АмплиПрайм

IVD

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV/CMV/HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020

«АмплиПрайм® EBV/CMV/HHV6»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ 4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 5
   2.1. Формы выпуска, состав и комплектность 5
   2.2. Принцип метода 7
   2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 HS и K2 HS 8
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 8
   3.1. Внутренний контроль качества 8
   3.2. Рекомендуемые контрольные материалы 10
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 11
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 11
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 13
   6.1. Взятие исследуемого материала 13
   6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала 14
   6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов 15
   6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 16
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 18
   7.1. Цельная кровь 18
   7.2. Слюна 19
   7.3. Мазки со слизистой оболочки влагалища 19
   7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры 20
   7.5. Мазки со слизистой оболочки прямой кишки 20
   7.6. Мазки (соскобы) со слизистой оболочки ротоглотки 20
   7.7. Моча 21
   7.8. Спинномозговая жидкость (ликвор) 22
   7.9. Секрет предстательной железы 22
   7.10. Эякулят 23
   7.11. Биоптаты внутренних органов 23
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 24
   8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала 24
   8.2. Подготовка реагентов для амплификации 24
   8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции 25
   8.4. Анализ и вычисление результатов 27
   8.5. Интерпретация результатов 28
   8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению 30
   8.7. Диагностическое значение полученного результата 31
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 31
   9.1. Предел обнаружения 31
   9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения 33
   9.3. Аналитическая специфичность 33
   9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения 34
   9.5. Правильность измерения 35
   9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 35
   9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ 37
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 38
   10.1. Срок годности 38
   10.2. Транспортирование 38
   10.3. Хранение 38
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 40
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 41

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	–	Cycle threshold (пороговый цикл)
CMV	–	*Cytomegalovirus*
EBV	–	*Epstein-Barr virus*
HHV6	–	*Human Herpesvirus* 6
«АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»	–	Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020
ВКО	–	внутренний контрольный образец
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	–	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	–	дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
К1	–	калибровочный образец 1
К2	–	калибровочный образец 2
К-	–	отрицательный контроль ПЦР
ОКО	–	отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РУ	–	регистрационное удостоверение
ТУ	–	технические условия
УДГ	–	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6», а также сокращение Набор реагентов.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» предназначен для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) в биологическом материале (цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови, слюна, отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки и ротоглотки, моча, ликвор, секрет предстательной железы, эякулят, биоптаты внутренних органов) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: набор предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на герпесвирусную инфекцию вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники).

1.7. Применять набор строго по назначению согласно инструкции по применению.

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор выпускается в трех формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все три формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 3 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана под парафин.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
К1 HS	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 HS	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

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

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
К1 HS	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 HS	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
К1 HS	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 HS	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2 или 3)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

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

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых вирусов, внутреннего контрольного образца (ВКО) и ДНК β-глобинового гена человека при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме реального времени за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды 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 с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Количественное определение ДНК выявляемых вирусов 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). При проведении количественного теста, амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами К1 HS и К2 HS – образцами с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Полученное значение концентрации ДНК нормируется на 100 000 клеток человека для снижения влияния качества забора материла.

Набор 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 в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК выявляемых возбудителей, ДНК β-глобинового гена человека

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

(эндогенный ВКО) и последовательность ВКО-FL (экзогенный ВКО). Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G[2]	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК EBV	ДНК HHV6	ДНК CMV	ДНК Glob	ВКО-FL
Область амплификации	Белок LMP1	ДНК полимераза	ДНК полимераза	ДНК β-глобинового гена человека (эндогенный ВКО)	Искусственно синтезированная последовательность

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 HS и K2 HS

Измерение значений концентрации калибраторов K1 HS и K2 HS производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов K1 HS и K2 HS составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (K1 HS и K2 HS). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV), герпеса 6 типа (HHV6) и последовательность ДНК β-глобинового гена человека. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6), цитомегаловируса человека (CMV) и контроля, начиная с этапа экстракции.

В качестве положительного контроля используются реагенты K1 HS и K2 HS, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6), цитомегаловируса человека (CMV) и ДНК β -глобинового гена человека в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов K1 HS и K2 HS. Исследование калибровочных образцов K1 HS и K2 HS проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов K1 HS и K2 HS и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов K1 HS и K2 HS и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если эффективность калибровки выходит за пределы граничных значений, необходимо повторить исследование с этапа ПЦР.

3.1.3. Контроль ингибирования и качества забора материала

Для оценки качества забора биоматериала и контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО[3], который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции и эндогенного ВКО - ДНК β-глобинового гена человека, который присутствует в каждом исследуемом образце, содержащем клинический материал от человека, и контрольных калибраторах. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не

[3]ВКО (ВКО-FL) входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала, или приобретается дополнительно.

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

обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции. Если при проведении количественного анализа в исследуемых образцах цельной крови, лейкоцитов крови и биоптатов внутренних органов не обнаружена ДНК β-глобинового гена человека или обнаружена в количестве менее 2000 копий/реакцию, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить анализ, начиная с этапа забора материала. Для образцов плазмы крови, слюны, отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки и ротоглотки, мочи, ликвора, секрета предстательной железы, эякулята допустимое количество ДНК β-глобинового гена человека может быть менее 500 копий/реакцию.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6), цитомегаловируса человека (CMV).

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

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Непригодными для исследования являются образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта и образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

4.4. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.5. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL. Без использования ВКО-FL невозможно провести оценку валидности постановки.

4.6. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

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

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

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[4], биологический материал[5], включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории

[4] Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

[5] Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

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

в установленном порядке (в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор 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.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

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

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки), содержащая буферно-солевой раствор с муколитиком, консервантом и стабилизатором (например, «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ», РУ № ФСР 2012/14205 или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек (урогенитального тракта (влагалища, уретры), прямой кишки, ротоглотки),

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

однократного применения, стерильный, изготовленный из полипропилена, состоящий из головки (рабочая часть) и ручки. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.1.3. Емкость для взятия, транспортировки и хранения мочи, секрета предстательной железы, эякулята (объемом до 150 мл), слюны, ликвора (объемом до 2 мл), однократного применения, стерильная, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой, изготовленная из полипропилена.

6.1.4. . Вакуумные пробирки для взятия крови с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитратом натрия).

6.1.5. Двухсторонняя игла для взятия крови в вакуумную пробирку, одноразовая, стерильная.

6.1.6. Игла для забора ликвора, одноразовая, стерильная.

6.1.7. Одноразовые стерильные пробирки объемом 1,5 - 2 мл, содержащие транспортную среду (для микроаутоптатов) или контейнер с физиологическим раствором или специальной транспортной средой (для макробиоптатов).

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Предварительная обработка крови для получения лейкоцитарной массы или плазмы

6.2.1.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2 мл.

6.2.1.2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.1.3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 1 600 g.

6.2.1.4. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.2. Предварительная обработка мочи

6.2.2.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант, или физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида) стерильный, или вакуумные пробирки для забора мочи.

6.2.2.2. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

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

6.2.2.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.2.5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

6.2.2.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.2.7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.2.8. Вортекс.

6.2.2.9. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.3. Предварительная обработка эякулята

6.2.3.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.3.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.2.3.3. Физиологический раствор.

6.2.3.4. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.3.5. Вортекс.

6.2.4. Предварительная обработка биопсийного материала

6.2.4.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 200 мкл.

6.2.4.3. Фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.4.4. Металлические инструменты (скальпели, ножницы и т.п.).

6.2.4.5. Изотонической раствор хлорида натрия.

6.2.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.4.7. Ватные тампоны.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови, слюна, отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки и ротоглотки, моча, ликвор, секрет предстательной железы, эякулят, биоптаты внутренних органов) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;

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

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие наборы реагентов для экстракции ДНК: «МагноПрайм ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043), «МагноПрайм ЮНИ» (РУ № РЗН 2019/8955), «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2012/14019), «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017). Рекомендуется использовать наборы для экстракции ДНК в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Рекомендуемые наборы для экстракции ДНК

Биоматериал	Набор для экстракции
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, моча, секрет предстательной железы	МагноПрайм ФАСТ
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, моча, слюна, цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови, ликвор	МагноПрайм ЮНИ
Эякулят, биоптаты внутренних органов	АмплиПрайм ДНК-сорб-В
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки, плазма крови, ликвор, слюна	АмплиПрайм РИБО-преп

6.3.2. Реагент ВКО-FL (ООО «НекстБио», Россия) – при использовании наборов реагентов для экстракции «МагноПрайм ЮНИ», «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», «АмплиПрайм РИБО-преп», или любого другого набора, в состав которого не включен ВКО-FL.

6.3.3. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 2):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- 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 – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

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

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 2 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени роторного либо планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 со следующими характеристиками:

Таблица 5

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690
Cy5.5	660	690	705	750

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;

- точность поддержания температуры ≤ ±0,4 °С;

- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;

- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РУ № РЗН 2019/8446), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399).

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

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

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит

- цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- слюна;
- отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта;
- отделяемое слизистой оболочки прямой кишки;
- отделяемое слизистой оболочки ротоглотки;
- моча;
- спинномозговая жидкость (ликвор);
- секрет предстательной железы;
- эякулят;
- биоптаты внутренних органов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Цельная кровь

7.1.1. Взятие материала

Взятие крови проводится натощак или через 3 часа после приема пищи в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия).

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Допускается хранение и транспортирование образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 2 суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

7.1.2. Предварительная обработка для получения лейкоцитарной массы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать при 800 – 1600 g в течение 20 мин. После удаления плазмы, используя наконечник с фильтром, аккуратно собрать клетки крови (лейкоцитарную массу) с поверхности осадка в объеме 200 мкл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл.

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

Допускается длительное хранение образцов лейкоцитарной массы до проведения ПЦР-исследования при температуре не выше минус 68 °С.

7.1.3. Предварительная обработка для получения плазмы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 мин при 800 – 1600 g. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

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

7.2. Слюна

Перед получением слюны следует провести трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Отобрать не менее 1 мл слюны в одноразовую стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл.

Допускается хранение и транспортирование образцов слюны до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3. Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Рабочую поверхность зонда поместить в транспортную среду, обломав пластиковую основу. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Внимание! Во избежание контаминации, нельзя обрезать зонд ножницами!

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 45 дней;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

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

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Взятие эпителиального соскоба из уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 45 дней;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.5. Мазки со слизистой оболочки прямой кишки

Перед взятием мазка провести тщательный туалет с мылом и водой области вокруг анального отверстия.

Взятие материала провести с поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 45 дней;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.6. Мазки (соскобы) со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие материала провести с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона из полипропилена/полистирола с вискозой или хлопком в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

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

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 72 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 14 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7. Моча

7.7.1. Порядок сбора

Женщины для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15 – 25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой. 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 специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой.

В случае если сбор мочи осуществляется в емкость без реагентов для консервации и стабилизации, допускается хранение и транспортирование образцов мочи до проведения предобработки:

- 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.

При осуществлении сбора мочи в емкость с транспортной средой или реагентами для консервации и стабилизации, хранение образцов мочи до проведения предобработки проводить согласно инструкции к используемой емкости для сбора.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7.2. Предварительная обработка

Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с

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

фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 мин при 10 000 g. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл физиологического раствора стерильного или транспортной среды и затем снова концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного или транспортную среду в объеме, указанном в инструкции по ее применению. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Условия хранения предварительно обработанных проб мочи аналогичны условиям хранения материала до предобработки.

7.8. Спинномозговая жидкость (ликвор)

Спинномозговую жидкость (ликвор) собирают с помощью одноразовых игл в одноразовые стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Допускается хранение и транспортирование образцов ликвора до проведения 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 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.9. 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 пластиковую пробирку объемом 2 мл или контейнер.

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 сбора мочи).

Допускается хранение и транспортирование образцов секрета предстательной железы до проведения 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;

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

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.10. Эякулят

7.10.1. Взятие материала

Получение спермы осуществляют в стерильный контейнер объемом 50 – 60 мл.

Условия хранения и транспортирования материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре 2 – 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.10.2. Предварительная обработка материала

Непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот, используя наконечник с фильтром, перенести 0,05 мл спермы в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл и добавить 0,15 мл физиологического раствора, тщательно перемешать пробу на вортексе.

7.11. Биоптаты внутренних органов

7.11.1. Взятие материала

Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка в пробирку или контейнер с транспортной средой.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.11.2. Предварительная обработка материала

Микробиоптаты (пунктаты) печени, селезенки, предстательной железы, желудочно-кишечного тракта, шейки матки и других органов, помещенные в пробирки с транспортной средой, предобработки не требуют.

Для предобработки макробиоптатов кусочки ткани массой 0,1 – 1 г помещают в охлажденную фарфоровую ступку и добавляют охлажденный изотонический раствор хлорида натрия объемом 0,5 – 1 мл. Измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Через ватный тампон отбирают надосадочную

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

жидкость (0,1 – 0,2 мл) стерильным наконечником с фильтром в стерильные микропробирки.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[6]:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО-FL – **10 мкл** в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – от **50** до **100 мкл**[7] (в зависимости от используемого набора реагентов для поведения экстракции).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1. При использовании формы выпуска 1.

8.2.1.1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.1.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.1.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

---

[6] Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

[7] 50 мкл при использовании набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» или «АмплиПрайм РИБО-преп»; 100 мкл при использовании набора «МагноПрайм ФАСТ» или «МагноПрайм ЮНИ».

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

8.2.2. При использовании формы выпуска 2.

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

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси EBV/CMV/HHV6** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 6). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 6

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

8.2.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

8.2.2.3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме реального времени.

8.2.2.4. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.3. При использовании формы выпуска 3.

8.2.3.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.3.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.3.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

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

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе (качественный формат) программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы.

При проведении качественного анализа:

а) Положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К2** внести **10 мкл К2 HS**.

б) Отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) Отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

При проведении количественного анализа:

а) Образец **К1** – в одну пробирку внести **10 мкл К1 HS**.

б) Образец **К2** – в одну пробирку внести **10 мкл К2 HS**.

в) Отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

г) Отрицательный контроль ПЦР (К-) – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-.**

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме реального времени для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 7).

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция 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, R6G[8], ROX, Cy5, Cy5.5	

[8] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Примечание - 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 детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

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

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме реального времени.

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/.

Обработка и расчет результатов происходит 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. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по пяти каналам детекции (см. таблицу 8).

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

Таблица 8

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	ДНК EBV	ДНК HHV6	ДНК CMV	ДНК Glob	ВКО-FL

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для калибраторов строится калибровочная кривая, по которой проводится расчет концентрации ДНК выявляемых вирусов и количество геномов человека на 1 мл исследуемого образца /реакционную смесь. Полученные значения используются для расчета количества ДНК выявляемых возбудителей, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Полученные значения концентрации ДНК человека позволяют оценить качество взятия биологического материала.

При количественном анализе расчет концентрации выполняется в трех вариантах:

- в логарифмах копий ДНК возбудителя на стандартное количество клеток человека (10^5) [9,10];
- в копиях ДНК на стандартное количество клеток человека (10^5)[10];
- в копиях ДНК возбудителя на 1 мл образца.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 9 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 10 и 11 соответственно.

[9] Если в исследуемых образцах плазмы крови, слюны, отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки и ротоглотки, мочи, ликвора, секрета предстательной железы, эякулята обнаружена ДНК β-глобинового гена человека в количестве менее 500 копий/реакцию, то расчет концентрации выполняется только в копиях ДНК возбудителя на 1 мл образца.

[10] Если полученное значение концентрации ДНК возбудителя выходит за рамки линейного диапазона измерения набора, расчет точного значения концентрации ДНК производится только в копиях ДНК возбудителя на 1 мл образца.

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

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM**, **R6G, ROX не определено** и по каналу **Cy5**[11] и/или **Cy5.5 не определено или определено выше граничного**[12]	**Результат невалидный**
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM,** и/или **R6G**, и/или **ROX определено выше граничного**, а по каналу для флуорофора **Cy5.5 не выше граничного**	**Результат недостоверный/сомнительный**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM**, и/или **R6G**, и/или **ROX определено не выше граничного.** При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.	**ДНК *Epstein-Barr virus*,** и/или **ДНК *Human Herpesvirus* 6**, и/или **ДНК *Cytomegalovirus* обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM**, и/или **R6G**, и/или **ROX не определено**, а по каналам для флуорофоров **Cy5**[11] и **Cy5.5 определено не выше граничного**	**ДНК *Epstein-Barr virus*,** и/или **ДНК *Human Herpesvirus* 6**, и/или **ДНК *Cytomegalovirus* не обнаружена**

Таблица 10

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5**[11] **не определено**	**Результат невалидный**
Значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5**[11] **определено выше граничного**[12]	**Результат недостоверный** (для образцов цельной крови, лейкоцитов крови и биоптатов внутренних органов)
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM,** и/или **R6G**, и/или **ROX определено выше граничного**, а по каналу для флуорофора **Cy5.5 не выше граничного**	**Результат недостоверный/сомнительный**
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналу для флуорофора **FAM**, и/или **R6G**, и/или **ROX** находится **в пределах линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5**[11] **определено не выше граничного**	**ДНК *Epstein-Barr virus*,** и/или **ДНК *Human Herpesvirus 6*,** и/или **ДНК *Cytomegalovirus* обнаружена в концентрации $X \times 10^y$ копий/мл или lg X копий/10^5 клеток человека или X копий/10^5 клеток человека**
По каналу для флуорофора **FAM**, и/или **R6G**, и/или **ROX выявлена ДНК в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5**[11] **определено не выше граничного**	**ДНК *Epstein-Barr virus*,** и/или **ДНК *Human Herpesvirus 6*,** и/или **ДНК *Cytomegalovirus* обнаружена в концентрации менее $8x10^2$ копий/мл**
По каналу для флуорофора **FAM**, и/или **R6G**, и/или **ROX выявлена ДНК в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5**[11] **определено не выше граничного.**	**ДНК *Epstein-Barr virus*,** и/или **ДНК *Human Herpesvirus 6*,** и/или **ДНК *Cytomegalovirus* обнаружена в концентрации более $1x10^7$ копий/мл**
Значение Ct по каналам для флуорофоров **FAM**, и/или **R6G,** и/или **ROX не определено**, а по каналам для флуорофоров **Cy5**[11] и **Cy5.5 определено не выше граничного**	**ДНК *Epstein-Barr virus*,** и/или **ДНК *Human Herpesvirus* 6**, и/или **ДНК *Cytomegalovirus* не обнаружена**

[11] Для образцов плазмы крови, слюны, отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки и ротоглотки, мочи, ликвора, секрета предстательной железы, эякулята допускается превышение граничного значения Ct по каналу для флуорофора Cy5.

[12] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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

Таблица 11

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует				Определено значение Ct не выше граничного[13]
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				
К1 HS (К1)	Определено значение Ct				
К2 HS (К2)	Определено значение Ct не выше граничного				
К1 HS (К1) К2 HS (К2)	Показатель эффективности (Е) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2				

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора FAM, и/или R6G/HEX/JOE/VIC, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых вирусов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM, и/или R6G/HEX/JOE/VIC, и/или ROX, и/или Cy5, и/или Cy5.5 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.

8.6.3. Если показатель эффективности Е для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6.4. 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

[13] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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

или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных или недостоверных/сомнительных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа забора биоматериала.

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[14]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 12).

Значения характеристики, указанные в таблице 12, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Предел обнаружения набора

Вирус	Биоматериал	Набор для экстракции ДНК	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
EBV	Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	«МагноПрайм ФАСТ»	$4x10^2$	$3,20x10^2 – 5,26x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$3,02x10^2 – 4,57x10^2$
CMV		«МагноПрайм ФАСТ»		$2,98x10^2 – 4,61x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,75x10^2 – 4,28x10^2$
HHV6		«МагноПрайм ФАСТ»		$3,19x10^2 – 5,02x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,68x10^2 – 4,17x10^2$
EBV	Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	«МагноПрайм ФАСТ»	$4x10^2$	$3,06x10^2 – 4,55x10^2$
CMV				$3,27x10^2 – 5,01x10^2$
HHV6				$3,52x10^2 – 5,65x10^2$
EBV	Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	«АмплиПрайм РИБО-преп»	$4x10^2$	$2,76x10^2 – 6,52x10^2$
		«МагноПрайм ФАСТ»		$3,05x10^2 – 5,83x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,47x10^2 – 4,50x10^2$
CMV		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$2,22x10^2 – 6,00x10^2$

[14] Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95% тестов дают положительный результат).

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

Вирус	Биоматериал	Набор для экстракции ДНК	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
		«МагноПрайм ФАСТ»		$3,08x10^2 – 5,30x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,60x10^2 – 5,40x10^2$
HHV6		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$3,29x10^2 – 6,03x10^2$
		«МагноПрайм ФАСТ»		$2,95x10^2 – 5,24x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$3,08x10^2 – 5,30x10^2$
EBV	Моча	«МагноПрайм ФАСТ»	$4x10^2$	$3,06x10^2 – 4,55x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$3,37x10^2 – 5,26x10^2$
CMV		«МагноПрайм ФАСТ»		$3,52x10^2 – 5,65x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$3,27x10^2 – 5,08x10^2$
HHV6		«МагноПрайм ФАСТ»		$3,03x10^2 – 4,51x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,87x10^2 – 4,12x10^2$
EBV	Слюна	«АмплиПрайм РИБО-преп»	$4x10^2$	$2,53x10^2 – 4,19x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,64x10^2 – 4,59x10^2$
CMV		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$2,77x10^2 – 5,19x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,47x10^2 – 4,50x10^2$
HHV6		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$2,95x10^2 – 5,24x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,60x10^2 – 5,40x10^2$
EBV	Секрет предстательной железы	«МагноПрайм ФАСТ»	$4x10^2$	$3,29x10^2 – 5,23x10^2$
CMV				$2,83x10^2 – 4,16x10^2$
HHV6				$2,75x10^2 – 4,28x10^2$
EBV	Цельная кровь	«МагноПрайм ЮНИ»	$4x10^2$	$2,63x10^2 – 4,16x10^2$
CMV				$2,73x10^2 – 4,51x10^2$
HHV6				$2,84x10^2 – 4,93x10^2$
EBV	Плазма крови	«МагноПрайм ЮНИ»	$4x10^2$	$3,20x10^2 – 5,26x10^2$
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$2,77x10^2 – 4,12x10^2$
CMV		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,86x10^2 – 4,27x10^2$
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$2,93x10^2 – 4,58x10^2$
HHV6		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,98x10^2 – 4,61x10^2$
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$3,07x10^2 – 5,02x10^2$
EBV	Лейкоциты крови	«МагноПрайм ЮНИ»	$4x10^2$	$3,25x10^2 – 5,56x10^2$
CMV				$2,68x10^2 – 4,21x10^2$
HHV6				$2,78x10^2 – 4,30x10^2$
EBV	Ликвор	«АмплиПрайм РИБО-преп»	$4x10^2$	$3,39x10^2 – 5,59x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$3,03x10^2 – 4,51x10^2$
CMV		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$3,19x10^2 – 5,02x10^2$
		«МагноПрайм ЮНИ»		$3,02x10^2 – 4,57x10^2$
HHV6		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$3,29x10^2 – 5,23x10^2$

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

Вирус	Биоматериал	Набор для экстракции ДНК	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
		«МагноПрайм ЮНИ»		$2,89x10^2 – 4,63x10^2$
EBV	Биоптаты внутренних органов	«АмплиПрайм ДНК-сорб-В»	$4x10^2$	$2,68x10^2 – 4,17x10^2$
CMV				$2,83x10^2 – 4,16x10^2$
HHV6				$2,75x10^2 – 4,28x10^2$
EBV	Эякулят	«АмплиПрайм ДНК-сорб-В»	$4x10^2$	$3,37x10^2 – 5,26x10^2$
CMV				$3,27x10^2 – 5,08x10^2$
HHV6				$2,87x10^2 – 4,12x10^2$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от $8x10^2$ до $1x10^7$ копий/мл. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.3. Аналитическая специфичность

Набор обнаруживает фрагменты ДНК *Epstein-Barr virus*, *Cytomegalovirus* и *Human herpesvirus 6*.

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора вирусы. Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми вирусами при тестировании ДНК данных вирусов в концентрации не менее $1x10^7$ копий/мл.

Таблица 13

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизм	
Candida albicans	*Neisseria sicca*
Chlamydia trachomatis	*Neisseria subflava*
Escherichia coli	*Streptococcus agalactiae*
Mycoplasma genitalium	*Streptococcus pyogenes*
Neisseria gonorrhoeae	*Staphylococcus aureus*
Neisseria mucosa	-

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и геномной ДНК человека, а также ДНК выявляемых вирусов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

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

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений с помощью набора оценивали путем тестирования разведений модельных образцов в трех диапазонах концентраций (см. таблицу 14 и 15). Модельные образцы были приготовлены разведением в ТЕ-буфере стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК выявляемых вирусов. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 48 повторах, для оценки воспроизводимости – в 96 повторах.

Таблица 14

Повторяемость измерения

Вирус	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
Epstein-Barr virus	$1,0x10^4 – 3,0x10^4$	4,24	0,13	3,0
Human herpesvirus 6		4,22	0,15	3,6
Cytomegalovirus		4,27	0,14	3,4
Epstein-Barr virus	$1,0x10^5 – 3,0x10^5$	5,24	0,14	2,6
Cytomegalovirus		5,23	0,14	2,7
Human herpesvirus 6		5,23	0,14	2,8
Epstein-Barr virus	$1,0x10^6 – 3,0x10^6$	6,22	0,15	2,4
Cytomegalovirus		6,25	0,14	2,3
Human herpesvirus 6		6,23	0,15	2,4

Таблица 15

Воспроизводимость измерения

Вирус	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
Epstein-Barr virus	$1,0x10^4 – 3,0x10^4$	4,27	0,15	3,61
Human herpesvirus 6		4,25	0,15	3,46
Cytomegalovirus		4,25	0,15	3,47
Epstein-Barr virus	$1,0x10^5 – 3,0x10^5$	5,24	0,15	2,79
Cytomegalovirus		5,27	0,13	2,54
Human herpesvirus 6		5,26	0,13	2,53
Epstein-Barr virus	$1,0x10^6 – 3,0x10^6$	6,28	0,16	2,62
Cytomegalovirus		6,24	0,16	2,58
Human herpesvirus 6		6,21	0,16	2,59

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

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 120 повторах (см. таблицу 16).

Таблица 16

Правильность измерения

Вирус	Среднее значение измерения, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
			log_{10}	%
Epstein-Barr virus	5,74	5,70	0,04	0,66
Cytomegalovirus	5,72	5,70	0,02	0,39
Human herpesvirus 6	5,74	5,70	0,04	0,62

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 17.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие/отсутствие ДНК выявляемых вирусов, использовали следующие наборы:

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» по ТУ 9398-095-01897593-2012 (РУ № ФСР 2010/09502).

– Набор реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) методом полимеразной цепной реакции ЦМВ-ГЕН по ТУ 9398-005-46482062-2008 (РУ № ФСР 2008/03945)

– Набор реагентов для выявления ДНК вируса Эпштейна-Барр методом полимеразной цепной реакции (EBV) по ТУ 9398-021-46482062-2009 (РУ № ФСР 2010/06934).

– Набор реагентов для выявления ДНК вируса герпеса человека 6 типа методом полимеразной цепной реакции (HHV6) по ТУ 9398-022-46482062-2009 (РУ № ФСР 2010/06932).

В связи с отсутствием зарегистрированных в РФ наборов сравнения для образцов биоматериала: отделяемое слизистых оболочек прямой кишки, плазма крови и секрет предстательной железы, диагностические характеристики для данного биоматериала определяли с помощью модельных образцов, приготовленных с использованием 1 Международного стандарта ВОЗ по цитомегаловирусу человека, NIBSC code 09/162, 1 Международного стандарта ВОЗ по вирусу Эпштейна-Барра, NIBSC code: 09/260 и 1 Международного стандарта ВОЗ на вирус HHV-6B, NIBSC code: 15/266.

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

Таблица 17

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»

Исследуемые образцы			Результаты тестирования				
Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6	Наборы сравнения			
				АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL	ЦМВ-ГЕН	EBV	HHV6
Цельная кровь	200	Положительных	100	100	–	–	–
		Отрицательных	100	100	–	–	–
Плазма крови	60	Положительных	30	–	–	–	–
		Отрицательных	30	–	–	–	–
Лейкоциты крови	60	Положительных	30	30	–	–	–
		Отрицательных	30	30	–	–	–
Слюна	200	Положительных	100	100	–	–	–
		Отрицательных	100	100	–	–	–
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	200	Положительных	100	–	33	33	34
		Отрицательных	100	–	33	33	34
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	60	Положительных	30	–	–	–	–
		Отрицательных	30	–	–	–	–
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	60	Положительных	30	30	–	–	–
		Отрицательных	30	30	–	–	–
Моча	200	Положительных	100	–	33	33	34
		Отрицательных	100	–	33	33	34
Ликвор	200	Положительных	100	100	–	–	–
		Отрицательных	100	100	–	–	–
Секрет предстательной железы	60	Положительных	30	–	–	–	–
		Отрицательных	30	–	–	–	–
Эякулят	60	Положительных	30	30	–	–	–
		Отрицательных	30	30	–	–	–
Биоптаты внутренних органов	60	Положительных	30	30	–	–	–
		Отрицательных	30	30	–	–	–

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

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 18.

Таблица 18

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»

Тип образцов	Диагностическая специфичность, %	Диагностическая чувствительность, %
Цельная кровь	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (97,0 % – 100 %)
Плазма крови	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)
Лейкоциты крови	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)
Слюна	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (97,0 % – 100 %)
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (97,0 % – 100 %)
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)
Моча	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (97,0 % – 100 %)
Ликвор	100 % (97,0 % – 100 %)	100 % (97,0 % – 100 %)
Секрет предстательной железы	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)
Эякулят	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)
Биоптаты внутренних органов	100 % (90,5 % – 100 %)	100 % (90,5 % – 100 %)

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 19, в максимально возможной концентрации для каждого вида биоматериала.

Таблица 19

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
цельная кровь	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
плазма крови	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	лактоферрин	0,1 мкг/100 мкл
	ацикловир	2,37 мкг/100 мкл
	гематин	1,52 мкг/100 мкл
	иммуноглобулин G	1,6 мг/100 мкл
	гликохолат натрия	11,1 нг/100 мкл

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

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
	натрий таурохолат гидрат	3,8 нг/100 мкл
	гликоген	12 мг/100 мкл
лейкоциты крови	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
слюна	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества в 100 мкл
	хлоргексидин	0,1 % в 100 мкл
моча	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл
ликвор	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
секрет предстательной железы	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл
эякулят	муцин	0,23 мг/100 мкл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества в 100 мкл
	хлоргексидин	0,1 % в 100 мкл
биоптаты внутренних органов	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл

10.УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на

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

этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси EBV/CMV/HHV6 и ПЦР-буфера-Н, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

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

11.ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

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

12.СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

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

IVD

АмплиПрайм

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV/CMV/HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020

«АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»

Форма выпуска 1

REF P2052-41

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- ✓ слюна;
- ✓ отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта;
- ✓ отделяемое слизистой оболочки прямой кишки;
- ✓ отделяемое слизистой оболочки ротоглотки;
- ✓ моча;
- ✓ спинномозговая жидкость (ликвор);
- ✓ секрет предстательной железы;
- ✓ эякулят;
- ✓ биоптаты внутренних органов.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,20	1 пробирка
К1 HS	Прозрачная жидкость	0,12	1 пробирка
К2 HS		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К-		0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО-FL[1]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	50 - 100 мкл[2]	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6 для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
2. Внести в подготовленные пробирки ПЦР-буфер-К и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6 на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
К2 HS *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 HS *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

3. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме реального времени согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция 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, R6G[3], ROX, Cy5, Cy5.5	

[1] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала, или приобретается дополнительно.

[2] 50 мкл при использовании набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» или «АмплиПрайм РИБО-преп»; 100 мкл при использовании набора «МагноПрайм ФАСТ» или «МагноПрайм ЮНИ».

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Примечания
1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.
2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.
Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:
- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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

IVD

АмплиПрайм

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV/CMV/HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020

«АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»

Форма выпуска 2

REF 2052-42

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- ✓ слюна;
- ✓ отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта;
- ✓ отделяемое слизистой оболочки прямой кишки;
- ✓ отделяемое слизистой оболочки ротоглотки;
- ✓ моча;
- ✓ спинномозговая жидкость (ликвор);
- ✓ секрет предстательной железы;
- ✓ эякулят;
- ✓ биоптаты внутренних органов.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н		0,65	1 пробирка
К1 HS		0,12	1 пробирка
К2 HS		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К-		0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО-FL[1]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	50 - 100 мкл[2]	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

1. Рассчитать объем реагентов, необходимый для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	**10,0***(N+1)	**N** – количество амплифицируемых образцов
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

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

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6 и ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.
3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)

[1] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала, или приобретается дополнительно.

[2] 50 мкл при использовании набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» или «АмплиПрайм РИБО-преп»; 100 мкл при использовании набора «МагноПрайм ФАСТ» или «МагноПрайм ЮНИ».

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

Добавляемый реагент / образец	
K2 HS *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
K1 HS *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

6. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме реального времени согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция 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, R6G[3], ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания
1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.
2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

7. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

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

8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

IVD

АмплиПрайм

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса человека (CMV) и герпеса 6 типа (HHV6) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «АмплиПрайм® EBV/CMV/HHV6» по ТУ 21.20.23-090-09286667-2020

«АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»

Форма выпуска 3

REF P2052-43

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- ✓ слюна;
- ✓ отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта;
- ✓ отделяемое слизистой оболочки прямой кишки;
- ✓ отделяемое слизистой оболочки ротоглотки;
- ✓ моча;
- ✓ спинномозговая жидкость (ликвор);
- ✓ секрет предстательной железы;
- ✓ эякулят;
- ✓ биоптаты внутренних органов.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь EBV/CMV/HHV6	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин белого цвета	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,20	1 пробирка
К1 HS	Прозрачная жидкость	0,12	1 пробирка
К2 HS		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К-		0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 3
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО-FL[2]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	50 - 100 мкл[3]	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6 для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
2. Внести в подготовленные пробирки ПЦР-буфер-К и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью EBV/CMV/HHV6 на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
К2 HS *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 HS *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

3. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме реального времени согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	**Температура, °С**	**Время**	**Детекция 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, R6G[4], ROX, Cy5, Cy5.5	

[2] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала, или приобретается дополнительно.

[3] 50 мкл при использовании набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» или «АмплиПрайм РИБО-преп»; 100 мкл при использовании набора «МагноПрайм ФАСТ» или «МагноПрайм ЮНИ».

[4] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

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

Примечания
1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.
2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

4. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

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

5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени, согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

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