфичность[8], (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %**	
	HSV	***CMV***	***HSV***	***CMV***
отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	97,2	97,0	98,5	98,5
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	97,2	97,0	98,5	98,5
отделяемое конъюктивы	97,0	97,0	98,5	98,5
моча	97,2	97,0	98,5	98,5
слюна	97,0	97,0	98,5	99,5
секрет предстательной железы	97,1	–	98,1	98,9
цельная кровь	97,6	97,6	98,4	98,4
плазма крови	–	97,7	99,0	98,1
ликвор	97,9	97,8	98,3	98,4

[7] Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.
[8] Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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

отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек	97,4	–	97,4	98,6

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 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого,

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

поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром[9]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- 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 контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

[9] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

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

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ» (РУ № ФСР 2012/14205), «Транспортная среда для мазков «АмплиПрайм ТС» (РУ № ФСР 2012/14203), «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» (форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ») (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.
2. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРМЕД», Россия или аналогичный).
3. Зонд «Юнона» цитощетка (например, ЗАО «Медицинское предприятие Симург», Республика Беларусь или аналогичная).
4. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
5. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
6. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований in vitro (например, Green-Vac®,

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

Shina Corporation, («Шина Корпорейшн»), Корея).

7. Система вакуумного забора крови (например, Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичная).
8. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша).

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

9. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Лабораторная микроцентрифуга (например, MiniSpin с принадлежностями, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), США, или аналогичный).
11. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

12. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» вариант 100С (РУ № ФСР 2012/14204), «АмплиПрайм ЭДЭМ» (форма комплектации 1 или 2) (РУ № ФСР 2012/14018), «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» вариант 100 (РУ № ФСР 2012/14019), «АмплиПрайм РИБО-преп» вариант 100 (РУ № ФСР 2012/14017) или другие рекомендованные Производителем.
13. Реагенты ВКО-FL и ОКО (ООО «НекстБио», Россия) – при использовании комплектов реагентов для экстракции «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» и «АмплиПрайм РИБО-преп».
14. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

<u>При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» совместно с автоматическими станциями для экстракции НК:</u>

15. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
16. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
17. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или одноразовые 96-луночные планшеты (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – для элюции.
18. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до

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

200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

19. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
20. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
21. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
22. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
24. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) или аналогичная).
25. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя.
26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
27. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
28. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

<u>При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» в случае ручной методики экстракции НК:</u>

29. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
30. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
31. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
32. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
33. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
34. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
35. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
36. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
37. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan,

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

Латвия, или аналогичный).

38. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).
39. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
40. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
41. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
42. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

43. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.), США или аналогичные).
44. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл, или 0,2 мл, или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.), США или аналогичные).
45. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
46. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
47. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
48. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
49. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
50. Емкость для сброса наконечников.

<u>При проведении детекции «по конечной точке»:</u>

51. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), MaxyGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США) и другие рекомендованные Производителем).
52. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (АЛА-1/4) (SIA BioSan, Латвия), «Джин» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и другие рекомендованные Производителем).

<u>При проведении детекции в режиме «реального времени»:</u>

53. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплектом» FRT-100 FN:
    1) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – для

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

приготовления реакционной смеси;

2) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
3) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, 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.

54. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 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 Производителем).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры),
- отделяемое слизистой оболочки ротоглотки (мазки, соскобы),
- отделяемое конъюнктивы (мазки),
- моча (осадок первой порции утренней мочи),
- секрет предстательной железы,
- слюна,
- цельная кровь,
- плазма крови,
- ликвор,
- отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек (мазки, соскобы).

Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде

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

слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Доступ к цервикальному каналу обеспечить с помощью одноразового или многоразового стерильного гинекологического зеркала. Взятие материала провести с помощью цервикальной цитощетки или универсального зонда в пробирку с транспортной средой. При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном, затем ввести рабочую часть цитощетки/зонда в цервикальный канал и сделать два-три полных оборота по часовой стрелке. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови. Извлечь цитощетку/зонд и поместить рабочую часть, содержащую взятый материал, в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощетки/зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть цитощетки или универсального зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с их рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой

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

транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

У женщин получение отделяемого уретры проводить с помощью уретрального зонда в пробирку с транспортной средой.

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища. Ввести рабочую часть зонда в уретру, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое уретры на рабочую часть зонда. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

У мужчин перед взятием соскоба из уретры обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Провести массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удалить их сухим тампоном. Ввести зонд в уретру на глубину 1–2 см. Несколькими вращательными движениями провести соскоб эпителиальных клеток. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови и гноя. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой, рабочую часть зонда с материалом обломить и оставить в пробирке. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки (соскобы) со слизистой оболочки ротоглотки

Мазки забирать сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе

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

вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки с конъюнктивы

Материал забирать сухим стерильным ватным тампоном на пластиковой основе под местной анестезией (2 капли раствора декаина). Оттянув нижнее веко, вращающими движениями провести зонд 4-5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Моча

У женщин для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер объемом 50-60 мл.

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

Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50–60 мл.

Допускается хранение образцов мочи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Слюна

Перед получением слюны следует провести трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирать в одноразовые сухие стерильные пробирки на 2 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток.

Секрет предстательной железы

Перед получением секрета предстательной железы головку полового члена обработать стерильным ватным тампоном. Секрет простаты забрать после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5–1 мл собрать в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объемом 2 мл или стерильный сухой контейнер объемом 50–60 мл.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл (см. порядок забора мочи).

Допускается хранение образцов секрета предстательной железы до проведения

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

ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Цельная кровь

Взятие крови следует производить натощак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в специальную вакуумную систему типа «Vacuette®» с раствором ЭДТА или цитрата натрия. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Условия хранения материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала для количественного определения и в течение 12 часов – для качественного определения;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Плазма крови

Взятие крови проводится утром натощак в пробирку с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают и хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч. Пробирку с цельной кровью центрифугируют 20 мин при 800 - 1600 g при комнатной температуре. Полученную плазму переносят в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл.

Условия хранения материала:

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

Спинномозговая жидкость (ликвор)

Спинномозговую жидкость (ликвор) получают с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части

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

крышки, и промаркировать.

Условия хранения и транспортирования материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки, соскобы с пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек

С пораженных участков удалить корочку и собрать материал с помощью зонда-тампона. При наличии везикул покрышку удалить стерильной иглой, и собрать содержимое везикулы с помощью зонда-тампона. Зонд-тампон перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда-тампона следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда-тампона!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы мазков (соскобов) со слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы; образцы слюны, секрета предстательной железы, цельной крови, плазмы крови и ликвора; отделяемого пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки. Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 минут при 10 тыс g (например, 12 тыс. об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова

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

концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить транспортную среду, до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов мочи до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации. 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.

Непригодными для исследования являются:

- образцы мочи и секрета предстательной железы, собранные ранее 24 часов от момента доставки в лабораторию;
- образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

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» или по «конечной точке»,
- анализ и интерпретация результатов.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» для экстракции ДНК из отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта; образцов мочи, секрета предстательной железы, в соответствии с **приложением 1**;
- «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» для экстракции ДНК из отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы; образцов мочи, слюны, секрета предстательной железы, отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «АмплиПрайм ЭДЭМ» для экстракции ДНК из отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы; образцов мочи, отделяемое пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из цельной крови, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «АмплиПрайм РИБО-преп» для экстракции ДНК из плазмы крови и ликвора в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! При проведении количественного ПЦР-исследования недопустимо использование комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»:

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

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

Объем элюции – **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в **250 мкл буфера для элюции В**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ»:

ВНИМАНИЕ! Добавление ВКО-FL в исследуемые образцы и контроли не требуется.

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл транспортной среды ТС-ЭДЭМ**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL[10].

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО[10].

Объем элюции – 50 мкл.

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

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL[10].

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО[10].

Объем элюции – 50 мкл.

[10] При экстракции ДНК с помощью комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» и «АмплиПрайм РИБО-преп» необходимо использовать дополнительные реагенты ВКО-FL и ОКО, которые не входят в состав данных комплектов реагентов.

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

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

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 для амплификации фрагментов ДНК *HSV* и *CMV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь *HSV / CMV* раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью *HSV / CMV*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью *HSV / CMV***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

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

4. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К1 complex**.

2) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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. 8, 9)[11].

Таблица 8

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[12] и планшетного[13] типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	**50**	15 мин	–	1

[11] Программы амплификации (табл. 8, 9) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
[12] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[13] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

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, помимо указанных в таблице, назначается и по другим используемым каналам. 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.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[12]			**Приборы планшетного типа[13]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	**20 с**	5	**95**	**20 с**	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	**20 с**	40	**95**	**20 с**	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE** и **ROX**. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

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

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *HSV*	ДНК *CMV*	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 (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов.

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)			**Результат**
FAM	**JOE**	**ROX**	
отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК *HSV* и *CMV* **НЕ обнаружены**
определено	отсутствует	не учитывается	ДНК *HSV* **обнаружена**
отсутствует	определено	не учитывается	ДНК *CMV* **обнаружена**
отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	**Невалидный***

***** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

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

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

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов качественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет количества геномных эквивалентов ДНК *HSV* и *CMV* в 1 мл исследуемых и контрольных образцах.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 13

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного, при этом значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена	Значение *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE

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

	отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается, как **ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена**.
менее 2 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 2 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов: отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы, слюны, отделяемого пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»; а также образцов плазмы крови и ликвора, при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп».
менее 4 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 4 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов мочи и секрета предстательной железы при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО».
менее 1 х 10^4 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 1 х 10^4 ГЭ/мл** для образцов цельной крови при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В».
X х 10^y ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается, как **ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации X х 10^y ГЭ/мл**.
более 1х10^7 ГЭ/мл	ДНК *HSV* и *CMV* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более 1 х 10^7 ГЭ/мл**.

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

Относительные (нормированные) значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентрации ДНК *HSV* и *CMV* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *HSV* (*CMV*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентрации ДНК *HSV* и *CMV*

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

необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *HSV* и *CMV* производят согласно формуле:

число ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл / **число ГЭ ДНК человека в 1 мл**	**x 10^5 =**	**число ГЭ *HSV* (*CMV*) на10^5 клеток человека**

где:

- «число ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 14

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
   1) 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 ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
   2) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %.

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

Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует 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.

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

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 2 и 3 («ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 или FEP-100-0,5)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 или FEP-100-0,5 для амплификации фрагментов ДНК *HSV* и *CMV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «по конечной точке» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь *HSV / CMV* раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-буфер-А-Фон[14]	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР[15, 16]	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью *HSV / CMV*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 6), а также двух образцов «Фон». Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.
2. Приготовить образцы **«Фон»**. Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью *HSV /***

[14] Реагент используется при исследовании проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов для экстракции «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» и «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО».
[15] Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология»).
[16] Реагент входит только в состав «ПЦР-комплекта» вариант FEP-100-0,5.

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

CMV на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-буфера-А-Фон**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.[17]

ВНИМАНИЕ! Реагент **ПЦР-буфер-А-Фон** используется при исследовании проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» и «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО». При использовании других комплектов реагентов для экстракции ДНК, рекомендованных Производителем, необходимо следовать инструкции к используемому набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, той же серией комплекта реагентов для экстракции и того же типа ПЦР-пробирок.

3. В пробирки для исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью *HSV / CMV***.
4. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.[17]
5. Внести в подготовленные пробирки (кроме пробирок с образцами «Фон») 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 сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить контрольные реакции:
   а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.
   б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной

[17] Только при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FEP-100-0,5.

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

смесью внести **10 мкл К–**.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл.15).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 15

Программа амплификации

	Для амплификаторов группы 1[18]			**Для амплификаторов группы 2[19]**			**Для амплификаторов группы 3[20]**		
Цикл	**Темпе-ратура, °С**	**Время**	**Кол-во циклов**	**Темпе-ратура, °С**	**Время**	**Кол-во циклов**	**Темпе-ратура, °С**	**Время**	**Кол-во циклов**
0	**95**	Пауза		**95**	Пауза		**95**	Пауза	
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	2 с	35	**95**	20 с	20	**95**	2 с	24
	65	5 с		**65**	25 с		**65**	10 с	
	72	5 с		**72**	30 с		**72**	10 с	
3	**95**	2 с	9	**95**	20 с	24	**95**	2 с	20
	60	10 с		**60**	30 с		**60**	15 с	
	72	5 с		**72**	30 с		**72**	10 с	
4	**95**	2 с	1	**95**	20 с	1	**95**	2 с	1
	60	10 с		**60**	30 с		**60**	15 с	
5	**10**	Хранение		**10**	Хранение		**10**	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 16

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *HSV*	ДНК *CMV*	ДНК ВКО-FL

[18] «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие рекомендованные Производителем.
[19] GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applera Corporation) и другие рекомендованные Производителем.
[20] MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие рекомендованные Производителем.

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

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов.)

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам детекции. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Таблица 17

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			**Результат**
FAM	**JOE**	**ROX**	
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения	ДНК *HSV* и *CMV* **НЕ обнаружены**
Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Не учитывается	ДНК *HSV* **обнаружена**
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	Не учитывается	ДНК *CMV* **обнаружена**
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	**Невалидный***
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Не учитывается	Не учитывается	**Сомнительный****
Не учитывается	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Не учитывается	**Сомнительный****

***** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае повторения аналогичного результата образец считать

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

положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать отрицательным.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения флуоресцентных сигналов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 18 и пороговыми значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 18

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения
К–	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения
К+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения

Возможные ошибки

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE ниже порогового значения положительного результата и/или сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX ниже порогового значения. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
   1) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. 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 ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;

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

2) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX отсутствует или ниже порогового значения. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (K–) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX выше порогового значения положительного результата. 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 ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

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

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 4 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК *HSV* и *CMV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь *HSV / CMV*	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

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 пробирок 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 *HSV / CMV*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (см. контрольные реакции в п. 7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью *HSV / CMV*** и **ПЦР-буфером-Н**,

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

осадить капли на вортексе.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси *HSV / CMV*** 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 сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К1 complex**.

2) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

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

детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 19, 20)[21].

Таблица 19

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[22] и планшетного[23] 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, помимо указанных в таблице, назначается и по другим используемым каналам. 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.

Таблица 20

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[22]			**Приборы планшетного типа[23]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	**20 с**	5	**95**	**20 с**	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	**20 с**	40	**95**	**20 с**	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

[21] Программы амплификации (табл. 19, 20) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
[22] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[23] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE** и **ROX**. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
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! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 21

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *HSV*	ДНК *CMV*	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 (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов.

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

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

Таблица 22

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)			**Результат**
FAM	**JOE**	**ROX**	
отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК *HSV* и *CMV* **НЕ обнаружены**
определено	отсутствует	не учитывается	ДНК *HSV* **обнаружена**
отсутствует	определено	не учитывается	ДНК *CMV* **обнаружена**
отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	**Невалидный***

***** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат качественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 23 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 23

Результаты для контролей различных этапов качественного ПЦР-исследования

Контроль	**Контролируемый этап ПЦР-исследования**	**Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)**		
		FAM	**JOE**	**ROX**
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений количества геномных эквивалентов ДНК *HSV* и *CMV* в 1 мл исследуемых и контрольных образцах.

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

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 24

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного, при этом значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена	Значение *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается, как **ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена**.
менее 2 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 2 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов: отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы, слюны, отделяемого пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»; а также образцов плазмы крови и ликвора, при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп».
менее 4 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 4 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов мочи и секрета предстательной железы при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО».
менее 1 х 10^4 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 1 х 10^4 ГЭ/мл** для образцов цельной крови при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В».

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

X x 10^y ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается, как **ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации X x 10^y ГЭ/мл**.
более 1x10^7 ГЭ/мл	ДНК *HSV* и *CMV* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более 1 x 10^7 ГЭ/мл**.

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

Относительные (нормированные) значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *HSV* (*CMV*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *HSV* и *CMV* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *HSV* и *CMV* производят согласно формуле:

$$\frac{\text{число ГЭ } HSV \text{ (}CMV\text{) в 1 мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в 1 мл}} \times 10^5 = \text{число ГЭ } HSV \text{ (}CMV\text{) на } 10^5 \text{ клеток человека}$$

где:

- «число ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

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

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 25 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 25

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 23) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
   1) 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 ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
   2) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна

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

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 ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 25). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 25) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует 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.

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

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 5 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для амплификации фрагментов ДНК *HSV* и *CMV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь *HSV* / *CMV*-Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл или 96-луночный планшет для ПЦР
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Буфер для элюции B	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

A. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок или достать 96-луночный планшет для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью *HSV* / *CMV*-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 3).
2. В подготовленные пробирки или лунки планшета внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или

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

магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При работе с планшетом, пробы ДНК и контрольные образцы добавлять аккуратно на дно лунки, не допуская образования капель на стенке.

3. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл К2 complex**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл К1 complex**.

2) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл К2 complex**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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

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. 26, 27)[24].

[24] Программы амплификации (табл. 26, 27) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

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

Таблица 26

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[25] и планшетного[26] 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, помимо указанных в таблице, назначается и по другим используемым каналам. 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.

Таблица 27

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[25]			**Приборы планшетного типа[26]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	**20 с**	5	**95**	**20 с**	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	**20 с**	40	**95**	**20 с**	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE** и **ROX**. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки или планшет ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить

[25] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[26] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

капли со стенок пробирок на вортексе.

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! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 28

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *HSV*	ДНК *CMV*	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 (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов.

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 29

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)			Результат
FAM	JOE	ROX	
отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК *HSV* и *CMV* **НЕ обнаружены**
определено	отсутствует	не учитывается	ДНК *HSV* **обнаружена**
отсутствует	определено	не учитывается	ДНК *CMV* **обнаружена**
отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	**Невалидный***

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

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 30 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 30

Результаты для контролей различных этапов качественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений количества геномных эквивалентов ДНК *HSV* и *CMV* в 1 мл исследуемых и контрольных образцах.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

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

Таблица 31

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного, при этом значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена	Значение *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается, как **ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена**.
Менее 2 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 2 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов: отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы, слюны, отделяемого пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»; а также образцов плазмы крови и ликвора, при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп».
Менее 4 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 4 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов мочи и секрета предстательной железы при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО».
Менее 1 х 10^4 ГЭ/мл	ДНК *HSV* и *CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 1 х 10^4 ГЭ/мл** для образцов цельной крови при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В».
Х х 10^y ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается, как **ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации Х х 10^y ГЭ/мл**.
более 1х10^7 ГЭ/мл	ДНК *HSV* и *CMV* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более 1 х 10^7 ГЭ/мл**.

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

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

Относительные (нормированные) значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *HSV* (*CMV*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *HSV* и *CMV* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *HSV* и *CMV* производят согласно формуле:

число ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл / **число ГЭ ДНК человека в 1 мл**	**x 10^5 =**	**число ГЭ *HSV* (*CMV*) на10^5 клеток человека**

где:

- «число ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 32 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

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

Таблица 32

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 30) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
   1) 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 ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
   2) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX 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

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

контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 32). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 32) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует 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.

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

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 6 (комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» вариант 100С – комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость[27]	50	1 флакон
Компонент А-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	2 пробирки
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	13 пробирок
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов вариант 100С рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК *HSV* и *CMV* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь *HSV / CMV*	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K−	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и

[27] При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

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 пробирок 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 *HSV / CMV*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (см. контрольные реакции в п. 7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью *HSV / CMV*** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси *HSV / CMV*** 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 необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.

б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм

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

ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

а) **ДНК-калибратор К1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К1 complex**.

2) **ДНК-калибратор К2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К2 complex**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

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. 33, 34)[28].

Таблица 33

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного[29] и планшетного[30] 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, помимо указанных в таблице, назначается и по другим используемым каналам. 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.

[28] Программы амплификации (табл. 33, 34) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.
[29] Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
[30] Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

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

Таблица 34

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

	Приборы роторного типа[29]			**Приборы планшетного типа**[30]		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	**20 с**	5	**95**	**20 с**	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	**20 с**	40	**95**	**20 с**	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM**, **JOE** и **ROX**. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
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! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 35

Канал для флуорофора	**FAM**	**JOE**	**ROX**
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК *HSV*	ДНК *CMV*	ДНК ВКО-FL

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

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 (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов.

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 36

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)			**Результат**
FAM	**JOE**	**ROX**	
отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК *HSV* и *CMV* **НЕ обнаружены**
определено	отсутствует	не учитывается	ДНК *HSV* **обнаружена**
отсутствует	определено	не учитывается	ДНК *CMV* **обнаружена**
отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	**Невалидный***

***** В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

Результат качественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 37 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 37

Результаты для контролей различных этапов качественного ПЦР-исследования

Контроль	**Контролируемый этап ПЦР-исследования**	**Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)**		
		FAM	**JOE**	**ROX**
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует

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

К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет количества геномных эквивалентов ДНК *HSV* и *CMV* в 1 мл исследуемых и контрольных образцах.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 38

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение *Ct* по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного, при этом значения *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена	Значение *Ct* по каналам для флуорофоров FAM и JOE отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение *Ct* меньше граничного. Результат выдается, как **ДНК *HSV* и *CMV* не выявлена**.
менее 2 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 2 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов: отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы, слюны, отделяемого пузырьковых высыпаний и эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек при использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»; а также образцов плазмы крови и ликвора, при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп».
менее 4 х 10^3 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 4 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов мочи и секрета предстательной железы при

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

	использовании для экстракции ДНК комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО».
менее 1 х 10^4 ГЭ/мл	ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат **менее 1 х 10^4 ГЭ/мл** для образцов цельной крови при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В».
X х 10^y ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается, как **ДНК *HSV, CMV* выявлена в концентрации X х 10^y ГЭ/мл**.
более 1х10^7 ГЭ/мл	ДНК *HSV* и *CMV* выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как **результат более 1 х 10^7 ГЭ/мл**.

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

Относительные (нормированные) значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентраций ДНК *HSV* и *CMV* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *HSV* (*CMV*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *HSV* и *CMV* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем Расчет нормированных значений концентрации ДНК *HSV* и *CMV* производят согласно формуле:

$$\frac{\text{число ГЭ } HSV \text{ (}CMV\text{) в 1 мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в 1 мл}} \times 10^5 = \text{число ГЭ } HSV \text{ (}CMV\text{) на } 10^5 \text{ клеток человека}$$

где:

- «число ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *HSV* (*CMV*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV* / *CMV*»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК

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

человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 39 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 39

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (*Ct*)		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 37) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
   1) 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 ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;

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

2) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (*Ct*) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов.
4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 39). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (*Ct*) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 39) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует 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.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100, вариант FEP-100-0,2, вариант FEP-100-0,5 и вариант FRT-100 FN при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *HSV / CMV* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *HSV / CMV* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 3. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,5 хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *HSV / CMV* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 4. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н. ПЦР-буфер-Н хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *HSV / CMV* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 5. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *HSV / CMV*-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Форма комплектации 6. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ВКО-FL. ВКО-FL хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н. ПЦР-буфер-Н хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *HSV / CMV* хранить в защищенном от света месте.

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

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель 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.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиПрайм® *HSV / CMV*» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио» (111394 г. Москва, ул. Полимерная 8, стр. 2) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.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 и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Согласовано:

Главный врач

ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России _____ С.А. Богдан

.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
LOT	Код партии		Использовать до
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
VER	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		Беречь от влаги
	Хрупкое. Осторожно		Верх

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции детальная информация по процедуре экстракции ДНК из биологических образцов изложена в инструкции по использованию автоматической станции.

Порядок работы

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Прогреть **лизирующий раствор МАГНО-сорб** при температуре **60 °С** до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл **ВКО-FL**, **компонент А-1** и **магнетизированную силику** из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL**, **10 мкл компонента А-1** и **10 мкл магнетизированной силики**[31]. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО-FL, мкл	Компонент А-1, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	70
12	130	130	130
18	190	190	190
24	250	250	250

4. Внести в пробирки объемом 1,5 мл по **30 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL, компонента А-1** и **магнетизированной силики**.
5. Добавить в пробирки по **450 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Внести в подготовленные пробирки по **100 мкл** исследуемых образцов.
7. В пробирку отрицательного контроля **(ОК)** экстракции внести **100 мкл ОКО**.
8. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**.
9. Осадить капли на вортексе и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл** р**аствора для отмывки 7**, плотно закрыть

[31] Предварительное смешивание ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики позволяет упростить процедуру экстракции. Возможно раздельное внесение этих реагентов.

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

крышки.

12. Смыть магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, затем осадить капли на вортексе.
13. Переставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив на **1 мин**.
14. Отобрать надосадочную жидкость, аналогично п. 10. Перенести пробирки в обычный штатив.
15. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
16. Добавить в пробирки по **100 мкл буфера для элюции В,** перемешать на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в **250 мкл буфера для элюции В**.

17. Поместить пробирки в термостат с температурой **60° С** на **5 мин**.
18. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК для проведения ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

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

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
21.10.15	По тексту	Исправлены опечатки
	Дополнительные материалы и оборудование	Уточнено, что комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК должен соответствовать инструкции Производителя
	Меры предосторожности	Дополнены сведения об описание утилизации или уничтожения упаковки, биологического материала, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом с отдельным описанием правил
	Диагностические характеристики	Изменены значения диагностических характеристик (специфичности и чувствительности) на значения, полученные в результате клинико-лабораторных испытаний, с доверительной вероятностью 95%

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

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью
Всего 75 (семьдесят пять) листов

Главный врач



_____ С.А. Богдан

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

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Общества с ограниченной ответственностью «НекстБио» – Генеральный директор Управляющей компании ООО «МБК»

_____Д.Л. Симачева

«__» _____ 2014 г.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов

версия 1.0

к набору реагентов **«АмплиПрайм® *HSV / CMV*»**
(для «ПЦР-комплект» вариант FRT-100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100FN и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

АмплиПрайм®

ООО «НекстБио»,
Российская Федерация, 111394,
город Москва, улица Полимерная, дом 8, стр. 2

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3

НАЗНАЧЕНИЕ 3

ПРИНЦИП РАБОТЫ 3

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 4

ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5

ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 6

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ 7

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

Обозначения контрольных образцов:

Тип контрольного образца	**Возможные обозначения (регистр любой)**
Калибраторы	РУС: К1, К2 ЛАТ: К1, К2
Отрицательный контроль амплификации	РУС: К- ЛАТ: К-
Отрицательный контроль экстракции	РУС: В-, ОКО ЛАТ: В-, ОКО

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение версии 1.0 (далее ПО1.0) предназначено для проведения автоматической обработки исходных данных и получения формализованных результатов при использовании набора реагентов для определения ДНК определения ДНК вируса простого герпеса (*HSV*) и цитомегаловируса (*CMV*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro **«АмплиПрайм® *HSV / CMV*»** (для «ПЦР-комплект» вариант FRT-100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100FN и «ПЦР-комплект» вариант FRT-L).

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Работа ПО1.0 осуществляется при использовании программы Microsoft Excel системы Office, требования к которой приведены на официальном сайте http://technet.microsoft.com/ru-ru/library/ee624351.aspx

Программа Microsoft Excel использует встроенный язык Visual Basic.

В качестве исходных данных ПО1.0 использует значения пороговых циклов амплификации (Ct) исследуемых образцов и контролей по соответствующим каналам для флуорофоров.

Для начала работы исходные данные должны быть получены в программном обеспечении используемого прибора, в соответствии с инструкцией по применению к используемому прибору.

Значения пороговых циклов (Ct) по каждому каналу флуоресцентной детекции следует разместить в соответствующих столбцах таблицы «Данные прибора» (см. рис.1.).

Для проведения корректного расчета необходимо, внести обозначения контрольных образцов и калибраторов в столбец «Образец» в соответствии с таблицей «обозначения контрольных образцов» вкладки «инструкция».

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

Рис.1.

Данные прибора					
№	Образец	Значение Ct			
		Green FAM HSV	Yellow HEX/JOE CMV	Orange Rox ВКО	Globin Globin
1	k-				
2	Ok		30	20	
3	3	13		20	
4	4	13	25	20	
5	5		25	20	
6	6	13	25	20	

По окончанию размещения исходных данных и их обозначения произвести расчет путем нажатия кнопки «Рассчитать».

ПО1.0, используя исходные данные, проводит автоматическое построение калибровочных линий и расчет концентрации специфических мишеней. Программа автоматически проводит сверку полученных значений контрольных образцов с заданным диапазоном согласно инструкции к набору реагентов.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматической обработки исходных данных и получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие условия:

1) Заполнение таблицы «Данные с прибора» (см. рис.1) должно проводиться без ошибок, с соответствующим обозначением контрольных образцов.
2) Поле «Вкладыш к набору реагентов» должно быть заполнено в строгом соответствии с вкладышем к используемой серии набора реагентов.
3) Необходимо убедиться, что система безопасности Microsoft Excel позволяет использовать макросы. В меню Сервис>Макрос>Безопасность установите «Средний уровень защиты».

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

ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

ПО1.0 и руководство оператора по применению представлены пользователю на диске (оптическом носителе – mini CD).

Внешний вид:

Параметры

Параметры	
Информация о постановке	
Дата постановки	
Оператор ПЦР	
Серия набора реагентов	
Серия набора реагентов для количественного определения ДНК человека	
Прибор	

Вкладыш к набору реагентов

Вкладыш к набору реагентов								
Значения концентраций калибраторов, ГЭ/мл					**Граничные значения порогового цикла (Ct)**			
	Green FAM	Yellow HEX/JOE	Orange Rox	Globin		Green FAM	Yellow HEX/JOE	Orange Rox
K1					K2, K+			
K2					OKO			
					Исследуемые образцы			
Допустимые значения концентраций								
Минимальные значения количества клеток в 1мл								

Калибровка

Калибровка		
Результаты калибровки		
Green FAM	*Yellow HEX/JOE*	*Globin*
Коэффициент корреляции R^2		
Эффективность E		
Статус калибровки		

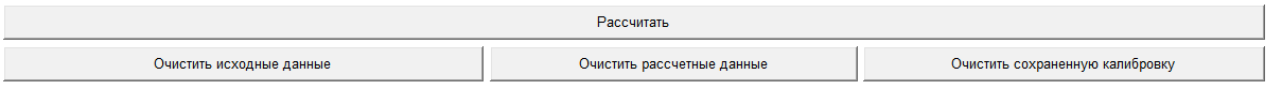
Данные прибора

Данные прибора					
№	Образец	Значение Ct			
		Green FAM HSV	Yellow HEX/JOE CMV	Orange Rox ВКО	Globin Globin
1	k-				
2	Ok				
3	3				
4	4				

Результаты

Результаты						
Концентрации (ГЭ ДНК/мл)			Концентрации (ГЭ ДНК/10^5клеток)		*кол-во клеток человека в 1 мл*	*статус*
Green FAM HSV	Yellow HEX/JOE CMV	Globin Globin	Green FAM HSV	Yellow HEX/JOE CMV		

Кнопки управления



ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Проверить, что система безопасности Microsoft Excel позволяет использовать макросы.

   Для Microsoft Excel 2003 следует выполнить следующие действия: во вкладке Меню выбрать «Сервис» > «Макрос» > «Безопасность» и установить Средний уровень защиты.
2. Открыть файл с ПО1.0, принять включение макросов.
3. Заполнить таблицу «Граничные значения порогового цикла (Ct)» путем копирования данных непосредственно из программного обеспечения прибора, либо из файла экспорта данных в Microsoft Excel. Значения пороговых циклов прописать для соответствующих каналов амплификации, приведенных в таблице.
4. Внести или вставить обозначения исследуемых образцов в столбец «Образец» поля «Данные прибора».
5. Обозначить образцы, соответствующие калибраторам, строго как К1, К2. Язык и регистр букв значения не имеет.
6. Ввести информацию о постановке.
7. Сохранить файл под другим именем.
8. Нажать клавишу «Рассчитать»

   В файле будут отражены полученные калибровочные линии, расчетные данные, результаты (наличие/отсутствие возбудителя) и статус валидности образца, определяющийся количеством клеток человека.
9. Проверить, что калибровка проведена успешно.

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

10. Просмотреть статус образцов, особое внимание обратить на контрольные образцы.

ВНИМАНИЕ! Программное обеспечение автоматически проверяет наличие контрольных образцов и калибраторов в постановке. В случае отсутствия калибратора К1 и сохраненных данных предыдущей калибровки, система проведет анализ постановки в качественном формате. При наличии данных для калибраторов К1 и К2 расчет постановки проводится в количественном формате.

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Результаты

Результаты анализа выдаются в следующем виде:

Результаты

Концентрации (ГЭ ДНК/мл)			Концентрации (ГЭ ДНК/10^5клеток)		*кол-во клеток человека в 1 мл*	*статус*
Green FAM **HSV**	Yellow HEX/JOE **CMV**	Globin Globin	Green FAM **HSV**	Yellow HEX/JOE **CMV**		
						OK
						Контаминация?
> 1,E+07						Обнаружено ДНК: HSV
> 1,E+07	1,E+05					Обнаружено ДНК: HSV, CMV
	1,E+05					Обнаружено ДНК: CMV

В столбце «статус» выводятся результаты анализа в качественном формате. В случае, если образец не укладывается в заданные критерии валидности, его статус выдается как «Невалидный». Необходим повторный анализ данного образца.

В столбце «Концентрация (ГЭ ДНК/мл)» выводятся количественные результаты для каждого выявляемого возбудителя. В случае, если для образца получен результат более или менее линейного диапазона измерения, количественные данные представляются в виде «> линейного диапазона» и «< линейного диапазона» соответственно. В случае отсутствия возбудителя в образце соответствующее поле в таблице результатов остается пустым.

При использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека, возможен вывод количественных результатов с нормировкой на количество клеток человека в столбце «Концентрация (ГЭ ДНК/10^5 клеток)».

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

Интерпретация контрольных образцов.

В случае успешного прохождения контрольных образцов, в столбце статус выдается сообщение «Ок». Если контрольный образец не укладывается в заданные критерии, статус меняется на «Сбой!».

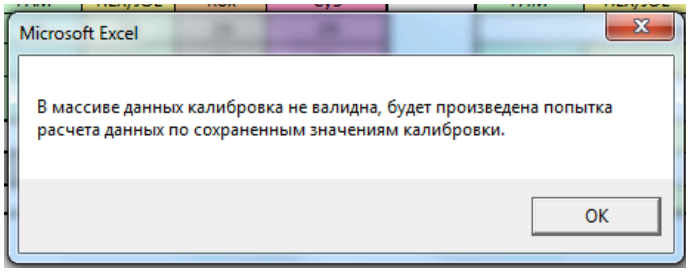
При проведении количественного анализа дополнительно проверяются параметры построения калибровочных прямых по каждому каналу флуоресцентной детекции. Статус калибровки «Ок» соответствует успешному построению калибровочной прямой, статус «Сбой!» означает, что калибровочная прямая не может быть построена по данному каналу, возможен только качественный анализ результатов.

Калибровка

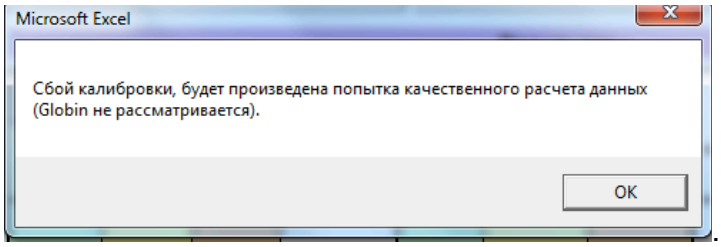
Результаты калибровки		
Green *FAM*	*Yellow* *HEX/JOE*	*Globin*
Коэффициент корреляции R^2		
1	0,999979375	
Эффективность E		
1,197026048	0,83162215	
Статус калибровки		
Ok	Ok	

Дополнительные сообщения

В случае если данных для количественного расчета постановки недостаточно (например, отсутствуют калибраторы), программное обеспечение выдает следующие сообщение:



Если предыдущая постановка набора реагентов данной серии содержала необходимые калибраторы и контроли, и была проведена успешная калибровка, система автоматически использует параметры калибровки предыдущей постановки для количественного расчета текущей. В случае если системе не удается найти данные предыдущей успешной калибровки, возможен анализ результатов только в качественном формате, выдается следующее сообщение:



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