Только для профессионального использования

AllplexTM

NG & DR Assay

(Кат. № SD10367X, SD10368Z)

Мультиплексная ПЦР в реальном времени для выявления *Neisseria gonorrhoeae* и мутаций A2059G и C2611T в гене 23S рРНК и S91F в гиразе A, ответственных за устойчивость к азитромицину и ципрофлоксацину у *Neisseria gonorrhoeae*.

Для использования с

1. **CFX96™ Система обнаружения ПЦР в реальном времени (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)**
2. **Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)**

CE

IVD **Только для диагностики *in vitro***

REF **SD10367X** Σ 100 REF Σ 25

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548

EC REP **Медицинские технологии Promedt Consulting GmbH**

Ernst-Heckel-Straße 7, 66386 St.Ingbert, Германия

Не доступно в США.

СОДЕРЖАНИЕ

УВЕДОМЛЕНИЯ 3
ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ 6
ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР 6
СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ 8
РЕАГЕНТЫ 9
ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА 11
НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ... 11
ПРОТОКОЛ 12
НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ 23
РЕЗУЛЬТАТЫ 43
ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ 46
ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ 48
ССЫЛКИ 63
КЛЮЧ К СИМВОЛАМ 64
ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА 66

УВЕДОМЛЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Анализ Allplex™ NG & DR должен проводиться квалифицированным, обученным персоналом.
- Надежность результатов зависит от надлежащего сбора, хранения, транспортировки и обработки образцов.
- Если этот продукт используется с **Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS,Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH**, он обеспечивает максимум 5 отдельных запусков.
- **AIOS** сочетает в себе Seegene STARlet, продаваемый компанией Seegene, с оборудованием для ПЦР в реальном времени (CFX96 Dx, производитель: Bio-Rad) и герметизатором планшета (производитель: SAMICK THK) для создания автоматизированной структуры связи между выделением нуклеиновых кислот и ПЦР.
- При использовании этого продукта с AIOS не более 3 отдельных запусков.
- **Этот тест был одобрен для следующих типов образцов: моча, генитальный мазок, жидкие цитологические образцы, орофарингеальный (горловой) мазок и аноректальный мазок.** Этот анализ не был валидирован для других типов образцов.
- **Храните образцы ДНК при≤ -20℃ до использования, а во время работы - на льду.**
- Чувствительность анализа может снизиться, если образцы неоднократно замораживались и размораживались или хранились в течение длительного периода времени.
- Рабочий процесс в лаборатории должен быть однонаправленным.
- Надевайте одноразовые перчатки в каждой зоне и меняйте их перед входом в разные зоны. Немедленно меняйте перчатки, если они загрязнены, или обрабатывайте их реагентом для дезактивации ДНК.
- Принадлежности и оборудование должны быть закреплены за рабочими зонами и не должны перемещаться из одной зоны в другую.
- Не пипетируйте ротом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих зонах лаборатории. При работе с образцами и реактивами надевайте одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты и средства защиты глаз. Мойте руки, тщательно обрабатывайте образцы и реактивы для испытаний.
- Избегайте загрязнения реагентов при извлечении аликвот из пробирок с реагентами. Рекомендуется использовать стерильные одноразовые наконечники для пипеток, устойчивые к аэрозолям.
- Не объединяйте реагенты из разных партий или из разных пробирок одной партии.
- Не используйте продукт после истечения годности.
- Не используйте все одноразовые предметы повторно.

- Используйте пробирки с завинчивающимися крышками и предотвращайте возможное разбрызгивание или перекрестное образцов во время подготовки.
- Будьте осторожны, чтобы не загрязнить реагенты с выделенными нуклеиновыми кислотами, продуктами ПЦР и положительным контролем. Для предотвращения загрязнения реагентов рекомендуется использовать фильтрующие насадки.
- Используйте отдельные рабочие зоны для каждого эксперимента.
- Во избежание загрязнения рабочих зон амплифицированными продуктами открывайте пробирки или стрипы для ПЦР-реакции только в специально отведенных рабочих зонах после окончания амплификации.
- Храните положительные материалы отдельно от реагентов набора.
- При работе с образцами необходимо соблюдать процедуры безопасности в лаборатории (см. Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях и документы CLSI). Тщательно очистите и продезинфицируйте все рабочие поверхности 0,5% гипохлоритом натрия (в деионизированной или дистиллированной воде). Компоненты продукта (остатки продукта, упаковка) можно считать лабораторными отходами.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с действующими федеральными, государственными и местными нормами.
- Срок годности - 12 месяцев при ≤ -20℃ с даты изготовления. Окончательный срок годности указан на этикетке.
- Seegene NIMBUS и Seegene STARlet — это то же самое оборудование, что и Microlab NIMBUS IVD и Microlab STARlet IVD, соответственно, хотя производители отличаются друг от друга. Поскольку аппаратные изменения в устройствах отсутствуют, результаты тестов для них одинаковы.
- Торговая марка "CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD" заменена на "CFX96™ Dx system". Поскольку аппаратные изменения в системах отсутствуют, ожидается, что обе системы дадут одинаковые результаты.
- "CFX Manager™ Dx Software v3.1" является обновленной версией "CFX Manager™ Software-IVD v1.6". Обновленное программное обеспечение содержит улучшения в меню "Запуск". Эти улучшения не влияют на результаты анализа данных, поэтому результаты будут такими же.
- Не используйте прибор, если на нем есть повреждения, маркировка или упаковка.
- Утилизируйте материалы, использованные в данном анализе, включая реагенты, образцы и использованные флаконы с буфером, в соответствии с федеральными, государственными и местными правилами.
- Для надлежащей утилизации использованных и неиспользованных реагентов следуйте действующим федеральным, государственным и местным нормам, а также правилам утилизации отходов окружающей среды, принятым в вашем учреждении.

- Если национальные или региональные правила не содержат четких указаний по надлежащей утилизации, биологические образцы и использованный продукт должны быть утилизированы в соответствии с рекомендациями ВОЗ [Всемирной организации здравоохранения] по обработке и утилизации медицинских отходов.
- Данный набор представляет собой качественный диагностический тест *in vitro* для однократного или многократного выявления *N. gonorrhoeae* (NG) и мутаций A2059G и C2611T в гене 23S рРНК и S91F в гиразе A, ответственных за устойчивость к азитромицину и ципрофлоксацину у *N. gonorrhoeae* (NG).

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Allplex™ NG & DR Assay — это качественный диагностический тест *in vitro* для однократного или многократного обнаружения *N. gonorrhoeae* (NG) и мутации A2059G и C2611T в гене 23S рРНК, ответственные за устойчивость к азитромицину у *N. gonorrhoeae* (NG), и S91F в гиразе A, ответственные за устойчивость к ципрофлоксацину у *N. gonorrhoeae* (NG) в моче, генитальном мазке, жидких цитологических образцах, орофарингеальном (горловом) мазке и аноректальном мазке от лиц с симптомами заболеваний, передающихся половым путем (ЗППП). Allplex™ NG & DR Assay предназначен только для профессионального использования.

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР

1.Принципы

Allplex™ NG & DR Assay использует запатентованную Seegene технологию MuDT™, которая позволяет получать мульти-Ct (пороговый цикл) значения в одном канале флуоресценции без анализа кривой плавления на приборах для ПЦР в реальном времени.

Allplex™ NG & DR Assay — это мультиплексный ПЦР-анализ в реальном времени, позволяющий одновременно амплифицировать и обнаруживать целевые нуклеиновые кислоты *N. gonorrhoeae* (NG) и мутации A2059G и C2611T гене 23S рРНК и S91F в гиразе A с внутренним контролем (ВК). Присутствие специфической последовательности патогена в реакции отражается в виде значения Ct с помощью программы анализа Seegene Viewer. Программное обеспечение Seegene Viewer необходимо для точной интерпретации результатов целевым пользователем. Программное обеспечение может быть предоставлено предполагаемому пользователю агентом или инженером.

Эндогенный ген человека используется в качестве внутреннего контроля (ВК) для мониторинга всего процесса сбора образцов, выделения нуклеиновых кислот и проверки возможного ингибирования ПЦР. Однако из-за несоответствия количества человеческих клеток, содержащихся в моче и аноректальном мазке, ВК экзогенно добавляется только в образцы мочи и аноректального мазка, чтобы служить экзогенным общим контролем процесса.

Чтобы предотвратить появление продуктов амплификации в качестве потенциальных загрязнителей, в Allplex™ NG & DR Assay используется система Uracil-DNA glycosylase (UDG)-dUTP. Система UDG-dUTP обычно используется при проведении ПЦР для устранения переноса ампликонов. UDG вырезает остатки урацила из ДНК путем расщепления N-гликозильной связи.

2.Обзор процедур

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Под заболеваниями, передающимися половым путем (ЗППП), понимается целый ряд клинических синдромов, вызванных патогенными микроорганизмами, которые могут быть приобретены и переданы при сексуальных контактах. Более 30 бактериальных, вирусных и паразитарных патогенов передаются половым путем и вызывают группу инфекций, называемых инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП). Известно, что некоторые ИППП повышают риск заражения ВИЧ и вызывают серьезные последствия, включая инфекции, передающиеся от матери к ребенку, и хронические заболевания.

Гонорея — это инфекция, передающаяся половым путем (ИППП), вызываемая *Neisseria gonorrhoeae* (гонококком), и она является одним из основных приоритетов общественного здравоохранения во всем мире. Широко распространенная устойчивость к противомикробным препаратам (AMR) у штаммов *N. gonorrhoeae* с высокой вариабельностью постоянно ставит под угрозу лечение и контроль гонореи.

Внедрение противомикробной терапии привело к быстрому появлению резистентности к сульфаниламидам, пенициллинам, тетрациклинам, макролидам, фторхинолонам и цефалоспоринам раннего поколения.

Варианты антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* возникают либо через плазмидные, либо через хромосомные механизмы, включая однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) или рекомбинации. Гены устойчивости к азитромицину включают гены 23S рРНК, которые приводят к устойчивости промежуточного или высокого уровня. Устойчивость к ципрофлоксацину наиболее часто обусловлена мутациями в генах *gyrA* и *parC*, кодирующих топоизомеразы II и IV соответственно.

РЕАГЕНТЫ

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 100 реакций.
Информация для заказа (REF SD10367X)

Allplex™ NG & DR Assay			
Символ	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	NGDR MOM	500 мкл	Смесь олиго-компонентов MuDT (MOM): - Реагент для амплификации и обнаружения
PREMIX	SEMX1	500 мкл	- ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (UDG) - Буфер, содержащий dNTPs
CONTROL +	NGDR PC	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогена и IC
CONTROL IC	ASTI IC(2)	1,000 мкл	Экзогенный внутренний контроль (ВК) для образцов мочи и аноректального мазка
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Программное обеспечение для анализа вспомогательных продуктов
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или региональным менеджером.
Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 25 реакций.
Информация для заказа (REF SD10368Z)

Allplex™ NG & DR Assay			
Символ	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	NGDR MOM	125 мкл	Смесь олиго-компонентов MuDT (MOM): - Реагент для амплификации и обнаружения
PREMIX	SEMX1	125 мкл	- ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (UDG) - Буфер, содержащий dNTPs
CONTROL +	NGDR PC	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогена и ВК
CONTROL IC	ASTI IC(2)	250 мкл	Экзогенный внутренний контроль (ВК) для образцов мочи и аноректального мазка
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Программное обеспечение для анализа вспомогательных продуктов
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА

Все компоненты AllplexTM NG & DR Assay следует хранить при температуре ≤ -20°C. Все компоненты стабильны при рекомендуемых условиях хранения до истечения срока годности, указанного на этикетке. Данный продукт можно использовать в течение 30 дней после первого вскрытия набора, и его эффективность не меняется в течение 5 циклов замораживания и размораживания. Если реагенты будут использоваться только периодически, их следует хранить в аликвотах.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ,

- Одноразовые неопудренные перчатки (латексные или нитриловые)
- Пипетки (регулируемые) и стерильные наконечники для пипеток
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл
- Набор для выделения нуклеиновых кислот (см. Выделение нуклеиновых кислот)
- Льдогенератор
- Настольная центрифуга
- Вихревой смеситель
- CFX96™ Система детекции ПЦР в реальном времени (Bio-Rad)
- Система CFX96™ Dx (Bio-Rad)
- Низкопрофильные стрипы на 8 пробирок объемом 0,2 мл без крышек (белый цвет, кат. номер TLS0851, Bio- Rad)
- Оптические плоские полоски на 8 колпачков (кат. номер TCS0803, Bio-Rad)
- Твердая оболочка® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые (кат. № HSP9655, Bio-Rad)
- Hard -Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые, со штрих-кодом (кат. № HSP9955, Bio-Rad)
- Система управления крышкой флакона (кат. № 6600532-01, Hamilton)
- AIOS (кат. номер SG72100, Seegene)
- Прокалываемый колпачок (кат. № 922119, SPL) (только для использования в AIOS)
- Постоянная прозрачная термозапечатка (кат. № 1814035, Bio-Rad)*.
- Уплотнитель пластин для ПЦР PX1 (автоматический уплотнитель, кат. № 181-4000, Bio-Rad) *.
- Чистая место
- Солевой раствор

* Обязательно используйте термозапайку и запайщик пластин, перечисленные выше, вместе.

ПРОТОКОЛ

1.Сбор, хранение и транспортировка образцов

Примечание: Все образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы. Разрешается использовать только те образцы, которые собраны, транспортированы и хранятся в строгом соответствии со следующими правилами и инструкциями.

Образец мочи

Образец генитального мазка

Образец цитологии на основе жидкости

Образец мазка из ротоглотки (горла)

Образец мазка из аноректальной области

Примечание: для обеспечения высокого качества образцов их следует транспортировать как можно быстрее при указанной температуре.

A. Сбор образцов

Образец мочи

- Пациенту следует рекомендовать не мочиться течение как минимум двух часов до взятия образца.
- Соберите 10~30 мл мочи первого сбора в чистый контейнер из полипропилена. Закройте и промаркируйте контейнеры с образцами. Строго соблюдайте инструкции по хранению и транспортировке.

Образец генитального мазка, орофарингеальный (горловой) мазок и образец аноректального мазка

Пожалуйста, используйте следующие материалы:

- Мазки можно собирать и переносить в 1~3 мл следующих сред:
  - ENAT PM 2ML РЕГУЛЯРНЫЙ АППЛИКАТОР (Copan)
  - UTM с флокированными мазками (Copan)

  Примечание: образцы орофарингеального (горлового) мазка и аноректального мазка не были валидированы с помощью UTM с флокированными мазками (Copan).
- Оставьте мазок в транспортной среде. Закройте и промаркируйте контейнер для образца. Строго соблюдайте инструкции по хранению и транспортировке.

- При использовании генитальных мазков следуйте рекомендованному протоколу для сбора клеток столбчатого и сквамозного эпителия после удаления цервикальной слизи.

Цитологический образец на основе жидкости

- Используйте жидкие цитологические среды ThinPrep® (HOLOGIC, США) или SurePath™ (Becton-Dickinson, США) или CellPreserv (Kolplast, Бразилия).
- Следуйте инструкциям производителя по сбору образцов клеток шейки матки в среды ThinPrep®, SurePath™ и CellPreserv.

A. Хранение и транспортировка образцов

<table>
<tr><th colspan="2" rowspan="2">Образец</th><th colspan="2">Хранение и транспортировка</th><th rowspan="2">Примечание</th></tr>
<tr><th>Темп.</th><th>Продолжительность*</th></tr>
<tr><td colspan="2">Образец мочи</td><td>2~8℃</td><td>1 неделя</td><td rowspan="8">- На характеристики может повлиять длительное хранение образцов.
- Образцы также должны соответствовать местным и национальным инструкциям по транспортировке патогенного материала.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Образец генитального мазка</td><td>2~8℃</td><td>1 неделя</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Жидкая цитология</td><td>ThinPrep® средн.</td><td rowspan="2">2~8℃ ** и комнатная температура**.</td><td rowspan="2">90 дней</td></tr>
<tr><td>CellPreserv</td></tr>
<tr><td>SurePath™ средн.</td><td>2~8℃</td><td>2 недели</td></tr>
<tr><td colspan="2">Орофарингеальный (горловой) тампон</td><td>2~8℃</td><td>3 дня</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">Аноректальный мазок</td><td>2~8℃</td><td>2 дня</td></tr>
<tr><td>-20℃</td><td>1 месяц</td></tr>
</table>

* Продолжительность: период времени от сбора образцов до окончательного испытания (включая транспортировку и хранение образцов до испытания).

** Оптимальная температура для транспортировки составляет 2~25℃.

2. Выделение нуклеиновых кислот

A. Предварительная обработка образца

Примечание: Процесс предварительной обработки для выделения нуклеиновых кислот одинаков как для ручной, так и для автоматизированной системы выделения.

Генитальный мазок, орофарингеальный (горловой) мазок и образцы аноректального мазка

- Генитальный мазок, орофарингеальный (горловой) мазок и аноректальный мазок используются без предварительной обработки.

Примечание: Орофарингеальный (горловой) мазок не был валидирован с SEEPREP32 и Maelstrom ™ 9600.

Примечание: Аноректальный мазок не был проверен с помощью SEEPREP32.

Цитологические образцы мочи и жидкости

- Уравновесьте образцы при комнатной температуре (19~25℃).
- Центрифугируйте 1 мл мочи и образца цитологии на основе жидкости в течение 15 минут при 15 000 x*g* (13 000 об/мин).
- После отбрасывания супернатанта гранулы необходимо ресуспендировать в солевом растворе в рекомендуемом объеме (см. рекомендуемый объем в п. 2.C), тщательно интенсивно перемешивая.

Примечание: если образцы собраны в среде SurePath™ и будут экстрагироваться с помощью Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS или Seegene STARlet, проведите этап предварительной обработки, используя буфер для лизиса из набора для экстракции, а не физиологический раствор.

Примечание: Мочу и среду ThinPrep® можно обрабатывать без предварительной обработки при использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet или Seegene STARlet 96MPH.

Примечание: SurePath™ можно обрабатывать без предварительной обработки при использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS или Seegene STARlet.

Примечание: Моча, ThinPrep® без предварительной обработки не была валидирована с наборами QIAamp® DSP DNA Mini Kit, QIAamp® DNA Mini Kit, Ribo_spin vRD kit и SEEPREP32.

Примечание: SurePath™, используемый после предварительной обработки, не был проверен с набором STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C и набором STARMag™ S96H N.

Примечание: SurePath™ без предварительной обработки не был проверен с наборами QIAamp® DSP DNA Mini Kit и QIAamp® DNA Mini Kit.

Примечание: SurePath™ не был проверен с набором Ribo_spin vRD, SEEPREP32 и Maelstrom ™ 9600.

Примечание: CellPreserv не требует предварительной обработки.

- Следуйте протоколу производителя.

A. Внутренний контроль

Примечание: для образцов, кроме мочи и аноректального мазка, в качестве внутреннего контроля используется эндогенный ген. Добавление ВК не требуется.

Примечание: ВК, входящий в состав набора, позволяет пользователю не только подтвердить правильность процедуры выделения нуклеиновых кислот, но и выявить любое ингибирование ПЦР.

- Для образцов мочи и аноректального мазка пробирка ASTI IC(2) должна быть загружена в Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet или Seegene STARlet 96MPH перед процессом выделения нуклеиновых кислот.
- Для образцов мочи и аноректального мазка перед выделением нуклеиновой кислоты в каждый образец необходимо добавить ASTI ВК (2).

A.Автоматизированная система выделения нуклеиновых кислот

Примечание: пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. Для других объемов см. протокол производителя.

C-1. Microlab NIMBUS IVD

Примечание: См. руководство по эксплуатации Microlab NIMBUS IVD.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
STARMag 96 X 4 Универсальный Комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
STARMag 96 X 4 Набор вирусных ДНК/РНК 200 C**	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл

* Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

** SurePath™, используемый после предварительной обработки, не был валидирован с набором STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C.

C-2. Microlab STARlet IVD

Опция: Система предварительного анализа (см. эксплуатации системы управления крышками флаконов)

Автоматизированная система предварительного анализа	Производитель	Кат. №.
Система управления крышками флаконов	Hamilton	6600532-01*

* Если вы приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

Примечание: См. руководство по эксплуатации Microlab STARlet IVD.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №..	Рекомендуемый обьем.
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
STARMag 96 X 4 Универсальный Комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
STARMag 96 X 4 Набор вирусных ДНК/РНК 200 C**	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл

* Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

** SurePath™, используемый после предварительной обработки, не был валидирован с набором STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C.

C-3. Seegene NIMBUS

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene NIMBUS.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №..	Рекомендуемый обьем.
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Универсальный Комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
STARMag 96 X 4 Набор для определения вирусной ДНК/РНК 200 C*	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл

* SurePath™, используемый после предварительной обработки, не был валидирован с набором STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C.

C-4. Seegene STARlet

Опция: Система предварительного анализа (см. эксплуатации системы управления крышками флаконов)

Автоматизированная система предварительного анализа	Производитель	Кат. №.
Система управления крышками флаконов	Hamilton	6600532-01*

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

Опция: Автоматизированная структура связей (см. эксплуатации AIOS)

Автоматизированная структура связей	Производитель	Кат. №.
AIOS	Seegene	SG72100

Примечание: замените колпачок положительного контроля (ПК) на колпачок с возможностью прокалывания. После завершения операции замените колпачок положительного контроля (ПК) оригинальным колпачком.

Примечание: Прокалываемый колпачок является одноразовым изделием и подлежит утилизации после одного использования.

Примечание: при использовании с AIOS этот продукт может быть использован максимум для 3 отдельных запусков.

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene STARlet.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
STARMag 96 X 4 Универсальный Комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
STARMag 96 X 4 Набор для определения вирусной ДНК/РНК 200 C*	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
Набор STARMag™ S96H**	Seegene	EX00032P EX00033P EX00034P EX00035P	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
Набор STARMag™ S96H N Kit***	Seegene	EX00036P EX00037P	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл

*,*** SurePath™, используемый после предварительной обработки, не был валидирован с набором STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C и набором STARMag™ S96H N.

** SurePath™ и орофарингеальный (горловой) мазок не были проверены с помощью STARMag™

Набор S96H.

,* Наборы STARMag™ S96H Kit и STARMag™ S96H N Kit разработаны и проверены для использования с конфигурацией Seegene STARlet с CO-RE 96 Probe Head и Seegene STARlet 96MPH.

C-5. Seegene STARlet 96MPH

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene STARlet 96MPH.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Seegene STARlet 96MPH	Seegene	SG71101	-
Набор STARMag™ S96H*	Seegene	EX00032P EX00033P EX00034P EX00035P	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл
Набор STARMag™ S96H N**	Seegene	EX00036P EX00037P	Образец: 300 мкл Элюирование: 60 мкл

* SurePath™ и орофарингеальный (горловой) мазок не были валидированы с набором STARMag™ S96H.

** SurePath™, используемый после предварительной обработки, не был проверен с набором STARMag™ S96H N

C-6. SEEPREP32

- Продолжите процесс экстракции, используя **"Про-протокол А".**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	Seegene	EX00009P	Образец: 200 мкл* Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	Seegene	EX00009T	Образец: 200 мкл* Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	Seegene	EX00017P	Образец: 200 мкл* Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	Seegene	EX00017T	Образец: 200 мкл* Элюирование: 100 мкл

* В образец мочи ресуспендируйте гранулу 200 мкл физиологического раствора и добавьте 10 мкл ASTI внутреннего контроля (2).

Примечание: моча, ThinPrep® без предварительной обработки не была валидирована с SEEPREP32.

Примечание: SurePath™, орофарингеальный (горловой) мазок и аноректальный мазок не были валидированы с SEEPREP32.

C-7. Maelstrom™ 9600

- Продолжите процесс извлечения, используя **'STARMAGM96'.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Maelstrom™ 9600	Taiwan Advanced Nanotech Inc	M9600*	-
Набор STARMag™ M96	Seegene	EX00029P EX00030P	Образец: 200 мкл** Элюирование: 100 мкл

Примечание: SurePath™ и орофарингеальный (горловой) мазок не были валидированы с Maelstrom™ 9600.

* Если вы хотите приобрести этот продукт у Seegene Inc., пожалуйста, используйте этот каталожный номер.

** Добавьте 10 мкл ASTI BK (2) в образец аноректального мазка и образец мочи.

D. Наборы для выделения нуклеиновых кислот вручную

Примечание: пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. Для других объемов см. протокол производителя.

Набор для извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
QIAamp® DSP DNA Mini Kit	QIAGEN	61304	Образец: 200 мкл**** Элюирование: 50 мкл
QIAamp® DNA Mini Kit*	QIAGEN	51304	Образец: 200 мкл**** Элюирование: 50 мкл
Рибоспин vRD** (Набор для выделения вирусной РНК/ДНК)	GeneAll	302-150 SG1701***	Образец: 200 мкл**** Элюирование: 50 мкл

* На этапе лизиса используйте 180 мкл ATL-буфера вместо AL-буфера в случае использования среды SurePathTM.

** Набор Ribo-spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction) не совместим со средами SurePath™.

*** Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

**** Добавьте 10 мкл ASTI BK (2) в образец аноректального мазка и предварительно обработанный образец мочи (т.е. ресуспендируйте гранулу в 200 мкл физиологического раствора)

Примечание: Моча, ThinPrep® без предварительной обработки не была проверена с QIAamp® DSP DNA Mini Kit, QIAamp® DNA Mini Kit и Ribo-spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction Kit).

Примечание: Surepath™ без предварительной обработки не был проверен с QIAamp® DSP DNA Mini Kit и QIAamp® DNA Mini Kit.

E.Резюме

	Автоматизированная система извлечения											Комплекты для ручного извлечения	
Образцы	Microlab NIMBUS IVD / STARlet IVD*		Seegene NIMBUS / STARlet*				Seegene STARlet 96MPH		SEEPREP32		Maelstrom™ 9600	Мини-набор QIAamp® DSP DNA	Ribo_ spin vRD
	Универсальный набор картриджей	Набор вирусной ДНК/РНК 200 C	Универсальный набор картриджей	Набор вирусной ДНК/РНК 200 C	Набор S96H*	НаборS96H N**	Набор S96H*	Набор S96H N**	STARMag 96 ProPrep	STARMag 96 ProPrep C			
Моча (с предварительной обработкой)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Моча (без предварительной обработки)	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O	X	X
Мазок из половых органов (ENAT)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Мазок из Половых органов (UTM)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
ThinPrep® (с предварительной обработкой)	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
ThinPrep® (без предварительной обработки)	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O	X	X
Surepath™ (с предварительной обработкой)	O	X	O	X	X	X	X	X	X	X	X	O	X
Surepath™ (без предварительной обработки)	O	O	O	O	X	O	X	O	X	X	X	X	X
CellPreserv	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Мазок из ротоглотки (горла)	O	O	O	O	X	O	X	O	X	X	X	O	O
Аноректальный тампон	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O	O	O

* Дополнительно: AIOS можно использовать с Seegene STARlet.

** Набор STARMag™ S96H и набор STARMag™ S96H N разработаны и проверены для использования с конфигурацией Seegene STARlet with CO-RE 96 Probe Head и Seegene STARlet 96MPH.

3. Подготовка к ПЦР в реальном времени

Примечание: необходимо использовать правильные пробирки и колпачки (см. раздел МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НУЖНЫ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЕНЫ).

Примечание: при подготовке реакций ПЦР необходимо использовать устойчивые к воздействию аэрозолей фильтрующие насадки и плотные перчатки. Будьте предельно осторожны, чтобы предотвратить перекрестное загрязнение.

Примечание: полностью разморозьте все реагенты на льду.

Примечание: кратковременно прокрутите пробирки с реагентами, чтобы собрать остатки капель внутри крышки или уплотнения.

Примечание: Этапы A~D выполняются автоматически на Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH. См. каждое эксплуатации.

A. Приготовьте мастер-микс для ПЦР.

5 мкл	NGDR MOM
5 мкл	SEMX1
5 мкл	Вода, не содержащая РНКаз
15 мкл	Общий объем мастермикса для ПЦР

Примечание: Рассчитайте общее количество каждого реагента, исходя из количества реакций, включая образцы и контроль.

B. Быстро интенсивно перемешайте и ненадолго опустите.

C. Аликвотируйте 15 мкл ПЦР-мастермикса в пробирки для ПЦР.

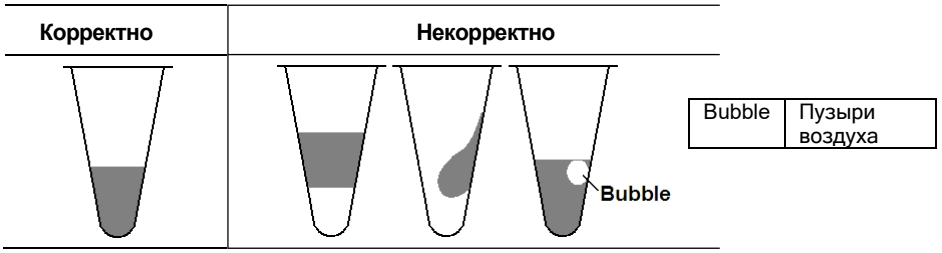
D. Добавьте 5 мкл нуклеиновых кислот каждого образца в пробирку с мастермиксом для ПЦР.

15 мкл	Мастермикс для ПЦР
5 мкл	Нуклеиновая кислота образца
20 мкл	Общий объем реакции

E. Закройте и ненадолго прокрутите пробирки для ПЦР.

F. Убедитесь, что жидкость, содержащая все компоненты ПЦР, на дне каждой пробирки для ПЦР. Если это не так, повторите центрифугирование при более высокой скорости вращения в течение более длительного времени.

Примечание: перед проведением ПЦР рекомендуется центрифугировать пробирки, чтобы удалить пузырьки воздуха и собрать остатки жидкости на дне пробирок.



Примечание: для каждого образца используйте новый стерильный наконечник пипетки.

Примечание: для **отрицательного контроля (ОК)** используйте 5 мкл воды без РНК вместо нуклеиновой образца.

Примечание: для **положительного контроля (ПК)** используйте 5 мкл ПК NGDR вместо нуклеиновой кислоты образца.

Примечание: пожалуйста, будьте осторожны, не допускайте перекрестного загрязнения Мастермикса ПЦР и образцов с положительным контролем.

Примечание: не маркируйте реакционную пробирку на ее крышке. Флуоресценция обнаруживается в верхней части каждой реакционной пробирки.

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

1.CFX96TM Система детекции ПЦР в реальном времени (CFX ManagerTM Software-IVD v1.6)

1.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96TM Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) может быть разделена на три этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск.

A. Настройка протокола

1) В главном меню выберите **File (Файл)→New (Новый)→Protocol (Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор протоколов)**.

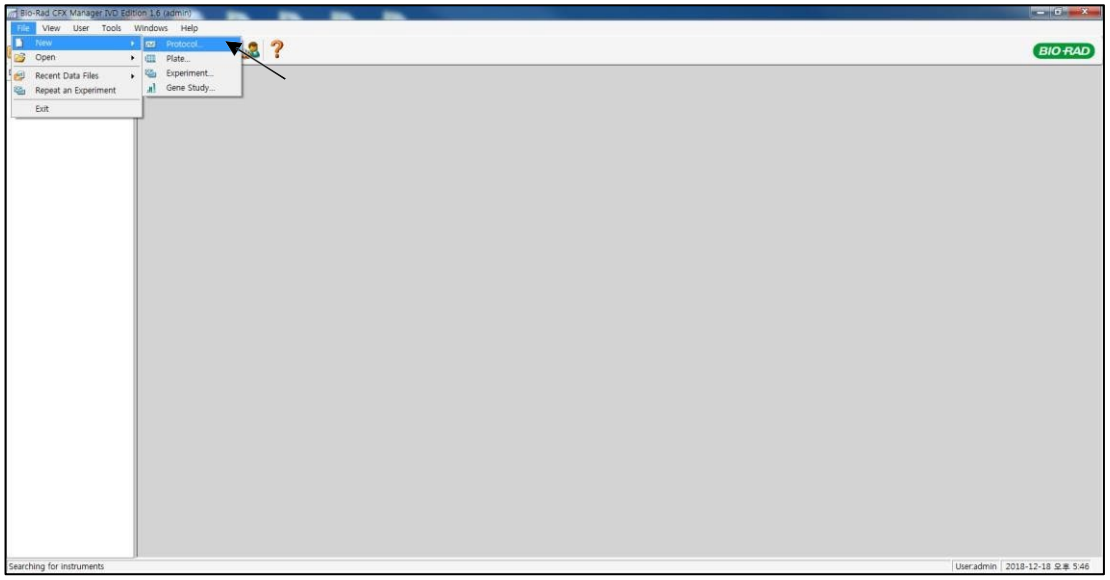


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **редакторе протоколов** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	95 C°	15мин
2	45	95 C°	3 сек
3*		60 C°	10 сек
4*		72 C°	10 сек
5	GOTO Шаг 2, еще 44 раза		

Примечание*: Считывание планшета на шаге 3 и 4. Флуоресценция определяется при 60°C и 72°C.

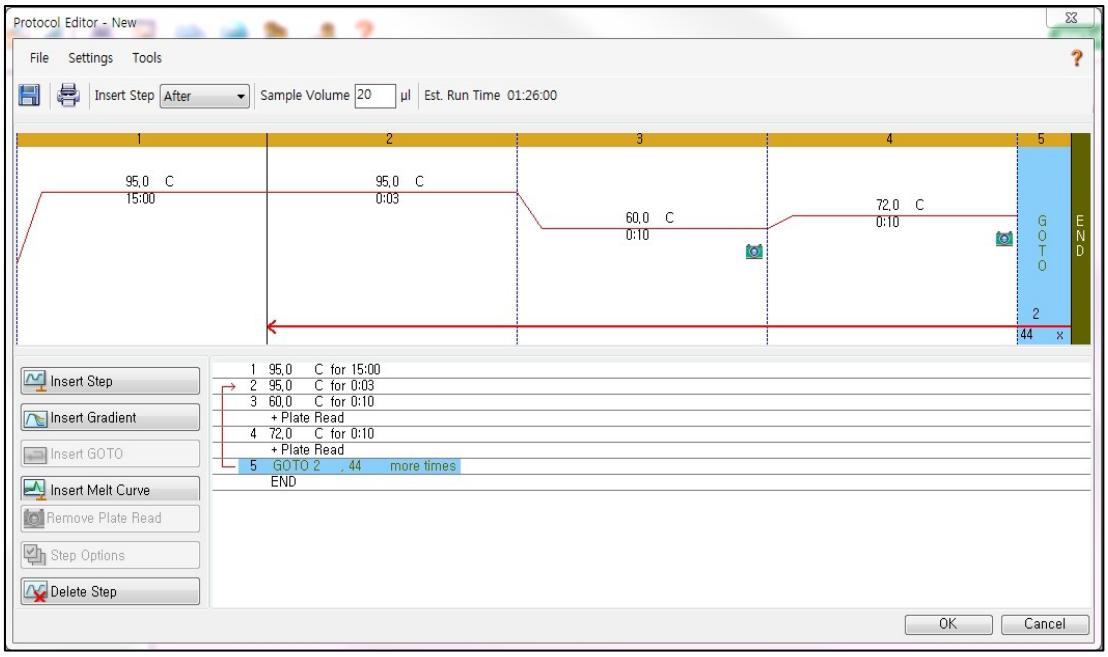


Рис. 2. **Редактор протоколов**

3) Щелкните на поле рядом с **Sample Volume** (**Объем образца)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл
4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Experiment setup (Настройка эксперимента)**.

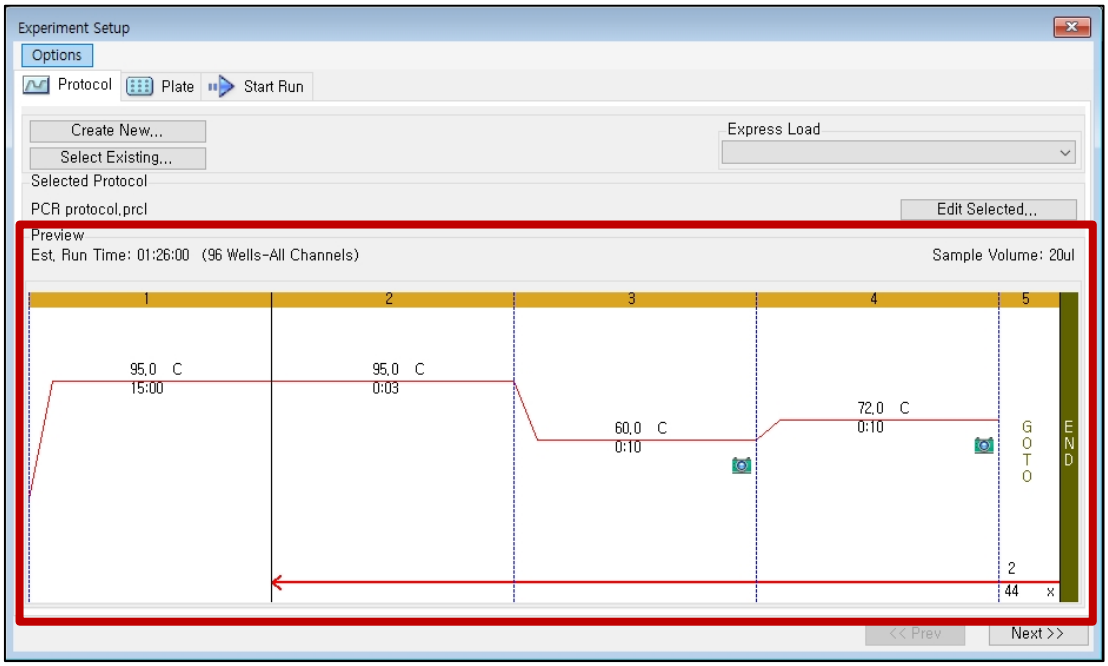


Рис. 3. **Экспериментальная установка: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **Plate** (**Планшет**) в **Experiment Setup (Настройка эксперимента)** нажмите **Create New (Создать новый)**, чтобы открыть окно **Plate Editor (Редактор планшета).**

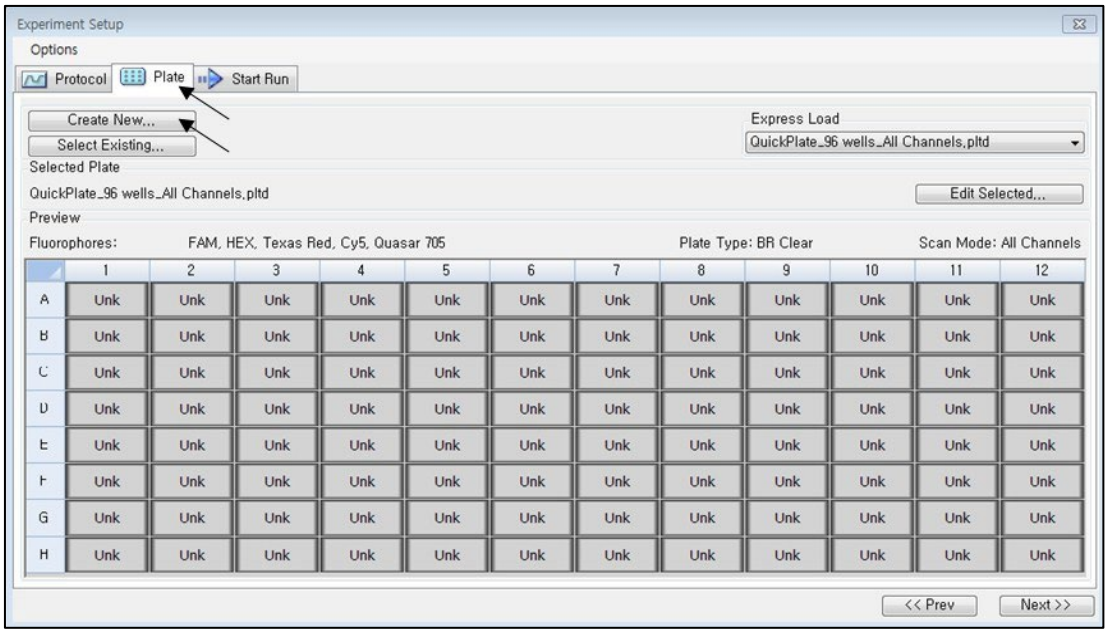


Рис. 4. **Редактор планшета**

2) Нажмите **Select Fluorophores** (**Выбрать флуорофоры)**, чтобы указать флуорофоры (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), которые будут использоваться, и нажмите **OK.**

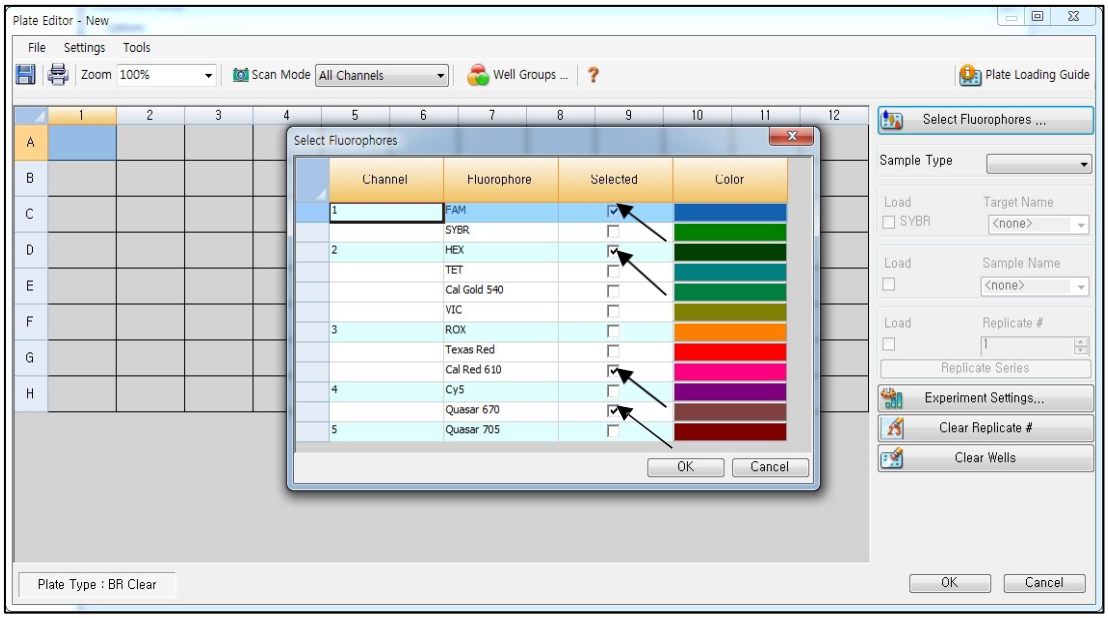


Рис. 5. **Выбор флуорофоров** (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**)

3) Выберите лунки, в которые будет помещена пробирка ПЦР, и выберите тип образца из списка Раскрывающегося меню **Sample Type** (**Тип образца**).

Неизвестный: Клинические образцы

Отрицательный контроль

Положительный контроль

4) Щелкните по соответствующим флажкам (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **Sample Name (Имя образца)** и нажмите клавишу ввода.

6) В разделе **Settings** (**Настройки)** главного меню **Plate Editor (Редактора Планшетов)** выберите **Plate Size (96 wells)** (**Размер Планшета (96 лунок)** и **Plate Type (BR White) Тип Планшета (BR белый).**

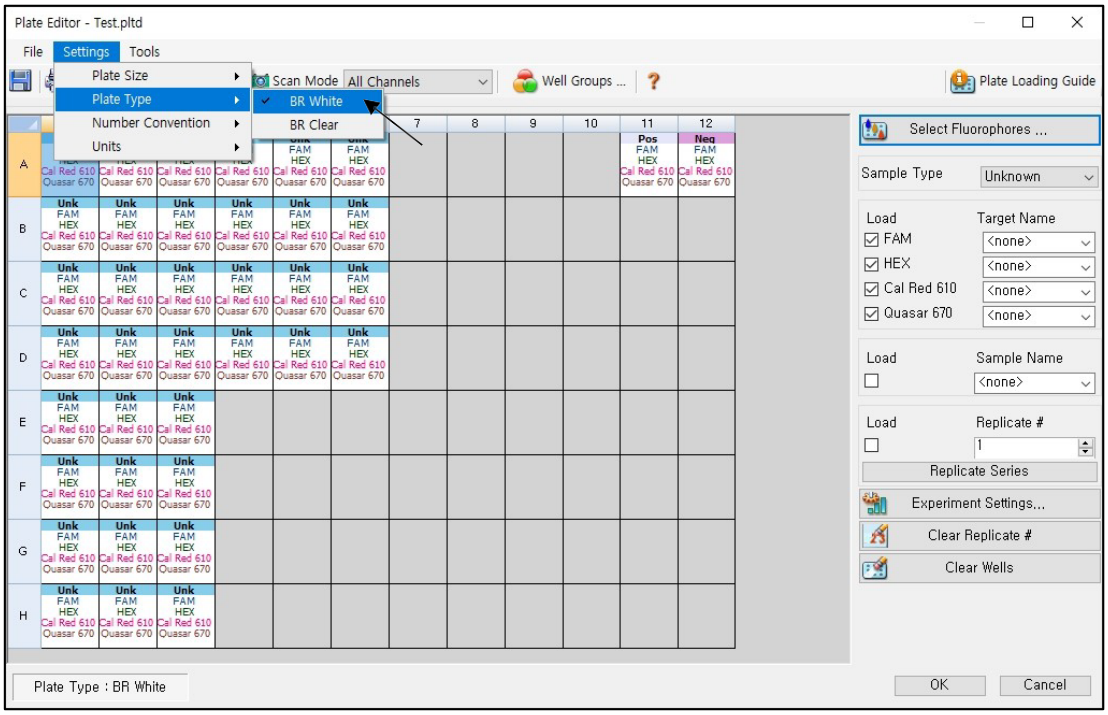


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **OK,** чтобы сохранить новую пластину.

8) Вы вернетесь в окно **Experiment Setup (Настройки Эксперимента)**.

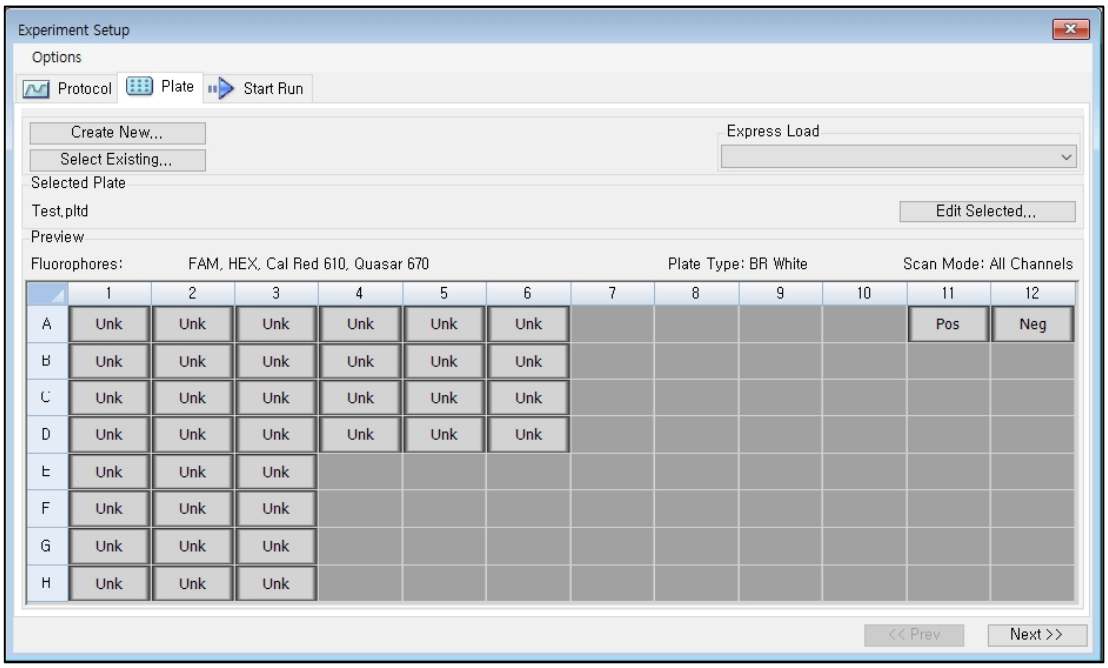


Рис. 7. **Экспериментальная установка: Планшет**

9)Нажмите кнопку **Next (Далее)**, чтобы начать выполнение.

C.Начать запуск

1) На вкладке **Start Run (Начать Запуск)** в разделе **Experiment Setup (Настройка Эксперимента)** нажмите **Close Lid (Закрыть Крышку)**, чтобы закрыть крышку прибора.

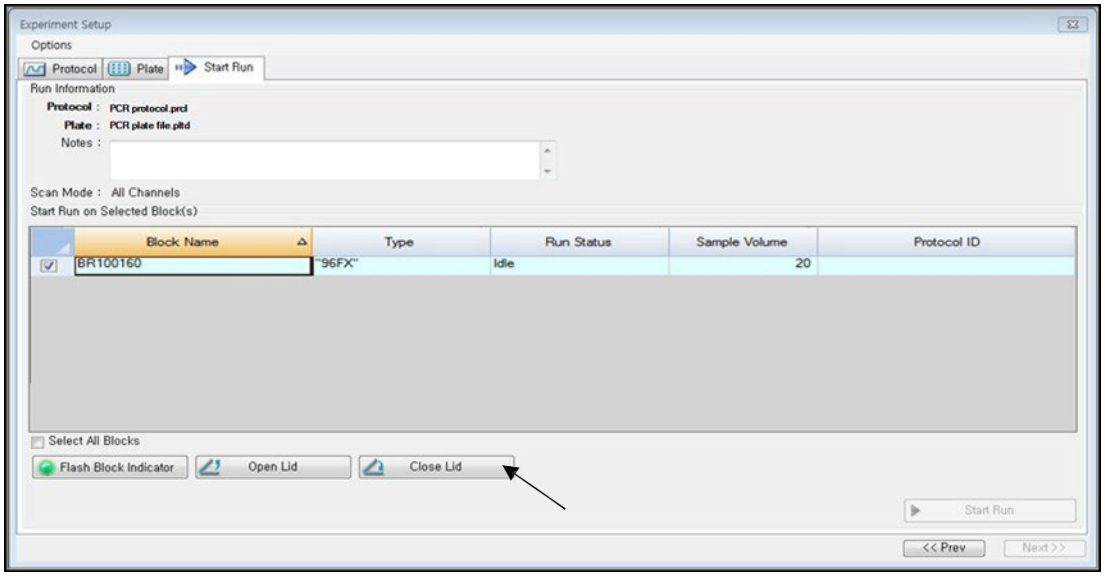


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2) Нажмите кнопку **Start Run (Начать Запуск)**.

3) Сохраните файл запуска в папке "Мои документы" или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **SAVE** (**Сохранить)**, и запуск начнется.

1.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные для всех этапов определения кривой амплификации в файле результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть любым по желанию пользователя (Для функции "'Экспорт Seegene " автоматически создаются папки "QuantStep3" и "QuantStep4" для сохранения данных каждой кривой амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX Manager™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **Quantitation (Количественная оценка)**, чтобы подтвердить результаты кривой амплификации.

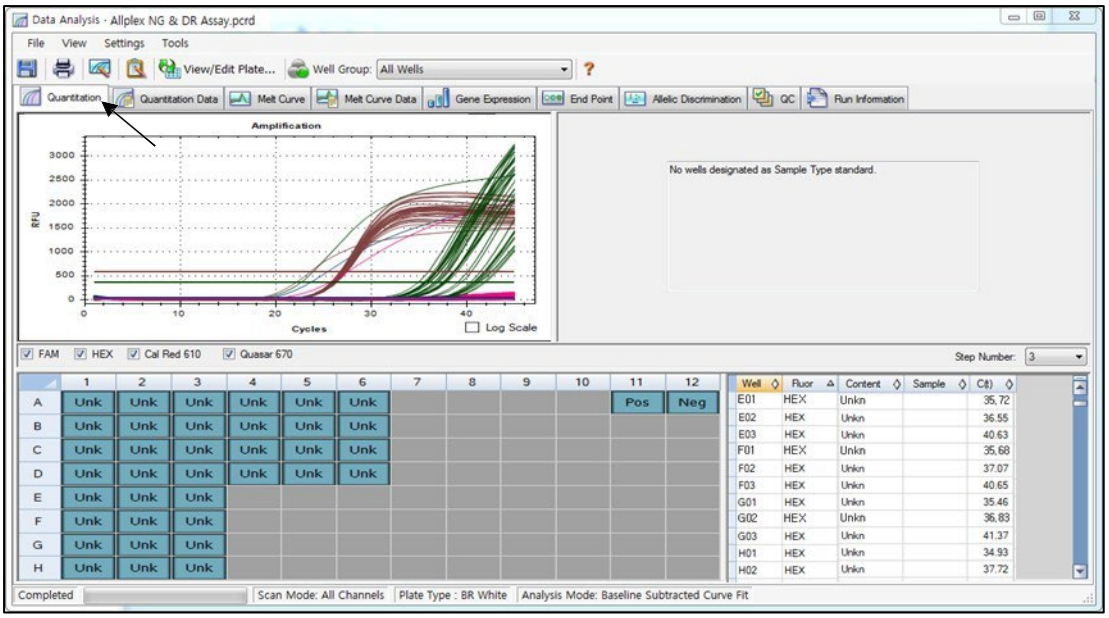


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

2) Выберите **No Baseline Subtraction (Без вычитания базовой линии)** в пункте Analysis Mode (Режим Анализа) Settings Menu (меню Настройки).

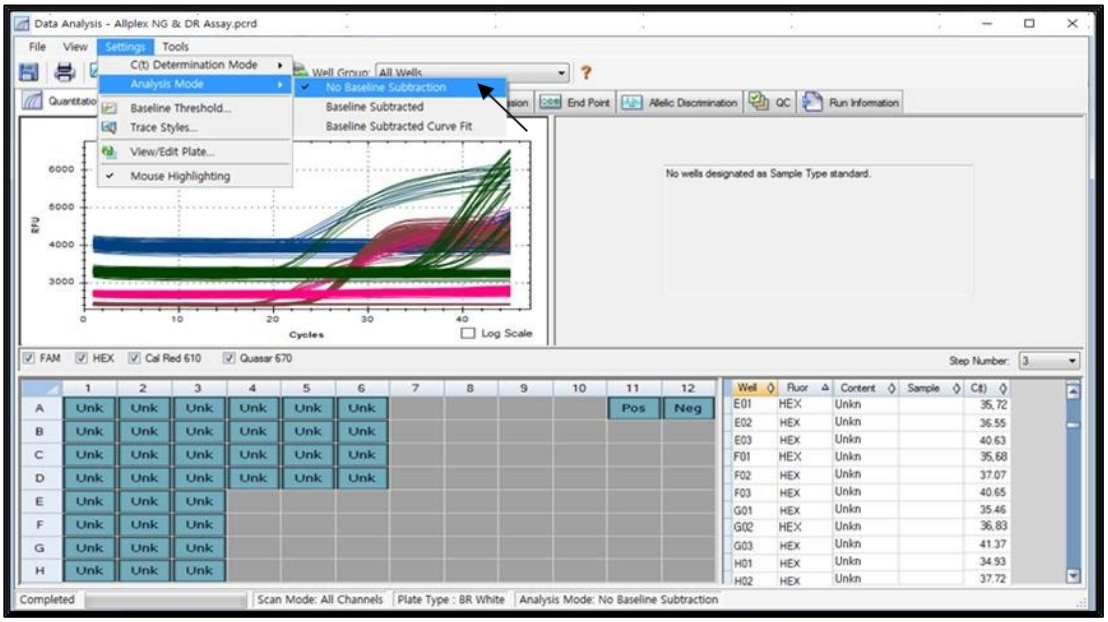


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите **Seegene Export** (**Экспорт Seegene)** в Tools menu (меню Инструменты).

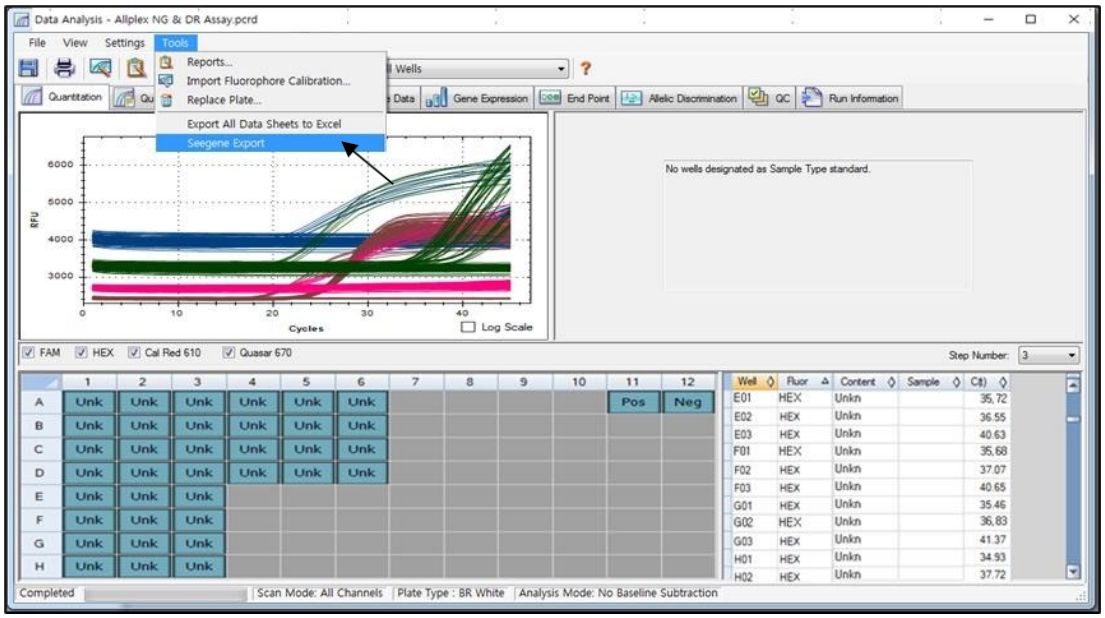


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

4) Выберите место для сохранения данных и нажмите **OK**.

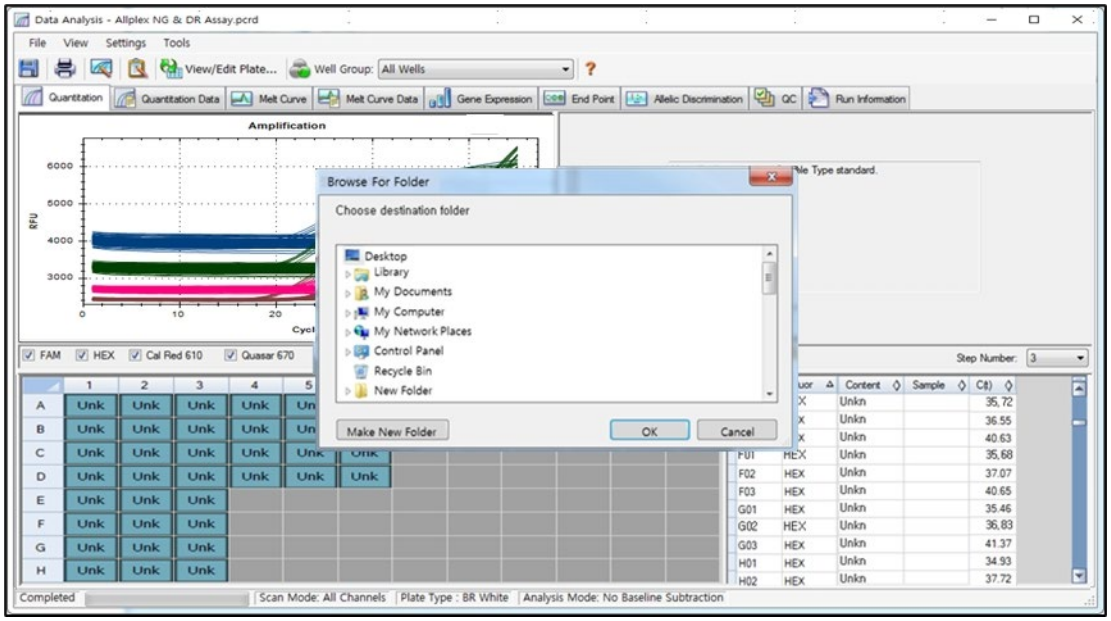


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте Seegene Viewer и нажмите **Option** (**Параметры**), чтобы выбрать **CFX96** в **Instrument (Инструмент).**

Рис. 13. **Seegene Viewer**

1) Нажмите кнопку **Open** (**Открыть)**, чтобы найти сохраненный файл в папке "QuantStep3", откройте файл результатов и выберите тестовый набор в меню **PRODUCT (ПРОДУКТ).**

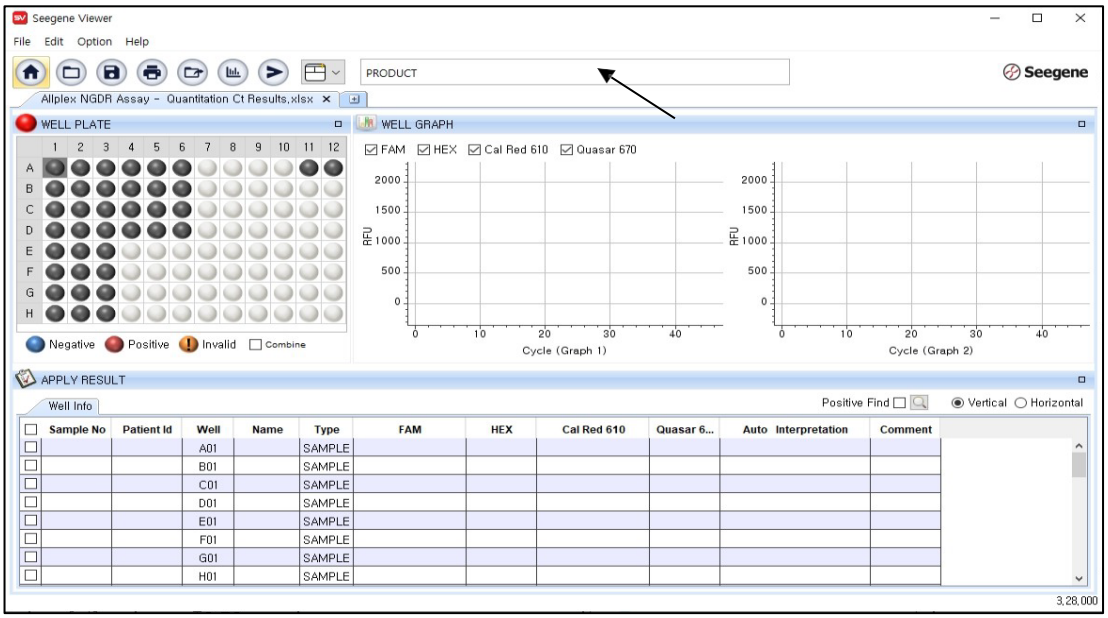


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

2) Проверьте результат для каждой лунки.

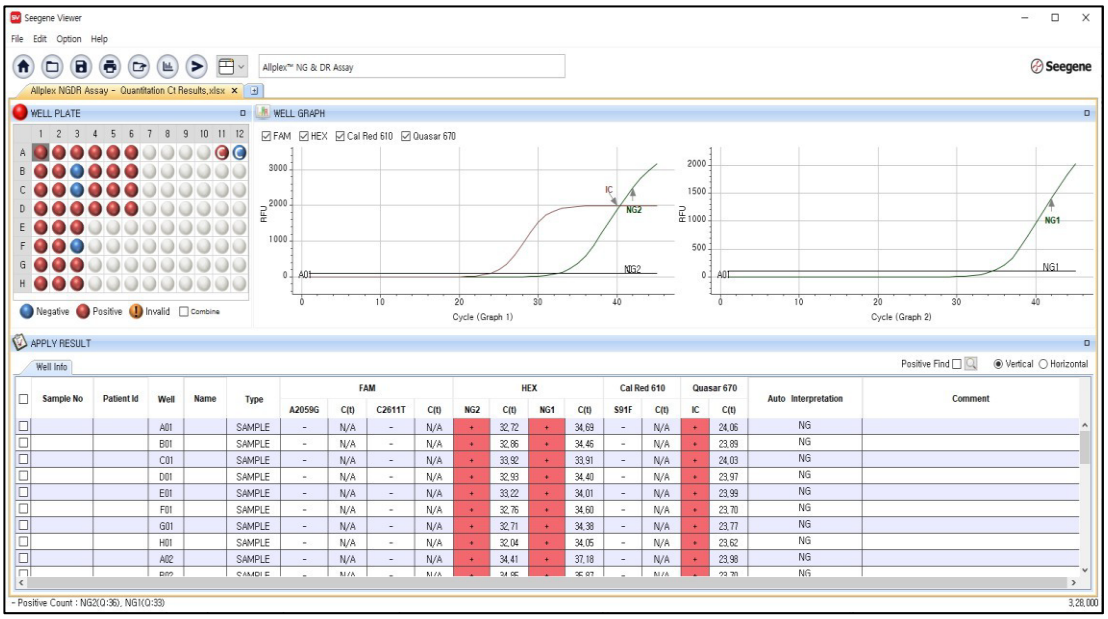


Рис. 15. **Результат тестирования в программе Seegene Viewer**

3) Критерии валидности результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для подтверждения достоверности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и ОК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие критерии:

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer						
	FAM (Ct)		HEX (Ct)		Cal Red 610 (Ct)	Quasar670 (Ct)	Автоинтерпретация
	A2059G	C2611T	NG2	NG1	S91F	IC	
Положительный контроль	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 45	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Отрицательный контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае нарушения валидности результаты пробы не следует интерпретировать или сообщать, а необходимо повторить запуск.

2 Система CFX96TM Dx (программное обеспечение CFX ManagerTM Dx v3.1)

2.1 Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96TM Dx System (Bio-Rad) может быть разделена на три этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск.

A. Настройка протокола

1)) В главном меню выберите **File (Файл)**→ **New** (**Новый)**→ **Protocol (Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор протокола)**.

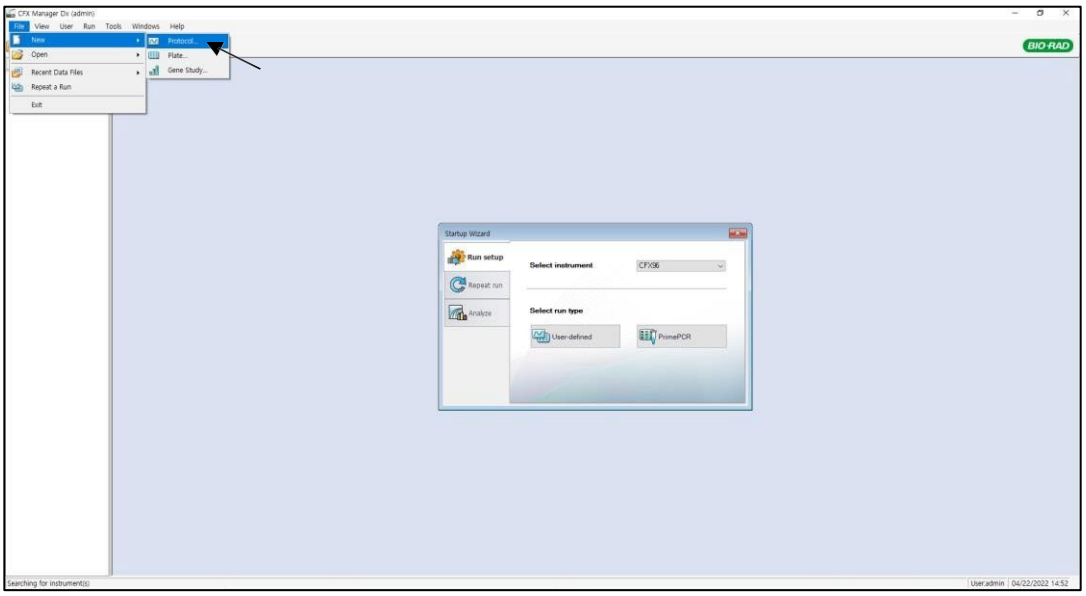


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **Protocol Editor** (**Редакторе Протоколов)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	95 C°	15мин
2	45	95 C°	3 сек
3*		60 C°	10 сек
4*		72 C°	10 сек
5	GOTO Шаг 2, еще 44 раза		

Примечание*: Считывание планшета на шаге 3 и 4. Флуоресценция определяется при 60°C и 72°C.

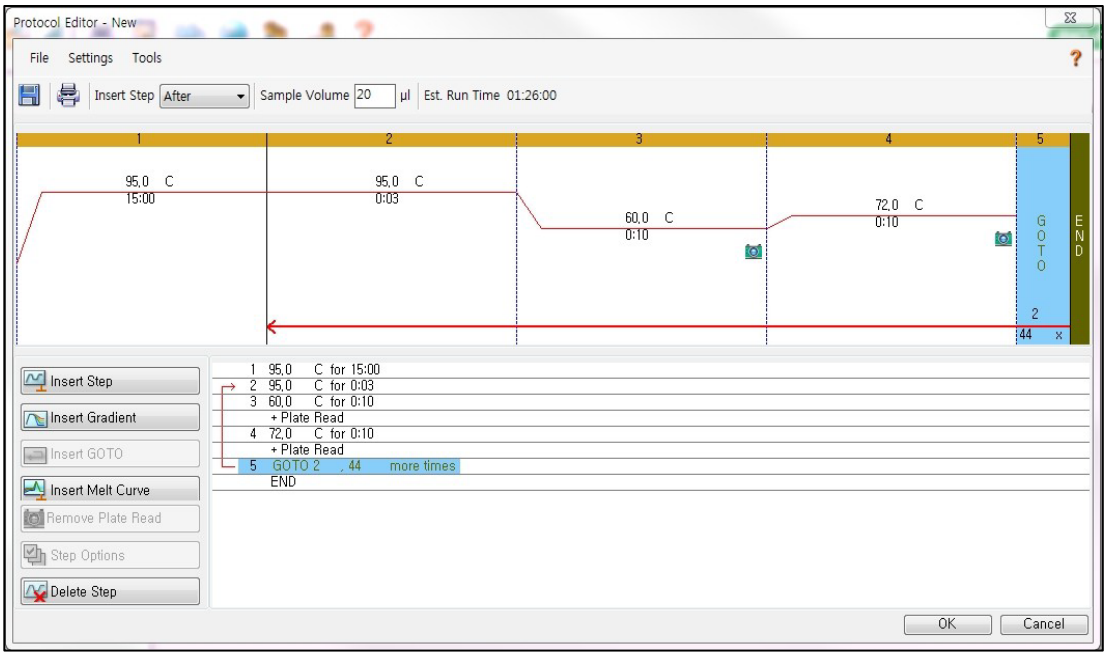


Рис. 2. **Редактор протоколов**

3) Щелкните на поле рядом с **Sample Volume** (**Объем образца)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл

4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Run Setup (Настройка запуска)**.

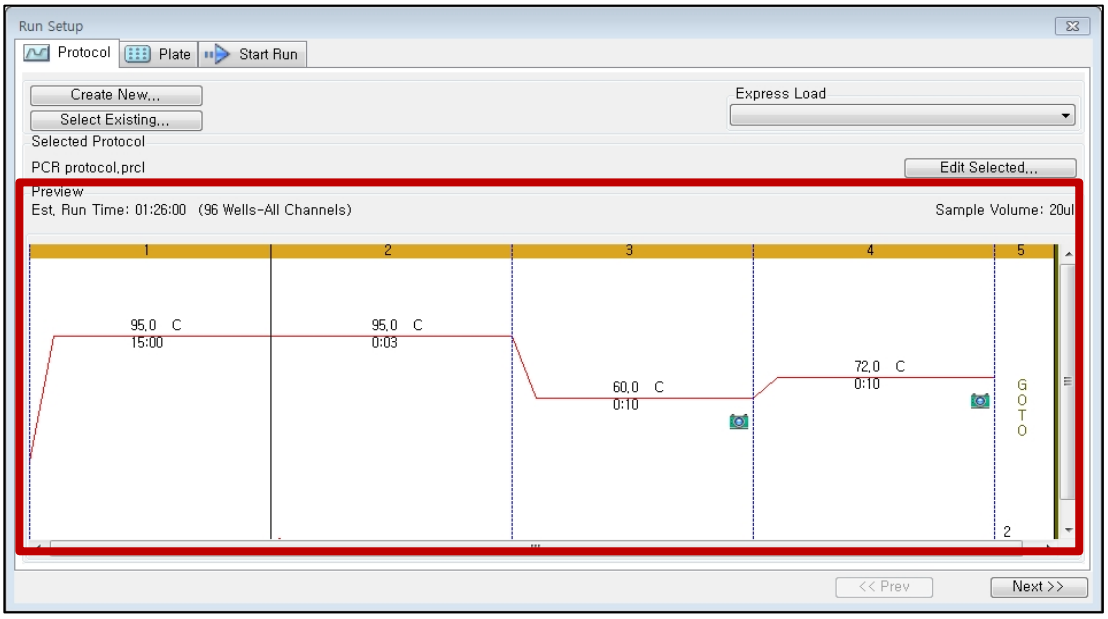


Рис. 3. **Настройка запуска: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **Plate (Планшет)** в **Run Setup** (**Настройка запуска)** нажмите **Create New (Создать новый)**, чтобы открыть окно **Plate Editor (Редактор планшета).**

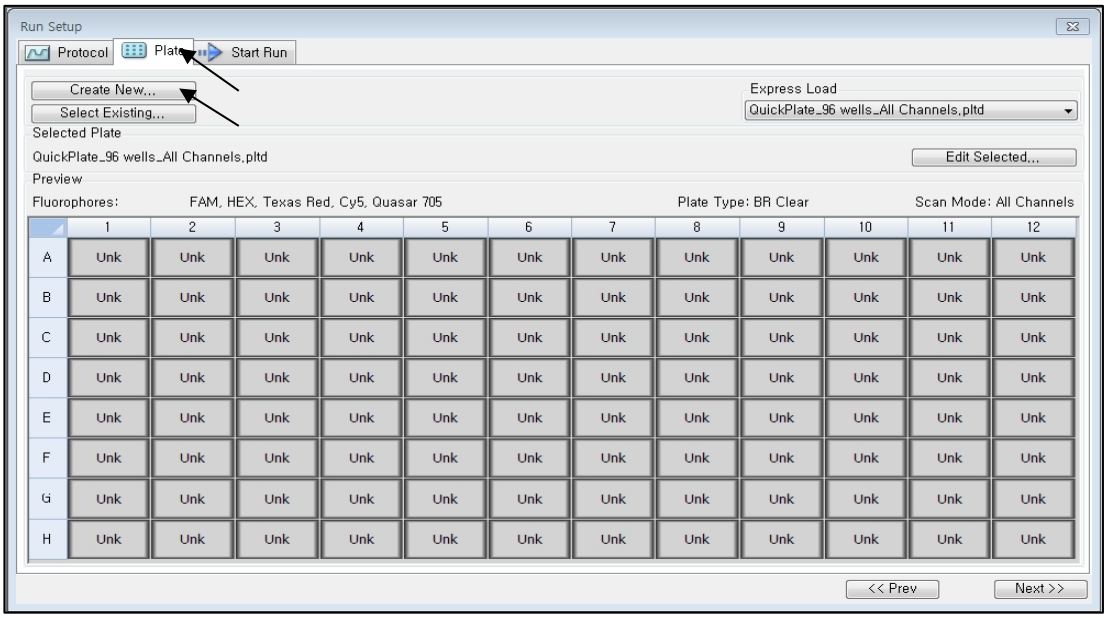


Рис. 4. **Редактор планшета**

2)Нажмите кнопку **Select Fluorophores (Выбрать флуорофоры),** чтобы указать флуорофоры (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610***, ***Quasar 670, Quasar 705***), которые будут использоваться, и нажмите **OK.**

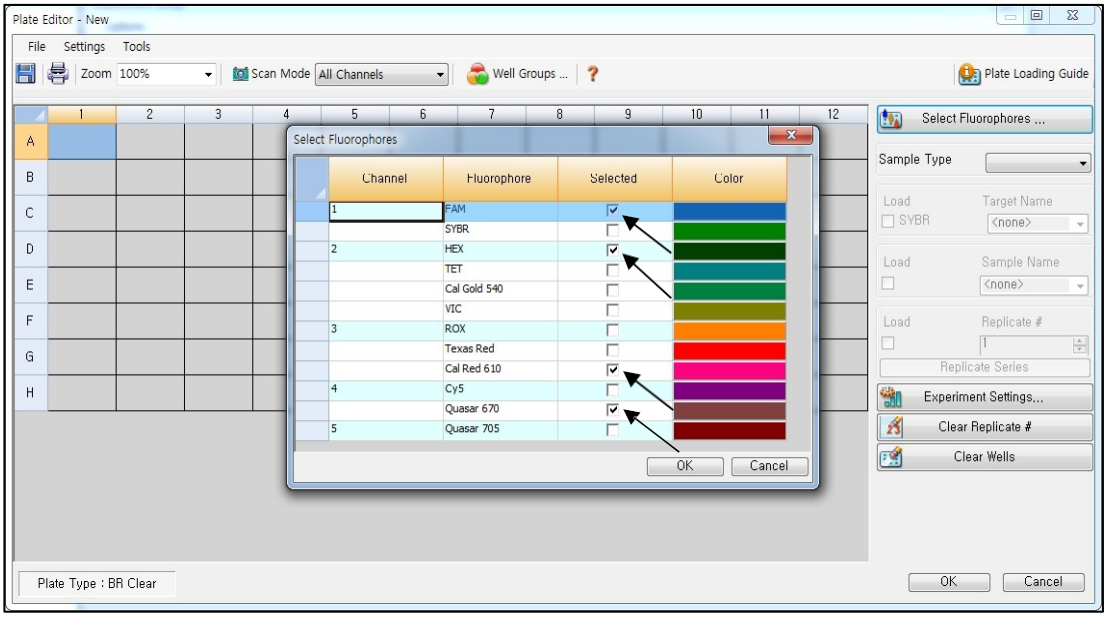


Рис. 5. **Выбор флуорофоров** (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**)

3)Выберите лунки, в которые будет помещена пробирка ПЦР, и выберите тип образца из списка раскрывающегося меню **Sample Type** (**Тип Образца)**.

Неизвестный: Клинические образцы

Отрицательный контроль

Положительный контроль

4)Щелкните по соответствующим флажкам (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **Sample Name (Имя Образца)** и нажмите клавишу ввода.

6) В разделе **Settings (Настройки)** главного меню **Plate Editor** (**Редактора Планшетов)** выберите **Plate Size (96 wells) (Размер Планшета (96 лунок)** и **Plate Type (BR White) (Тип Планшета (BR белый).**

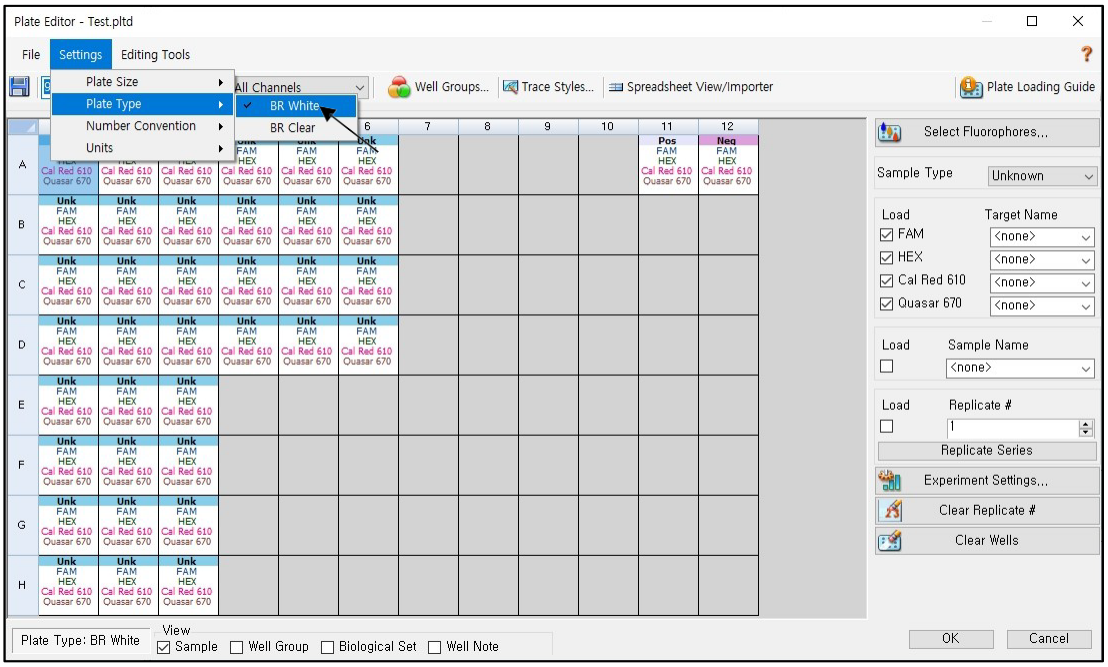


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **OK,** чтобы сохранить новый планшет.

8) Вы вернетесь в окно **Run Setup (Запуск Программы Установки).**

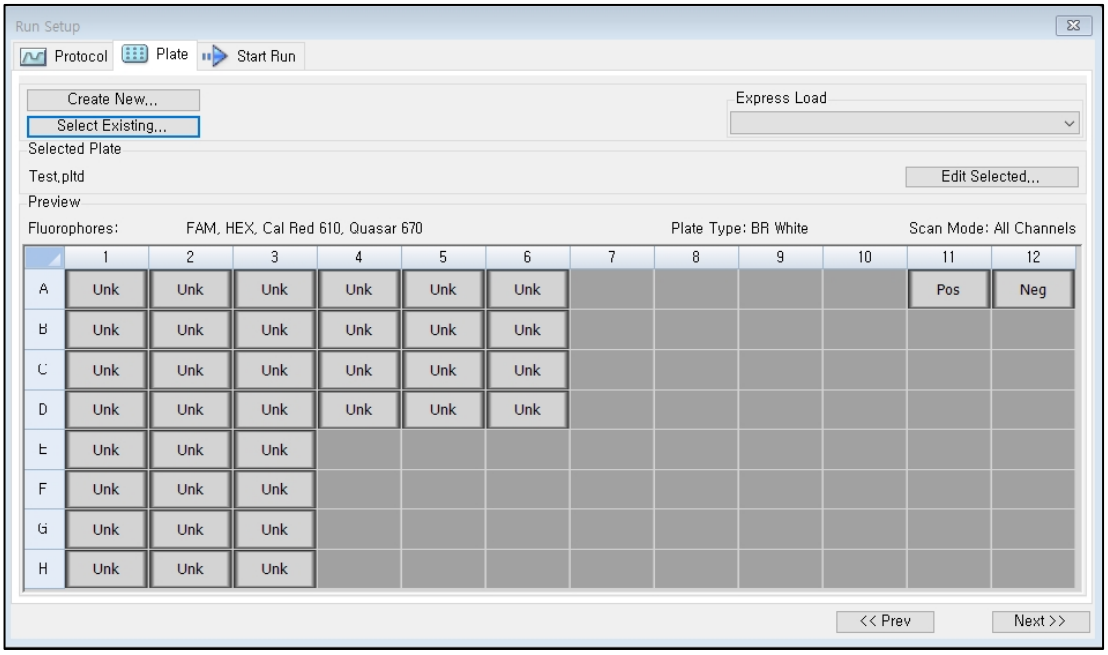


Рис. 7. **Настройка запуска: Планшет**

9) Нажмите кнопку **Next (Далее)**, чтобы начать выполнение.

C. Начать запуск

1) На вкладке **Start Run (Начать запуск)** в разделе **Run Setup (Настройка запуска)** нажмите **Close Lid (Закрыть крышку)**, чтобы закрыть крышку прибора

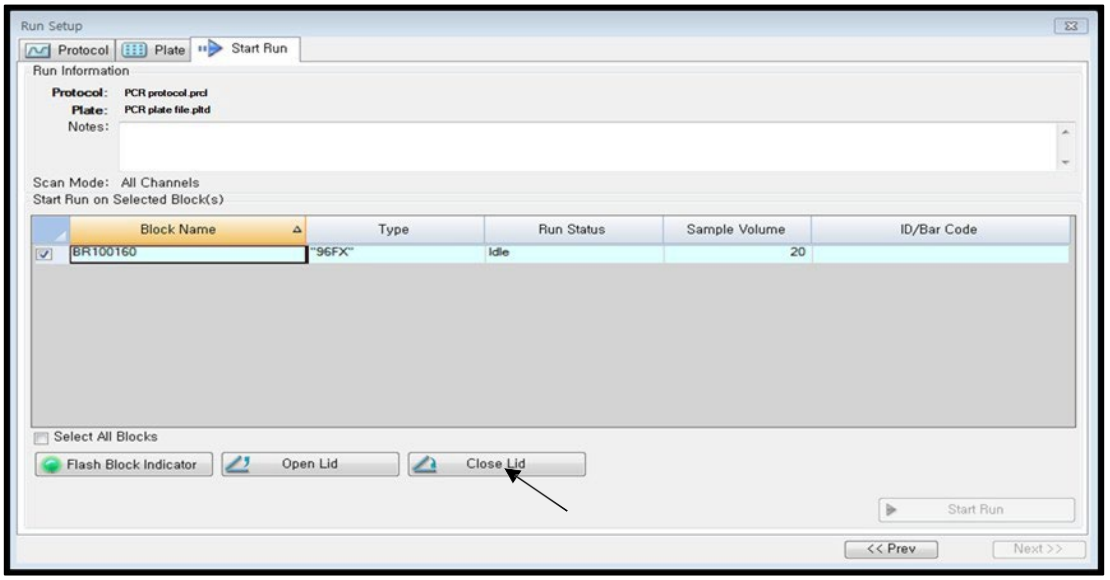


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2) Нажмите кнопку **Start Run (Начать запуск)**.

3) Сохраните файл прогона в папке "Мои документы" или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите **SAVE** (**Сохранить)**, и запуск начнется.

2.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные для всех этапов определения кривой амплификации в файле результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть любым по желанию пользователя (Для функции "Экспорт Seegene" автоматически создаются папки "QuantStep3" и "QuantStep4" для сохранения данных каждой кривой амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX Manager™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **Quantification (Количественное определение)**, чтобы подтвердить результаты кривой амплификации.

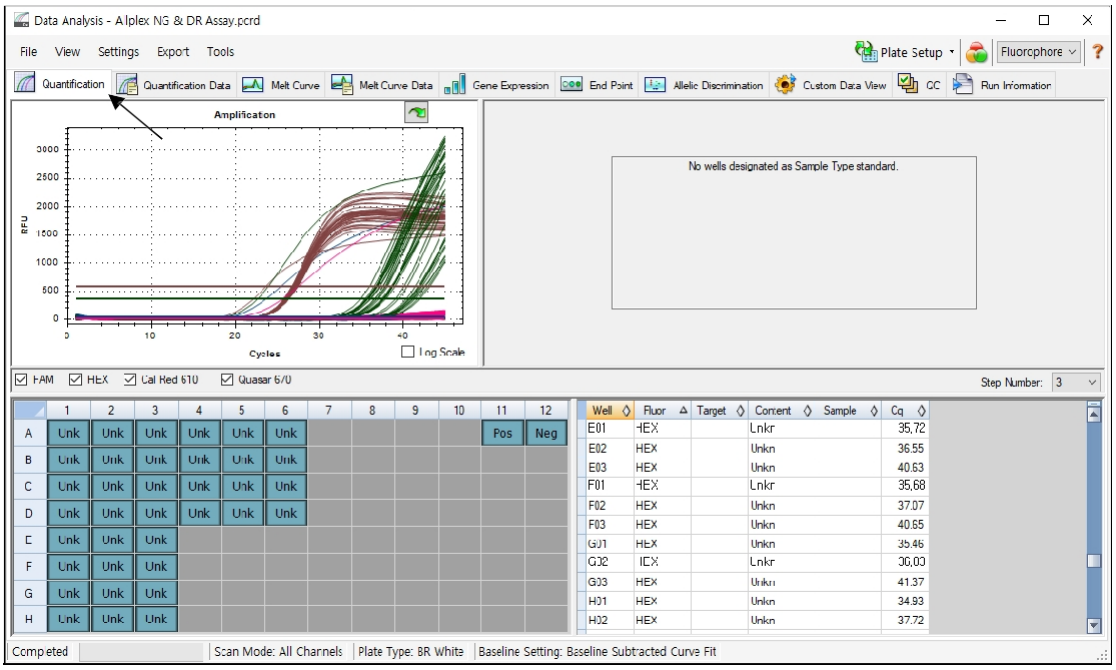


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

2) Выберите **No Baseline Subtraction** (**Без вычитания базовой линии**) в меню **Baseline Setting** (**Настройки базовой линии**).

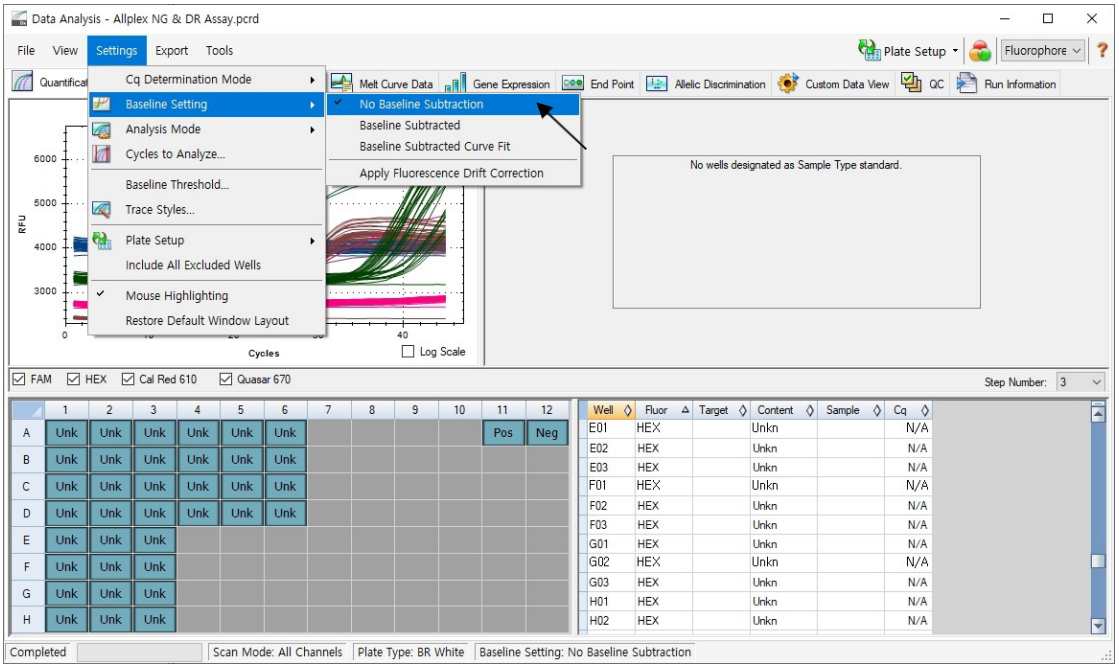


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите **Seegene Export (Экспорт Seegene)** в меню **Export (Экспорт).**

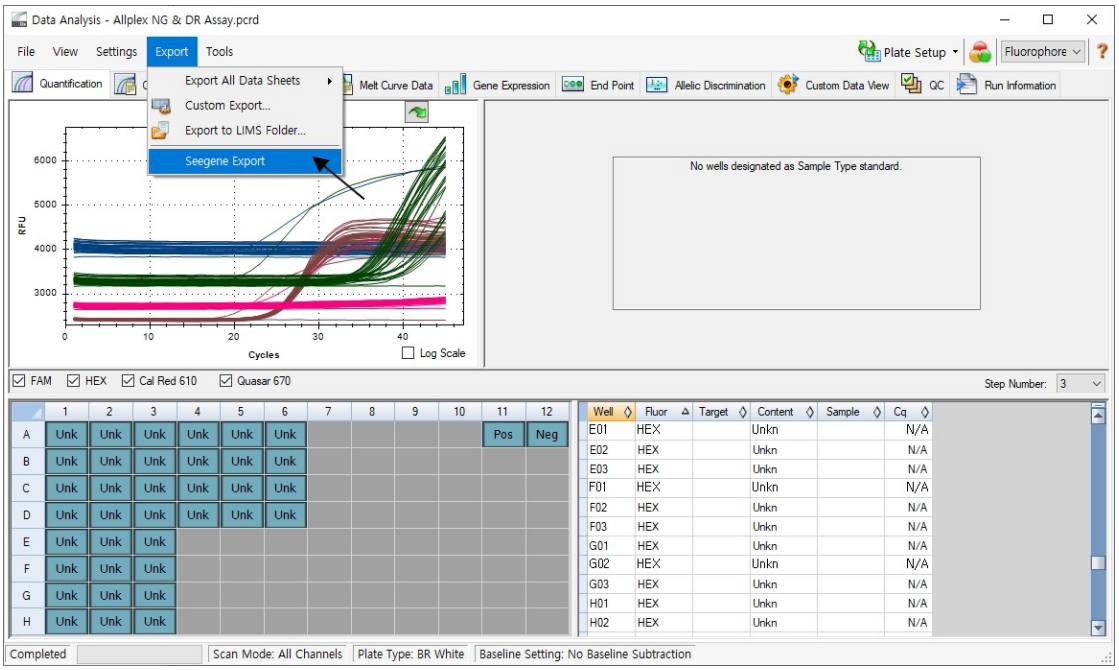


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

4) Выберите место для сохранения данных и нажмите **OK**.

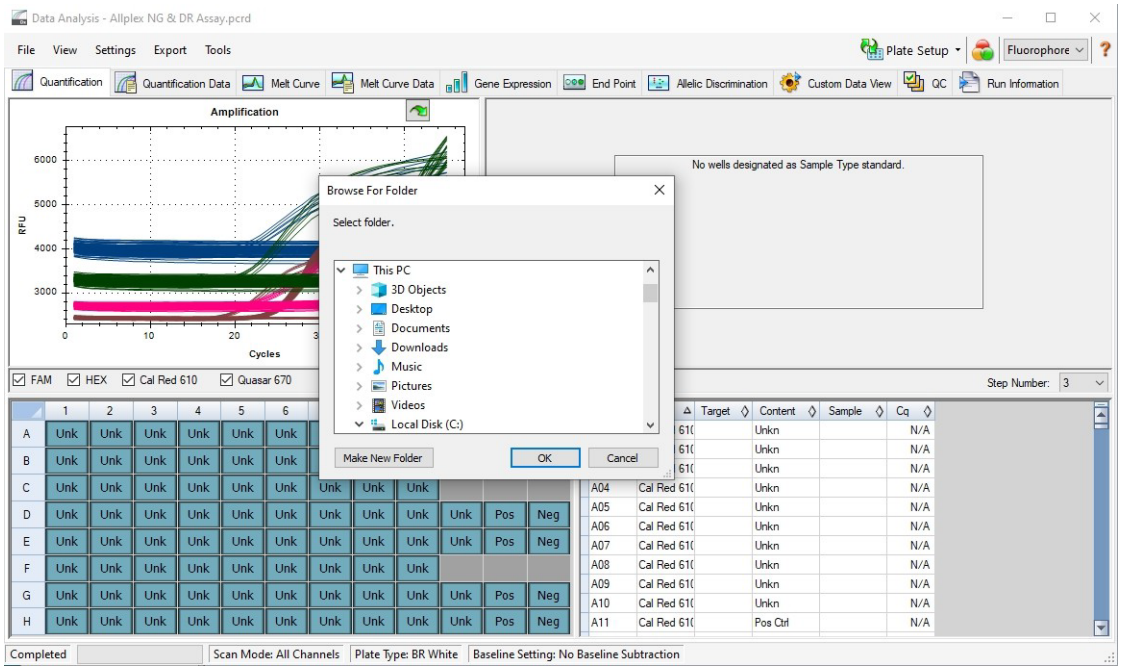


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **Options (Параметры)**, чтобы выбрать **CFX96 Dx** в меню **Instrument** (**Инструмент**).

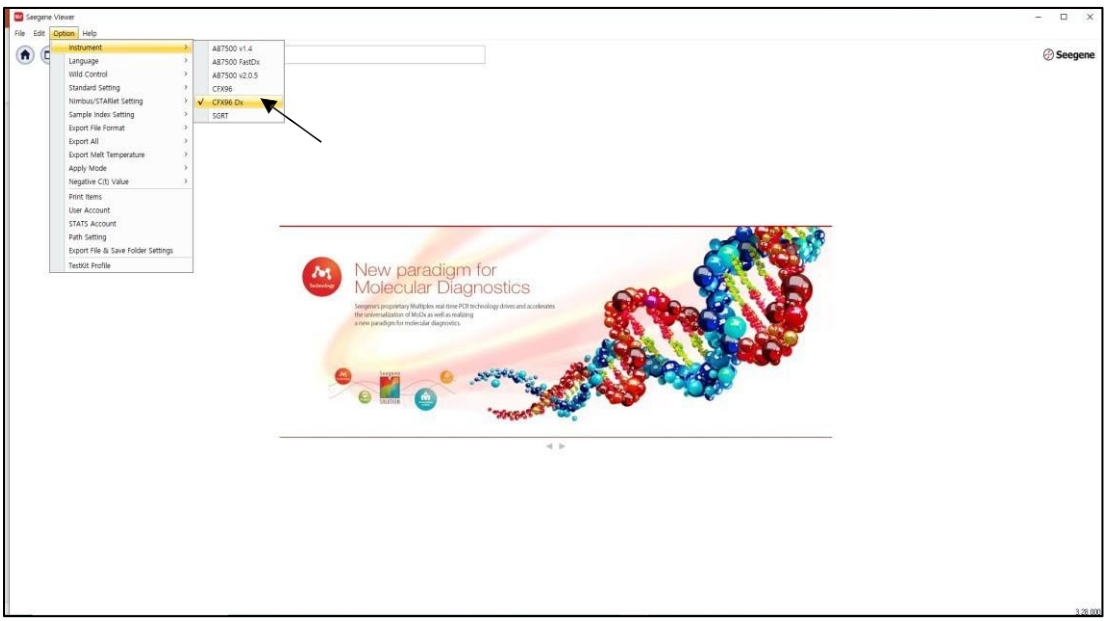


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите кнопку **Open** (**Открыть)**, чтобы найти сохраненный файл в папке "QuantStep3", откройте файл результатов и выберите тестовый набор в меню **PRODUCT** (**ПРОДУКТ).**

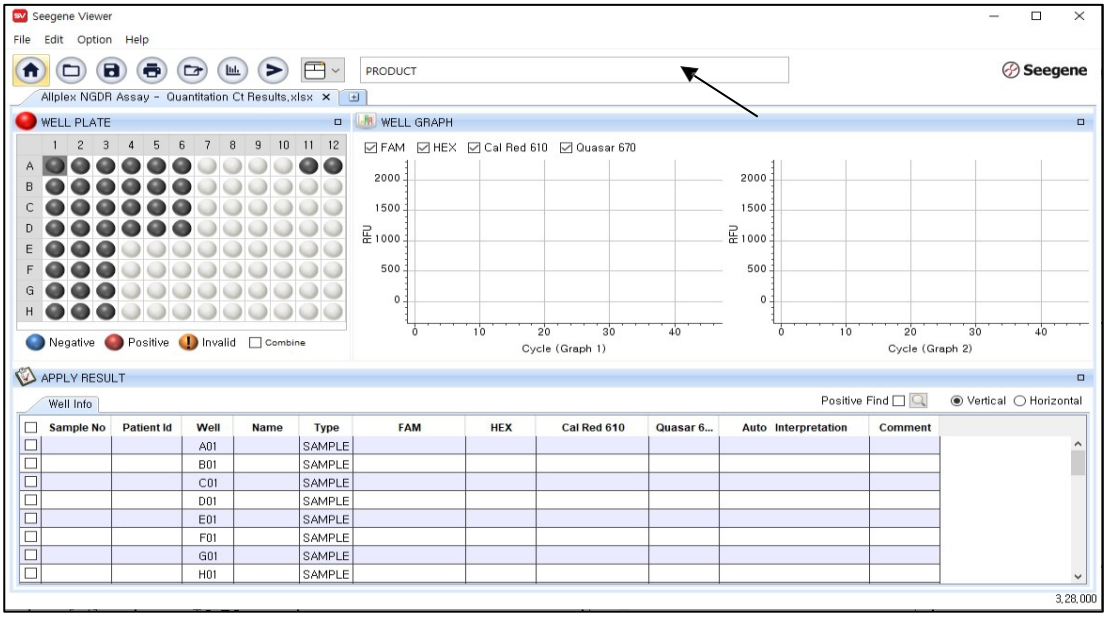


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

3) Проверьте результат для каждой лунки.

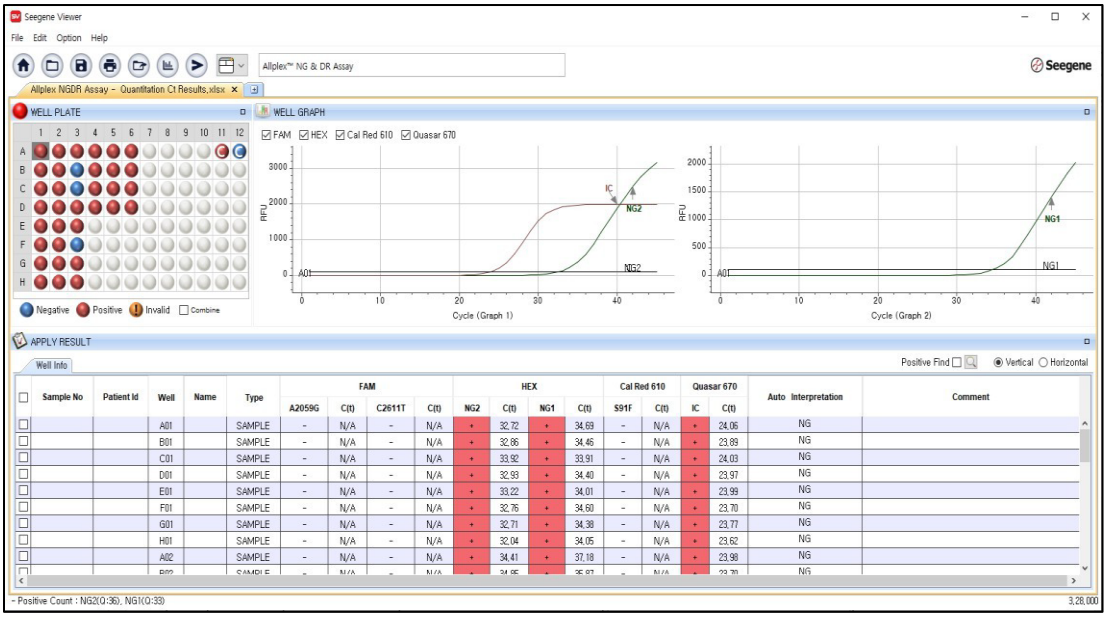


Рис. 15. **Результат тестирования в Seegene Viewer**

4) Критерии валидности результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для подтверждения достоверности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и ОК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие критерии:

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer						
	FAM (Ct)		HEX (Ct)		Cal Red 610 (Ct)	Quasar670 (Ct)	Автоинтерпретация
	A2059G	C2611T	NG2	NG1	S91F	IC	
Положительный контроль	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 45	≤ 45	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Отрицательный контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае нарушения достоверности результаты не следует интерпретировать или сообщать о них, а ПЦР- реакцию необходимо повторить.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Информация об аналите

Флуорофор	Аналит	
	График 1	**График 2**
FAM	A2059G (Мутация 23S pPHK)	C2611T (Мутация 23S pPHK)
HEX	*Neisseria gonorrhoeae* 2 (NG2)	*Neisseria gonorrhoeae* 1 (NG1)
Cal Red 610	-	S91F (Мутация гиразы A)
Quasar 670	Внутренний контроль (ВК)	-

2. Интерпретация результатов

Аналит	Значение Ct	Результат
Цель	≤ 45	Обнаружено (+)
	N/A	Не обнаружено (-)
ВК	≤ 45	Обнаружено (+)
	N/A	Не обнаружено (-)

Целевой результат			ВК результат	Интерпретация
NG2	NG1	Мутация 23S рРНК* или Мутация гиразы A**		
+	+	+	+	**NG и обнаруженная цель мутации**
+	+	-		**NG Обнаружен**
-	+	+		**Недействительный** [1]
+	-			
-	-			
+	+	+	-	**NG и обнаруженная цель мутации**[2]
+	+	-		**NG обнаружен**[2] Но для подтверждения цели мутации необходимо провести повторный анализ.
-	+	+		**Недействительный** [1]
+	-			
-	-			
-	+	-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, не обнаружено**[1] Но для подтверждения цели NG необходимо повторное тестирование.
+	-			
-	-			**Целевая нуклеиновая кислота, не обнаружена**
-	+	-	-	**Недействительный** [3] - Результаты указывают на неадекватный сбор образца, процесс (т.е. отсутствие добавления экзогенного ВК) или наличие ингибиторов. - Повторите тест с выделением нуклеиновой кислоты, используя другую аликвоту исходного образца. - Если тот же результат получен в разбавленном нуклеиновом кислотой, пожалуйста, соберите образцы снова.
+	-			
-	-			

* Мутация 23S рРНК включает A2059G и C2611T.

** Мутация гиразы A включает S91F.

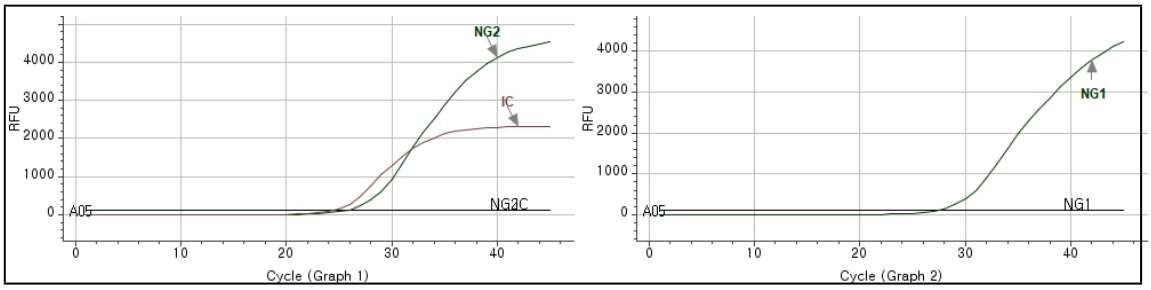
1) Повторный тест должен быть проведен с исходной ДНК. Если получен тот же результат, обратитесь к результатам других методов диагностики.

2) Высокий уровень целевых нуклеиновых кислот может вызвать помехи при обнаружении и считывании данных внутреннего контроля. Неверный сигнал IC не означает, что положительные результаты для мишеней недействительны.

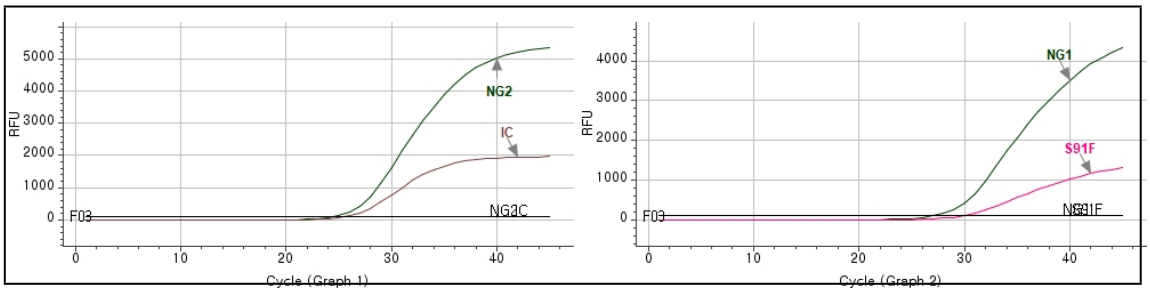
3) Подробные инструкции см. в разделе ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ (стр. *46*).

3.Применение к клиническим образцам

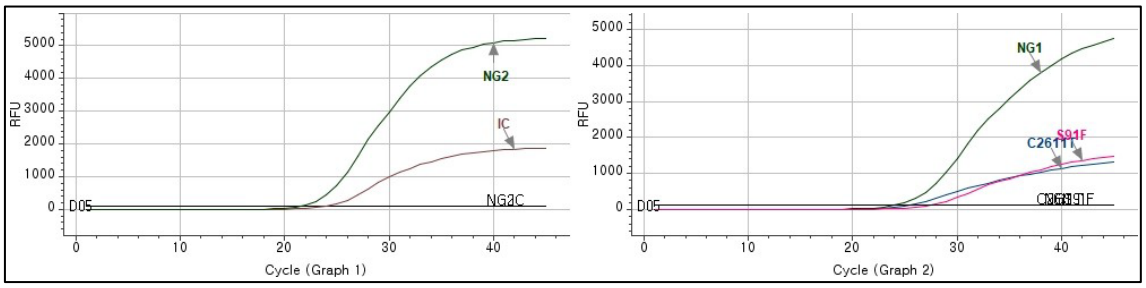
Образец 1



Образец 2



Образец 3



Образец	FAM				HEX				Cal Red 610		Quasar670		Автоинтерпретация
	A2059G	Ct	C2611T	Ct	NG2	Ct	NG1	Ct	S91F	Ct	BK	Ct	
1	-	Н/Д	-	Н/Д	+	25.71	+	27.36	-	Н/Д	+	24.41	NG
2	-	Н/Д	-	Н/Д	+	24.55	+	27.22	+	30.11	+	25.54	NG, S91F
3	-	Н/Д	+	25.10	+	21.60	+	23.93	+	27.21	+	24.17	NG, C2611T, S91F

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Allplex™ NG & DR Assay		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Нет сигнала	Флуорофоры для анализа данных не протоколу	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Неправильная настройка термоциклера реального времени	Пожалуйста, проверьте условия термоциклирования и повторите тест при правильных настройках.
	Неправильное хранение или истечение срока годности набора для тестирования	Проверьте условия хранения (см. стр. 11) и срок годности (см этикетку) набора для тестирования и при необходимости используйте новый набор.
	Нарушение процесса Выделения нуклеиновых кислот	Если ВК был экзогенно добавлен к образцу до экстракции, отсутствие сигнала ВК может указывать на потерю нуклеиновых кислот во время экстракции. Обязательно используйте рекомендованный метод экстракции. В случае обнаружения ингибиторов, повторно извлеките исходный образец или разбавьте образец физиологическим буфером в 1/3~1/10 раз, а затем добавьте ASTI ВК(2) к разбавленному образцу. ASTI ВК(2) следует использовать только для мочи и образца аноректального мазка.
Нет сигнала внутреннего контроля	Ошибка отбора проб или высокая нагрузка нуклеиновой кислоты патогена	Если ВК был экзогенно добавлен к образцу перед экстракцией, отсутствие сигнала ВК может указывать на потерю нуклеиновых кислот во время экстракции. Обязательно используйте рекомендуемый метод экстракции. Если из-за ингибиторов, повторно экстрагируйте исходный образец или образец можно разбавить физиологическим буфером в 1/3~1/10 раза, а затем добавить ASTI ВК(2) к разбавленному образцу. ASTI ВК(2) следует использовать только для образцов мочи и аноректальных мазков.
	Наличие ингибитора ПЦР	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
Скачки на всех циклах кривой амплификации	Пузырек в пробирке для ПЦР	Центрифугируйте пробирку для ПЦР перед запуском.

Allplex™ NG & DR Assay		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Предполагаемые ложноположительные сигналы или отсутствие сигнала в отрицательном контроле	Загрязнение	Обеззараживать все поверхности и инструменты гипохлоритом натрия и этанолом. Использовать только наконечники с фильтром во время всей процедуры и менять наконечники между пробирками. Повторить всю процедуру, начиная с извлечения нуклеиновых кислот, с новым набором реагентов.
Предполагаемый ложноотрицательный сигнал или отсутствие сигнала в положительном контроле	Ошибка при сборе образцов	Пожалуйста, проверьте метод взятия образца и повторно возьмите образец.
	Неправильное хранение образца	Пожалуйста, повторно соберите образец и повторите всю процедуру. Убедитесь, что образец хранится в соответствии с рекомендациями.
	Ошибка при выделении нуклеиновых кислот	Пожалуйста, проверьте процедуру выделения нуклеиновой кислоты, а также концентрацию нуклеиновой кислоты и повторно выделите нуклеиновую кислоту.
	Ошибка при добавлении нуклеиновой кислоты в соответствующие пробирки для ПЦР	Проверьте количество образцов в пробирках с нуклеиновой кислотой, добавьте нуклеиновую кислоту в правильные пробирки для ПЦР и тщательно повторите тест при необходимости.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Неправильная смесь для ПЦР	Убедитесь, что все компоненты добавлены в смесь для RT-ПЦР (чувствительность снижается при использовании предварительно составленного премикса). Перед использованием все реагенты должны быть гомогенизированы.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

1.Специфичность

Высокая специфичность Allplex™ NG & DR Assay обеспечивается олигосом, разработанным специально для интересующих мишеней в заданных условиях реакции. Allplex™ NG & DR Assay был протестирован на перекрестную реактивность к 148 различным патогенам, и ПЦР-амплификация и детекция были выявлены только в указанных мишенях, а результат был подтвержден анализом секвенирования.

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат †
1	*Neisseria gonorrhoeae*	ZMC	801482	Обнаружен НГ
2	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	19424	Обнаружен НГ
3	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	700825	Обнаружен НГ
4	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	31426	Обнаружен НГ
5	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	43069	Обнаружен НГ
6	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	43070	Обнаружен НГ
7	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	49226	Обнаружен НГ
8	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	49981	Обнаружен НГ
9	*Neisseria gonorrhoeae*[1)]	NCTC	13798	NG, S91F Обнаружен
10	*Neisseria gonorrhoeae*[1)]	NCTC	13800	NG, S91F Обнаружен
11	*Neisseria gonorrhoeae*[1,2)]	NCTC	13817	NG, обнаружен C2611T
12	*Neisseria gonorrhoeae*[1,3)]	NCTC	13818	NG, A2059G, S91F Обнаружено
13	*Neisseria gonorrhoeae*[1,4)]	NCTC	13821	NG, S91F Обнаружен
14	*Acinetobacter baumannii*	KCCM	35453	Не обнаружено
15	*Acinetobacter schindleri*	KCTC	12409	Не обнаружено
16	*Acinetobacter ursingii*	KCTC	12410	Не обнаружено
17	Adenovirus 40	ATCC	VR-931	Не обнаружено
18	*Arcanobacterium haemolyticum*	ATCC	9345	Не обнаружено
19	*Atopobium parvulum*	KCOM	1530	Не обнаружено
20	*Atopobium vaginae*	KCTC	15240	Не обнаружено
21	*Bacteroides caccae*	ATCC	43185	Не обнаружено
22	*Bacteroides fragilis*	KCTC	5013	Не обнаружено
23	*Bacteroides ovatus*	KCTC	5827	Не обнаружено
24	*Bacteroides vulgatus*	ATCC	8482	Не обнаружено

Нет.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат †
25	*Bacteroides xylanisolvens*	KCTC	15192	Не обнаружено
26	*Bifidobacterium adolescentis*	KCTC	3216	Не обнаружено
27	*Bifidobacterium longum*	KCTC	3421	Не обнаружено
28	*Bifidobacterium minimum*	KCTC	3273	Не обнаружено
29	*Campylobacter rectus*	KCTC	5636	Не обнаружено
30	*Candida albicans*	ATCC	10231D-5	Не обнаружено
31	*Candida dubliniensis*	KCTC	17427	Не обнаружено
32	*Candida glabrata*	KCCM	50044	Не обнаружено
33	*Candida krusei*	KCCM	11426	Не обнаружено
34	*Candida lusitaniae*	KCCM	50541	Не обнаружено
35	*Candida metapsilosis*	ATCC	96144D	Не обнаружено
36	*Candida orthopsilosis*	ATCC	96139	Не обнаружено
37	*Candida parapsilosis*	KCTC	7653	Не обнаружено
38	*Candida tropicalis*	ATCC	66029D	Не обнаружено
39	*Chlamydia trachomatis*	ZMC	804390	Не обнаружено
40	*Chlamydophila pneumoniae*	ATCC	VR-1310	Не обнаружено
41	*Chlamydophila psittaci*	Vircell	MBC013	Не обнаружено
42	*Citrobacter freundii*	KCCM	11931	Не обнаружено
43	*Clostridium difficile* (Toxin A+ / B+)	NCTC	11209	Не обнаружено
44	*Clostridium perfringens*	KCTC	3269	Не обнаружено
45	*Corynebacterium diphtheria*	KCTC	3075	Не обнаружено
46	*Cytomegalovirus* (CMV)	NIBSC	09/162	Не обнаружено
47	*Enterobacter aerogenes*	KCCM	12177	Не обнаружено
48	*Enterobacter cloacae*	KCTC	2361	Не обнаружено
49	*Enterococcus avium*	ATCC	14025	Не обнаружено
50	*Enterococcus faecalis*	KCTC	3206	Не обнаружено
51	*Enterococcus faecium*	ATCC	51559	Не обнаружено
52	Enterovirus 70	ATCC	VR-836	Не обнаружено
53	Epstein Barr Virus	ATCC	VR-1492	Не обнаружено
54	*Escherichia coli*	ATCC	25922	Не обнаружено
55	*Fusobacterium necrophorum*	KCOM	1657	Не обнаружено
56	*Gardnerella vaginalis*	KCTC	5097	Не обнаружено
57	*Haemophilus ducreyi*	ATCC	700724D-5	Не обнаружено

Нет.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат †
58	*Haemophilus influenza*	KCCM	42099	Не обнаружено
59	*Helicobacter pylori*	ZMC	804383	Не обнаружено
60	Hepatitis A virus (HAV)	ATCC	VR-1541	Не обнаружено
61	Hepatitis B virus (HBV)	ATCC	VR-3232SD	Не обнаружено
62	Hepatitis C virus (HCV)	ATCC	VR-3233SD	Не обнаружено
63	Human herpesvirus 1	ATCC	VR-260	Не обнаружено
64	Human herpesvirus 2	ATCC	VR-734	Не обнаружено
65	Human herpesvirus 3	ATCC	VR-1367	Не обнаружено
66	Human Papilloma Virus 16	KCLB	30035	Не обнаружено
67	Human Papilloma Virus 16	KCLB	21550	Не обнаружено
68	Human Papilloma Virus 18	KCLB	10002	Не обнаружено
69	*Klebsiella pneumoniae*	ATCC	BAA-1705	Не обнаружено
70	*Lactobacillus acidophilus*	KCTC	3140	Не обнаружено
71	*Lactobacillus amylovorus*	KCTC	3179	Не обнаружено
72	*Lactobacillus brevis*	KCTC	3498	Не обнаружено
73	*Lactobacillus casei*	KCTC	3260	Не обнаружено
74	*Lactobacillus crispatus*	KCTC	5054	Не обнаружено
75	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	KCTC	13730	Не обнаружено
76	*Lactobacillus fermentum*	KCTC	3112	Не обнаружено
77	*Lactobacillus gallinarum*	KCTC	5048	Не обнаружено
78	*Lactobacillus gasseri*	KCTC	3163	Не обнаружено
79	*Lactobacillus helveticus*	KCTC	15060	Не обнаружено
80	*Lactobacillus iners*	CCARM	123	Не обнаружено
81	*Lactobacillus intestinalis*	KCTC	5052	Не обнаружено
82	*Lactobacillus jensenii*	KCTC	5194	Не обнаружено
83	*Lactobacillus johnsonii*	KCTC	3801	Не обнаружено
84	*Lactobacillus kefiranofaciens*	KCTC	5075	Не обнаружено
85	*Lactobacillus oris*	KCCM	40993	Не обнаружено
86	*Lactobacillus parabuchneri*	KCTC	3503	Не обнаружено
87	*Lactobacillus pentosus*	KCTC	3120	Не обнаружено
88	*Lactobacillus plantarum*	ATCC	700934	Не обнаружено
89	*Lactobacillus reuteri*	KCTC	3679	Не обнаружено
90	*Lactobacillus rhamnosus*	KCCM	32405	Не обнаружено

Нет.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат †
91	*Lactobacillus salivarius*	KCTC	3600	Не обнаружено
92	*Lactobacillus sanfranciscensis*	KACC	12431	Не обнаружено
93	*Lactobacillus ultunensis*	KCTC	5857	Не обнаружено
94	*Lactobacillus vaginalis*	KCTC	3515	Не обнаружено
95	*Mobiluncus curtisii*	ATCC	35241	Не обнаружено
96	*Mobiluncus mulieris*	ATCC	35243	Не обнаружено
97	*Moraxella catarrhalis*	KCCM	42706	Не обнаружено
98	*Mycoplasma arginini*	ATCC	23838	Не обнаружено
99	*Mycoplasma felis* Cole et al.	ATCC	23391	Не обнаружено
100	*Mycoplasma genitalium*	ATCC	49895	Не обнаружено
101	*Mycoplasma hominis*	ZMC	804011	Не обнаружено
102	*Mycoplasma iowae* Jordan et al.	ATCC	33552	Не обнаружено
103	*Mycoplasma leonicaptivi* Hill	ATCC	49890	Не обнаружено
104	*Mycoplasma pneumoniae*	ATCC	15531	Не обнаружено
105	*Mycoplasma pulmonis*	ATCC	19612	Не обнаружено
106	*Mycoplasma spumans*	ATCC	19526	Не обнаружено
107	*Neisseria cinerea*	ATCC	14685	Не обнаружено
108	*Neisseria elongata*	ZMC	801510	Не обнаружено
109	*Neisseria flavescens*	ATCC	13120	Не обнаружено
110	*Neisseria lactamica*	ZMC	801752	Не обнаружено
111	*Neisseria lactamica*	Saehyun-tech	0405L	Не обнаружено
112	*Neisseria lactamica*	Saehyun-tech	0646L	Не обнаружено
113	*Neisseria meningitidis*	KCCM	41562	Не обнаружено
114	*Neisseria meningitidis*	Saehyun-tech	0453L	Не обнаружено
115	*Neisseria meningitidis*	Saehyun-tech	0454L	Не обнаружено
116	*Neisseria meningitidis*	Saehyun-tech	0404L	Не обнаружено
117	*Neisseria mucosa*	ATCC	19696	Не обнаружено
118	*Neisseria mucosa*	Saehyun-tech	0131L	Не обнаружено
119	*Neisseria perflava*	ATCC	14799D-5	Не обнаружено
120	*Neisseria polysaccharea*	ZMC	804030	Не обнаружено
121	*Neisseria sicca*	ZMC	801754	Не обнаружено
122	*Neisseria sicca*	Saehyun-tech	0464L	Не обнаружено
123	*Neisseria sicca*	Saehyun-tech	0406L	Не обнаружено

Нет.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат †
124	*Neisseria subflava*	ZMC	804298	Не обнаружено
125	Norovirus GII 17	ZMC	810087	Не обнаружено
126	*Peptostreptococcus micros*	KCTC	15021	Не обнаружено
127	*Prevotella bivia*	KCTC	5454	Не обнаружено
128	*Prevotella buccalis*	KCTC	5496	Не обнаружено
129	*Prevotella disiens*	KCTC	5499	Не обнаружено
130	*Prevotella intermedia*	KCTC	5692	Не обнаружено
131	*Prevotella melaninogenica*	KCTC	5457	Не обнаружено
132	*Proteus mirabilis*	ATCC	12453	Не обнаружено
133	*Pseudomonas aeruginosa*	KCOM	1182	Не обнаружено
134	*Saccharomyces cerevisiae*	KCCM	50511	Не обнаружено
135	*Salmonella enteritidis*	CCARM	8570	Не обнаружено
136	*Salmonella typhimurium*	CCARM	270	Не обнаружено
137	*Serratia marcescens*	KCTC	2801	Не обнаружено
138	*Staphylococcus aureus*	KCOM	1335	Не обнаружено
139	*Staphylococcus epidermidis*	ATCC	12228	Не обнаружено
140	*Streptococcus agalactiae*	ATCC	BAA-611D-5	Не обнаружено
141	*Streptococcus pneumoniae*	ATCC	BAA-255D	Не обнаружено
142	*Streptococcus pyogenes*	ATCC	19615	Не обнаружено
143	*Treponema pallidum*	ATCC	BAA-2642SD	Не обнаружено
144	*Trichomonas vaginalis*	ZMC	801805	Не обнаружено
145	*Trichomonas tenax*	ATCC	30207	Не обнаружено
146	*Ureaplasma parvum*	ATCC	700970	Не обнаружено
147	*Ureaplasma urealyticum*	ATCC	33699	Не обнаружено
148	*Vibrio parahaemolyticus*	KCTC	2471	Не обнаружено

† Для подтверждения достоверности результатов эксперимент был повторен три раза.

1) Лекарственная устойчивость *Neisseria gonorrhoeae*, выявленная методом секвенирования In-House PCR/Sanger.
2) *Neisseria gonorrhoeae* WHO U (Швеция, 2011) обладала мутацией C2611T в гене 23S рРНК.
3) *Neisseria gonorrhoeae* WHO V (Швеция, 2012) обладала мутацией A2059G в гене 23S рРНК и мутацией S91F в гене *gyrA*.
4) *Neisseria gonorrhoeae* WHO Y (F89; Франция, 2010) обладала мутацией S91F в гене *gyrA*.

※ ATCC : Американская коллекция типовых культур

ZMC : ZeptoMetrix Corporation

CCARM : Коллекция культур устойчивых к антимикробным препаратам микробов

KACC : Корейская коллекция сельскохозяйственных культур

KCTC : Корейская коллекция по культуре типа

KCCM : Корейский центр культуры микроорганизмов

KCLB : Корейский банк клеточных линий

KCOM : Корейская коллекция микробиологии полости рта

NCTC : Национальная коллекция типовых культур

Advanced : Advanced Biotechnologies Inc.

NIBSC : Национальный институт биологических стандартов и контроля
Vircell

Saehyun-tech

2.Чувствительность

Чувствительность определяется как наименьшая концентрация организма, которая может быть стабильно обнаружена (≥ 95 % положительных результатов среди всех протестированных образцов). Чувствительность Allplex™ NG & DR Assay оценивали с помощью пробит-анализа с серийными разведениями количественно определенных стандартных организмов и синтетических ДНК. Кроме того, чувствительность *к Neisseria gonorrhoeae* определяли с помощью нуклеиновых кислот, выделенных и количественно оцененных как геномные копии/реакция. Заявленный предел обнаружения целей Allplex™ NG & DR Assay приведен в таблице ниже.

Аналит	Стандартные организменные или синтетические ДНК		Геномная ДНК
	Источник	Предел обнаружения	Предел обнаружения (геномные копии/реакция)
Neisseria gonorrhoeae	ZeptoMetrix 0801482	2,10 x 10^1 КОЕ/мл	20
A2059G	Синтетическая ДНК	3,57 x 10^1 копий/rxn	-
C2611T		1,33 x 10^2 копий/rxn	-
S91F		6,07 x 10^1 копий/rxn	-

3.Воспроизводимость

Была подготовлена панель воспроизводимости из 12 имитируемых аналитов, включающая высокоотрицательные (0,1X LoD), низкоположительные (1X LoD) и умеренно положительные (3X LoD) образцы на трех разных участках. На каждом полигоне панель тестировалась в течение пяти дней, по два запуска в день двумя разными операторами и в трех экземплярах для каждой цели. Для тестирования использовалась одна партия Allplex™ NG & DR Assay

в трех местах и трех лотах в одном месте. Для каждого анализа при исследовании воспроизводимости наблюдались положительные показатели: 100,00% для умеренно положительных образцов, 100,00% для слабо положительных образцов и≥ 13,33% для сильно отрицательных образцов.

Воспроизводимость Allplex™ NG & DR Assay оценивалась среди участков, партий продукции и экспериментаторов. Результаты соответствовали критериям, что подтверждает воспроизводимость показателей Allplex™ NG & DR Assay.

4.Мешающие вещества

Этот тест проводился с использованием мешающих веществ, состоящих из 15 субстанций, чтобы подтвердить эффективность Allplex™ NG & DR Assay в присутствии потенциальных мешающих веществ. Добавление веществ не повлияло на результат: неспецифическое обнаружение или ингибирование амплификации мишени. Согласно полученным результатам, 15 мешающих веществ не оказывали влияния на результаты Allplex™ NG & DR Assay.

№.	Мешающиеся вещества	Тестовая концентрация
1	Метронидазол	701 мкмоль/л
2	Амоксициллин	206 мкмоль/л
3	Билирубин	257 мкмоль/л
4	Гемоглобин человека	200 г/л
5	Прогестерон	20 нг/мл
6	Бета-эстрадиол	4,41 нмоль/л
7	Ацетилсалициловая кислота (аспирин)	3,62 ммоль/л
8	Глюкоза	12,2 ммоль/л
9	Альбумин из человеческой сыворотки	52 г/л
10	Муцин	3 мг/мл
11	Суппозитории/лечение геморроя	5% (по массе/объему)
12	Фекалии	1% (по массе/объему)
13	Подавляющее кашель средство	5% (по массе/объему)
14	Зубная паста	5% (по массе/объему)
15	Полоскание для рта	5% (по массе/объему)

5.Клинические показатели

В общей сложности 482 клинических образца (293 клинических образца и 189 искусственных образцов) были включены в клинические испытания. Клиническая эффективность Allplex™ NG & DR Assay оценивалась путем сравнения с референсными анализами; CE-маркированными анализами ПЦР в реальном времени для обнаружения NG и секвенированием Sanger. Результат показал более 95% для положительного процентного согласия (PPA) и 95% для отрицательного процентного согласия (NPA). Таким образом, качество Allplex™ NG & DR Assay подтверждено. Результаты анализа представлены в таблице.

Исследовательская группа 1: клинические образцы NG, S91F

(1) Генитальный мазок (n=29)

NG		**Сравнительный анализ, одобренный CE-IVD**		
		Положит.	**Отриц.**	**Всего**
Allplex™ NG & DR Assay	**Положит.**	19	0	19
	Отриц.	0	10	10
	Всего	19	10	29

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 82,35% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 69,15% - 100,00%)
- OPA (общее процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 88,06% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

S91F		**Анализ секвенирования**		
		Положит.	**Отриц.**	**Всего**
Allplex™ NG & DR Assay	**Положит.**	18	0	18
	Отриц.	0	11	11
	Всего	18	11	29

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: от 81,47% до 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 71,51% - 100,00%)
- OPA (общее процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 88,06% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

(2) Моча (n=56)

NG		Сравнительный анализ, одобренный CE-IVD		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	32	0	32
	Отриц.	0	24	24
	Всего	32	24	56

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 89,11% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,75% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 93,62% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

S91F		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	23	0	23
	Отриц.	0	33	33
	Всего	23	33	56

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: от 85,18% до 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 89,42% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 93,62% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

(3) Аноректальный мазок (n=62)

NG		Сравнительный анализ, одобренный CE-IVD		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	41	0	41
	Отриц.	1*	20	21
	Всего	42	20	62

* 1 Дискордантный образец (образец № A51) был подтвержден как отрицательный в результате анализа секвенирования.

- PPA (положительное процентное согласие): 97,62% (95% ДИ: 87,43% - 99,94%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 98,39% (95% ДИ: 91,34% - 99,96%)
- Значение каппа: 0,964 (95% ДИ: 0,893 - 1,000)

S91F		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	33	0	33
	Отриц.	0	29	29
	Всего	33	29	62

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 89,42% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 88,06% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,22% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

(4) Орофарингеальный (горловой) мазок (n=126)

- Клиническая база - 1

NG		Сравнительный анализ, одобренный CE-IVD		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	14	0	14
	Отриц.	0	20	20
	Всего	14	20	34

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 76,84% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 89,72% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

- Клиническая база - 2

NG		Сравнительный анализ, одобренный CE-IVD		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	44	0	44
	Отриц.	0	48	48
	Всего	44	48	92

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,96% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 92,60% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 96,07% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

S91F		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	51	0	51
	Отриц.	0	75	75
	Всего	51	75	126

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 93,02% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 95,20% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: от 97,11% до 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

Исследовательская группа 2: Надуманные образцы 23S рРНК A2059G и 23S рРНК C2611T

(1) Генитальный мазок (n=49)

A2059G		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	29	29
	Всего	20	29	49

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 88,06% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 92,75% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

C2611T		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	19	0	19
	Отриц.	0	30	30
	Всего	19	30	49

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 82,35% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 88,43% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 92,75% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

(2) Моча (n=54)

A2059G		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	34	34
	Всего	20	34	54

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 89,72% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 93,40% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

C2611T		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	10	0	10
	Отриц.	0	44	44
	Всего	10	44	54

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 69,15% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,96% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 93,40% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

(3) Аноректальный мазок (n=60)

A2059G		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	40	40
	Всего	20	40	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

C2611T		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	40	40
	Всего	20	40	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

(4) Орофарингеальный (горловой) мазок (n=60)

A2059G		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	40	40
	Всего	20	40	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

C2611T		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	40	40
	Всего	20	40	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

Исследовательская группа 3: жидкостная цитология (LBC)

LBC (n=60)

NG		Сравнительный анализ, одобренный CE-IVD		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	40	0	40
	Отриц.	0	20	20
	Всего	40	20	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

S91F		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	40	0	40
	Отриц.	0	20	20
	Всего	40	20	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

A2059G		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	40	40
	Всего	20	40	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

C2611T		Анализ секвенирования		
		Положит.	Отриц.	Всего
Allplex™ NG & DR Assay	Положит.	20	0	20
	Отриц.	0	40	40
	Всего	20	40	60

- PPA (положительное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 83,16% - 100,00%)
- NPA (отрицательное процентное соглашение): 100,00% (95% ДИ: 91,19% - 100,00%)
- OPA (общее процентное согласие): 100,00% (95% ДИ: 94,04% - 100,00%)
- Значение каппа: 1,000 (95% ДИ: от 1,000 до 1,000)

ССЫЛКИ

1. D. H. Lee. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin (2012) 1: 5-10
2. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 1-4.
3. M. G. Aguilera-Arreola, A. M. González-Cardel, A. Méndez Tenorio, E. Curiel-Quesada and G. Castro-Escarpulli [Highly specific and efficient primers for in-house multiplex PCR detection of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum.] BMC Res Notes. (2014) 7:433
4. M. Unemo, R. Ballard, C. Ison, D. Lewis, F. Ndowa, and R. Peeling. [Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus] World Health Organization (2013)
5. J. R. Papp, J. Schachter, C. A. Gaydos, B. V. Pol [Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae _ 2014] MMWR.(2014) 63(RR02);1-19
6. S. J. Lee, D. C. Park, D. S. Lee, H. S. Choe, and Y. H. Cho. [Evaluation of Seeplex® STD6 ACE Detection kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infection.] J Infect Chemother. (2012) 18(4):494-500
7. Z. Samra, S. Rosenberg, L. Madar-Shapiro. [Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis.] Diagn Microbiol Infect Dis.(2011) 70(1):17-21
8. A. Al-Asoufi, A. Khlaift, A. A. Tarawneh, K. Alsharafa, M. Al-Limoun, and K. Khleifat. [Bacterial Quality of Urinary Tract Infections in Diabetic and Non Diabetics of the Population of Ma'an Province, Jordan.] Pak. J. Biol. Sci.(2017) 20(4):179-188
9. B. Cao, S. Wang, Z. Tian, P. Hu, L. Feng, and L Wang. [DNA Microarray Characterization of Pathogens Associated with Sexually Transmitted Diseases.] PLOS ONE(2015)10(7):e0133927
10. K. Adachi, J. Xu, N. Yeganeh, M. Camarca, M. G. Morgado, DH. Watts, et al. [Combined evaluation of sexually transmitted infection in HIV-infected pregnant women and infant HIV transmission.] PLOS ONE(2018)13(1):e0189851
11. Teodora Wi, Monica M. Lahra, Francis Ndowa, Manju Bala, Jo-Anne R. Dillon, Pilar Ramon-Pardo, Sergey R. Eremin, Gail Bolan, and Magnus Unemo [Antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae: Global surveillance and a call for international collaborative action] PLOS Medicine (2017) 14(7): e1002344
12. Kim M Gernert, Sandra Seby, Matthew W Schmerer, Jesse C Thomas IV, Cau D Pham, Sancta St Cyr, Karen Schlanger, Hillard Weinstock, William M Shafer, Brian H Raphael, Ellen N Kersh, and the Antimicrobial-Resistant Neisseria gonorrhoeae Working Group [Azithromycin susceptibility of Neisseria gonorrhoeae in the USA in 2017: a genomic analysis of surveillance data] Lancet Microbe (2020) 1: e154–64
13. Beata Młynarczyk‐Bonikowska, Anna Majewska, Magdalena Malejczyk, Grażyna Młynarczyk and Sławomir Majewski [Multiresistant Neisseria gonorrhoeae: a new threat in second decade of the XXI century] Medical Microbiology and Immunology (2020) 209:95–108

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ

Ключ к символам, используемым в руководстве и на этикетках

Символ	Пояснение
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии
REF	Номер по каталогу
	Срок годности
	Вереакцийий предел температуры
PRIMER	Олигонуклеотидная смесь для амплификации и детекции
PREMIX	Мастер-смесь для ПЦР или смесь для детекции
WATER	Вода, не содержащая РНКаз
CONTROL +	Положительный контроль (ПК)
CONTROL IC	Внутренний контроль (ВК)
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Производитель
	Дата изготовления
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Внимание
	Содержит достаточное количество <n> тестов
UDI	Уникальный идентификатор устройства

Символ	Пояснение
rxns	Штрих-код реакции для автоматизированной системы экстракции

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №.	Продукт	Размер
Серия Allplex™		
SD10368Z	**Allplex™ NG & DR Assay**	**25 реакций**
SD10367X	**Allplex™ NG & DR Assay**	**100 реакций**
SD10317Z	Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay	25 реакций
SD9400Y	Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay	50 реакций
SD9400X	Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay	100 реакций
SD10245Z	Allplex™ STI Essential Assay	25 реакций
SD9801Y	Allplex™ STI Essential Assay	50 реакций
SD9801X	Allplex™ STI Essential Assay	100 реакций
SD10318Z	Allplex™ STI Essential Assay Q(MH,UU)	25 реакций
SD10201Y	Allplex™ STI Essential Assay Q(MH,UU)	50 реакций
SD10202X	Allplex™ STI Essential Assay Q(MH,UU)	100 реакций
SD10177Z	Allplex™ Genital ulcer Assay	25 реакций
SD9802Y	Allplex™ Genital ulcer Assay	50 реакций
SD9802X	Allplex™ Genital ulcer Assay	100 реакций
SD10178Z	AllplexTM Candidiasis Assay	25 реакций
SD9803Y	AllplexTM Candidiasis Assay	50 реакций
SD9803X	AllplexTM Candidiasis Assay	100 реакций
SD9804X	AllplexTM Bacterial Vaginosis Assay	100 реакций
SD10159X	AllplexTM Bacterial Vaginosis plus Assay	100 реакций
SD10319Z	AllplexTM MG & AziR Assay	25 реакций
SD10169Y	AllplexTM MG & AziR Assay	50 реакций
SD10170X	AllplexTM MG & AziR Assay	100 реакций
SD10232Z	AllplexTM MG & MoxiR Assay	25 реакций
SD10233Y	AllplexTM MG & MoxiR Assay	50 реакций
SD10234X	AllplexTM MG & MoxiR Assay	100 реакций
Серия Anyplex™		
SD7500X	Anyplex™ II STI-5 Detection	100 реакций
SD7500Y	Anyplex™ II STI-5 Detection	50 реакций
SD10323Z	Anyplex™ II STI-7e Detection	25 реакций

SD7701X	AnyplexTM II STI-7e Detection	100 реакций
SD7701Y	AnyplexTM II STI-7e Detection	50 реакций
SD7700X	AnyplexTM II STI-7 Detection (V1.1)	100 реакций
SD7700Y	AnyplexTM II STI-7 Detection (V1.1)	50 реакций
SD7200Y	AnyplexTM CT/NG Real-time Detection (V3.1)	50 реакций*

* В случае системы SmartCycler® II общее количество реакций уменьшено до 40 реакций с 50 реакций. (50 реакций→ 40 реакций)

Дополнительный продукт

SG1701	Ribo_spin vRD (Набор для выделения вирусной РНК/ДНК)	50 заготовок

Автоматизированные системы извлечения

65415-02	Микролаборатория NIMBUS IVD	EA
173000-075	Микролаборатория STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
SG71101	Seegene STARlet 96MPH	EA
744300.4.UC384	Универсальный комплект картриджей STARMag 96 X 4	384T / 1 коробка
EX00013C	Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C	384T / 1 коробка
EX00032P	Набор STARMag™ S96H	48T / 1 коробка
EX00033P	Набор STARMag™ S96H	480T / 1 коробка
EX00034P	Набор STARMag™ S96H	96T / 1 коробка
EX00035P	Набор STARMag™ S96H	960T / 1 коробка
EX00036P	Набор STARMag™ S96H N	480T / 1 коробка
EX00037P	Набор STARMag™ S96H N	960T / 1 коробка
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T / 1 коробка
EX00017P	STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00017T	STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	96T / 1 коробка
M9600	Maelstrom™ 9600	EA
EX00029P	Набор STARMag™ M96	96T / 1 коробка
EX00030P	Набор STARMag™ M96	960T / 1 коробка
SG72100	AIOS	EA

Только для профессионального использования

AllplexTM

RV Essential Assay

(Кат. № RV9750X)

Мультиплексная одноступенчатая система RT-PCR в режиме реального времени для выявления Influenza A virus, Influenza B virus, Human respiratory syncytial virus, Human metapneumovirus, Human adenovirus, Human rhinovirus, и Human parainfluenza virusиз из назофарингеального аспирата, назофарингеального мазка и бронхоальвеолярного лаважа.

Для использования с

1. **Microlab NIMBUS IVD и Microlab STARlet IVD**
2. **Seegene NIMBUS и Seegene STARlet**

Для использования с

1. **CFX96™ Система обнаружения ПЦР в реальном времени (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)**
2. **Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)**

CE

IVD **Только для диагностики *in vitro***

REF **RV9750X** Σ 100

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548

EC REP **Медицинские технологии Promedt Consulting GmbH**

Ernst-Heckel-Straße 7, 66386 St. Ingbert, Германия

Не доступно в США.

СОДЕРЖАНИЕ

УВЕДОМЛЕНИЯ 3

НАЗНАЧЕНИЕ 4

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР 5

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ 6

РЕАГЕНТЫ 10

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА 11

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ 11

ПРОТОКОЛ 12

РЕЗУЛЬТАТЫ 39

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ 42

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ 44

ССЫЛКИ 50

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ 52

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА 53

УВЕДОМЛЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Надежность результатов зависит от надлежащего сбора, хранения, транспортировки и обработки образцов.
- Если этот продукт используется с **Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS и Seegene STARlet**, он обеспечивает максимум 5 отдельных запусков.
- **Этот тест был валидирован для следующих типов образцов: назофарингеальный аспират, назофарингеальный мазок и бронхоальвеолярный лаваж**. Этот тест не был валидирован для других типов образцов.
- **Храните образцы ДНК/РНК при ≤ -20℃ до использования, а во время работы держите образцы на льду для защиты от деградации.**
- Чувствительность анализа может снизиться, если образцы неоднократно замораживались/размораживались или хранились в течение длительного периода времени.
- Рабочий процесс в лаборатории должен быть однонаправленным.
- Надевайте одноразовые перчатки и меняйте их перед входом в разные зоны. В случае загрязнения немедленно смените перчатки или обработайте их реагентом для обеззараживания ДНК.
- Принадлежности и оборудование должны быть закреплены за рабочими зонами и не должны перемещаться из одной зоны в другую.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих зонах лаборатории. При работе с образцами и реагентами надевайте одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты и средства защиты глаз. Мойте руки, тщательно обрабатывайте образцы и реактивы для испытаний.
- Избегайте загрязнения реагентов при извлечении аликвот из пробирок с реагентами. Рекомендуется использовать стерилизованные одноразовые наконечники для пипеток, устойчивые к аэрозолям.
- Не объединяйте реагенты из разных партий или из разных пробирок одной партии.
- Не используйте продукт после истечения годности.
- Не используйте все одноразовые предметы повторно.
- Используйте пробирки с завинчивающимися крышками и предотвращайте возможное разбрызгивание или перекрестное образцов во время подготовки.
- Пожалуйста, будьте осторожны, чтобы не загрязнить реагенты с выделенными нуклеиновыми кислотами, продуктами ПЦР и положительным контролем. Для предотвращения загрязнения реагентов следует использовать фильтрующие насадки.
- Используйте отдельные рабочие зоны для каждого эксперимента.
- Во избежание загрязнения рабочих зон амплифицированными продуктами открывайте пробирки или полоски с реакционными смесями ПЦР

только в специально отведенных рабочих зонах после амплификации

- Храните положительные материалы отдельно от реагентов набора.
- При работе с образцами необходимо соблюдать правила лабораторной безопасности (см. раздел "Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях" и документы CLSI).
  Тщательно очистить и продезинфицировать все рабочие поверхности с помощью 0,5% гипохлорита натрия (в деионизированной или дистиллированной воде). Компоненты продукта (остатки продукта, упаковка) могут рассматриваться как лабораторные отходы. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с действующими федеральными, государственными и местными нормами.
- Срок годности - 12 месяцев с даты изготовления на ≤-20℃ . Пожалуйста, обратитесь к этикетке для окончательный годности.
- Seegene NIMBUS и Seegene STARlet - это то же самое оборудование, что и Microlab NIMBUS IVD и Microlab STARlet IVD, соответственно, хотя производитель отличается. Поскольку аппаратные изменения в приборах отсутствуют, ожидаются те же результаты тестирования.
- Торговая марка "CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD" заменена на "CFX96™ Dx System". Поскольку аппаратные изменения в системах отсутствуют, ожидается, что обе системы дадут одинаковые результаты.
- "CFX Manager™ Dx Software v3.1" является обновленной версией "CFX Manager™ Software- IVD v1.6". Обновленное программное обеспечение содержит улучшения в меню "Запуск". Эти усовершенствования не влияют на результаты анализа данных, поэтому результаты будут такими же.
- Этот набор предназначен для дифференциальной диагностики инфекций, вызванных целевыми патогенами: вирусом гриппа A (Flu A), вирусом гриппа B (Flu B), респираторно-синцитиальным вирусом человека (RSV), метапневмовирусом человека (MPV), аденовирусом человека (AdV), риновирусом человека (HRV) и вирусом парагриппа человека (PIV).

НАЗНАЧЕНИЕ

Allplex™ RV Essential Assay - качественный тест *in vitro* для однократного или многократного выявления вируса гриппа A (Flu A), вируса гриппа B (Flu B), респираторно-синцитиального вируса человека (RSV), метапневмовируса человека (MPV), аденовируса человека (AdV), риновируса человека (HRV) и вируса парагриппа человека (PIV) из назофарингеального аспирата, назофарингеального мазка и образцов бронхоальвеолярного лаважа.

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР

1. Принципы

Allplex™ RV Essential Assay использует запатентованную Seegene технологию MuDT™, которая позволяет получать мульти-Ct (пороговый цикл) значения в одном канале флуоресценции без анализа кривой плавления на приборах для ПЦР в реальном времени.

Allplex™ RV Essential Assay — это мультиплексный анализ ПЦР в реальном времени, который позволяет одновременно амплифицировать и обнаруживать целевые нуклеиновые кислоты Flu A, Flu B, RSV, MPV, AdV, HRV, PIV и внутреннего контроля (ВК). Присутствие определенной последовательности генов в реакции отражается в виде значения Ct с помощью аналитического программного обеспечения Seegene Viewer.

Экзогенный ген используется в качестве внутреннего контроля (ВК) для мониторинга всего процесса сбора образца, выделения нуклеиновой кислоты и проверки возможного ингибирования ПЦР.

Чтобы предотвратить появление продуктов амплификации в качестве потенциальных загрязнителей, в Allplex™ RV Essential Assay используется система Uracil-DNA glycosylase (UDG)-dUTP. Система UDG- dUTP обычно используется при проведении ПЦР для устранения переноса ампликонов. UDG вырезает остатки урацила из ДНК путем расщепления N-гликозильной связи.

1. Обзор процедур

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

1. Респираторная вирусная инфекция

Респираторные инфекции подразделяются на две основные категории: инфекции верхних дыхательных путей и инфекции нижних дыхательных путей. Инфекция верхних дыхательных путей вызывается патогенными микроорганизмами, проникающими через нос, глотку, ушные раковины, околоносовые пазухи и т. д. Любая инфекция, обнаруженная в дыхательных путях, расположенных ниже гортани, классифицируется как инфекция нижних дыхательных путей. Среди инфекций нижних дыхательных путей вирусные инфекции можно разделить на четыре основные группы: пневмония, бронхиолит, круп и трахеобронхит. Для каждого вируса существуют возрастные различия у заразившихся. Кроме того, симптомы могут отличаться у пациентов, даже если тип вируса один и тот же. Хотя каждый вирус может вызывать симптомы всех четырех типов инфекций нижних дыхательных путей, некоторые симптомы проявляются чаще при определенной инфекции, чем другие. Например, RSV может проявляться у людей всех возрастов - от младенцев до взрослых, но взрослых он вызывает инфекцию верхних дыхательных путей, а у младенцев - бронхиолит. Обычно RSV вызывает пневмонию у младенцев, и большинство пациентов диагнозом "инфекция нижних дыхательных путей" — это дети младше двух лет, в основном младше шести месяцев.

Хотя взрослые имеют хороший уровень иммунитета благодаря повторным инфекциям респираторными вирусами с самого детства, их иммунная система ограничена, несовершенна и уязвима для респираторных вирусов: чаще всего это инфекции верхних дыхательных путей. Однако у пациентов с ослабленным иммунитетом могут развиться инфекции нижних дыхательных путей, такие как пневмония. В случае с гриппом, поскольку он представляет собой вирусную антигенную вариацию, пациенты с основными заболеваниями и пожилые люди часто заражаются и заболевают пневмонией. Кроме того, он может ухудшить течение основных заболеваний, что приведет к смерти пациента. Последние исследования утверждают, что RSV вызывает те же симптомы, что и грипп.

2. Вирус гриппа

Вирус гриппа (семейство *Orthomyxoviridae*) представляет собой одноцепочечный геном с отрицательной РНК, состоящий из 8 отдельных сегментов рибонуклеопротеина. Такая сегментация генома редко встречается среди вирусов и может способствовать быстрому развитию новых штаммов гриппа из-за обмена генными сегментами между различными вирусами, инфицирующими одну и ту же клетку. Существует три типа вирусов гриппа: A, B и C. Вирусы A и B наиболее распространены среди всех трех типов. Особенно известен вирус типа A, которым заражаются не только люди, но и птицы, а также различные виды млекопитающих. Среди вирусов гриппа, поражающих человека, H1N1 и H3N2 становятся проблемой для заражения детей и пожилых людей.

Типы B и C поражают только людей. Начальными симптомами гриппа являются выделения из носа, заложенность носа, боль в горле, кашель, лихорадка, назофарингит или схожие симптомы острого ринита, озноб и боль в мышцах, которые выражены сильнее, чем при обычной простуде. Характерно, что симптом гриппа сопровождается высокой температурой и развитием осложнений, вызванных бактериальными инфекциями.

3. Респираторный синцитиальный вирус (RSV)

Респираторно-синцитиальный вирус (семейство *Paramyxoviridae*) — это оболочечный вирус с одноцепочечным геномом, состоящим из отрицательно заряженной РНК. RSV имеет высокую частоту встречаемости среди других респираторных заболеваний. Он классифицируется как клинически значимый, поскольку способен вызывать смерть у детей с врожденным пороком сердца, недоношенных младенцев и детей после операций на открытом сердце. Бронхиолит - наиболее распространенный тип RSV-инфекции у младенцев, но после года он проявляется не так часто. С другой стороны, пневмония является проблемой для всех младенцев. RSV ответственен за развитие 45~75% бронхиолитов, 15~25% пневмоний у младенцев и 6~8% крупов. Изначально RSV был известен как патоген, развивающий заболевания у младенцев, но последние исследования показывают, что RSV, возникающий у взрослых, может приводить к таким же тяжелым последствиям, как грипп, например, к заболеваемости и смертности. Кроме того, если пациенты с ослабленной иммунной системой (перенесшие трансплантацию костного мозга или солидных органов) RSV, вызывающим пневмонию, вероятность летального исхода может возрасти более чем на 50%.

4. Метапневмовирус (MPV)

Метапневмовирус (семейство *Paramyxoviridae*) — это оболочечный вирус с одноцепочечным геномом РНК. MPV является респираторным вирусным патогеном, распространенным по всему миру и имеющим 5~10% вероятность коинфекции с другими респираторными вирусами. Его симптомы наиболее схожи с симптомами RSV-инфекции. MPV может вызывать легкие инфекции верхних дыхательных путей, такие как бронхиолит, круп, пневмония, тяжелые инфекции нижних дыхательных путей, и, как известно, связан с обострением астмы. Среди детей, госпитализированных по поводу заболеваний нижних дыхательных путей, у MPV-положительных пациентов общими симптомами являются лихорадка (86%), кашель (90%) и одышка (80%). Кроме того, хрипы (56%) отмечаются как у детей, которые были здоровы до заражения, так и у детей с астмой в анамнезе. У 12 % амбулаторных пациентов, лечившихся по поводу инфекции нижних дыхательных путей, был выявлен MPV-положительный результат. Этот процент является самым высоким после RSV. Также MPV является одной из основных причин бронхиальной астмы как у детей, так и у взрослых.

5. Аденовирус (AdV)

Аденовирус (семейство *Adenoviridae*) — это неразвивающийся вирус с двухцепочечной ДНК. Существует семь видов, разделенных на группы от A до G, и 57 серотипов. Наиболее распространенными симптомами аденовирусной инфекции являются инфекции верхних дыхательных путей, относящиеся к видам B и C. Вместе с AdV у пациентов возникают воспаление глаз, амигдалит, тимпанит, ларингит и гастроэнтерит. Если дети заражаются AdV, у них может развиться бронхиолит или пневмония, которые могут протекать в тяжелой форме. Большинство людей обладают способностью к самоизлечению, но AdV может вызвать смерть у пациентов с иммунодефицитом, а в редких случаях от инфекции могут умереть и некоторые здоровые люди.

6. Риновирус (HRV)

Риновирус (семейство *Picornaviridae*) — это неразвивающийся вирус с одноцепочечным геномом РНК. Вирус HRV имеет 101 серотип и известен как наиболее распространенная причина простуды. Поскольку HRV имеет различное количество серотипов, серодиагностика затруднена. Однако ее можно диагностировать с помощью ПЦР в назальном секрете.
Не все HRV вызывают симптомы; распространенными являются ринит и фарингит, которые относятся к воспалениям верхних дыхательных путей. Заложенность носа, выделения из носа и головная боль появляются в течение 2~4 дней латентного периода и в 30~40% случаев сопровождаются кашлем. Легкая лихорадка может восстановиться через неделю, но у 35 % пациентов детского возраста она держится дольше двух недель. В некоторых случаях может возникнуть тяжелое заболевание нижних дыхательных путей, которое приводит к астме у детей и хроническому бронхиту у взрослых.

7. Вирус парагриппа (PIV)

Вирус парагриппа (семейство *Paramyxoviridae*) — это оболочечный вирус с однонитевым геномом РНК. Вирусы 1-го, 2-го, 3-го и 4-го типов вызывают заболевание у людей и распространяются при непосредственном контакте с больным и при капельной инфекции. Латентный период этих вирусов составляет 2~4 дня. Большинство симптомов схожи с симптомами респираторных заболеваний. Также наблюдается лихорадка и редкие общие симптомы. В 80 % случаев это приводит к заболеваниям верхних дыхательных путей. 50% госпитализированных пациентов с бронхитом, 15% госпитализированных пациентов с бронхиолитом и 15% госпитализированных пациентов с пневмонией - все они развиваются из PIV. PIV тип 1 и тип 2 являются основными причинами развития ларинготрахеобронхита у детей 2~4 лет. PIV типа 3 может вызывать

псевдомембранозный ларингит, но он является основной причиной бронхиолита и пневмонии, которые наиболее тяжело протекают у младенцев в возрасте до 1 года. Вирус PIV типа 4 легче всего трансформируется в более тяжелые формы. Длительность симптомов различна. В среднем 4~5 дней, но обнаружение может занять до 2~3 недель после заражения, так как низкий потенциал вируса препятствует быстрому обнаружению. Если лихорадка длится более 5 дней, могут возникнуть вторичные вирусные инфекции, такие как тимпанит и пневмония. Для взрослых заболевания верхних дыхательных путей являются обычными, но могут привести к смерти от пневмонии у пациентов с ослабленной иммунной системой, например у тех, кто перенес трансплантацию костного мозга.

РЕАГЕНТЫ

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 100 реакций.

Информация для заказа (REF RV9750X)

Allplex™ RV Essential Assay			
Символ	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	RV-EA MOM	500 мкл	Смесь олиго-компонентов MuDT (MOM): - Реагент для амплификации и обнаружения
ENZYME	EM5	500 мкл	- RTase - ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (UDG) - Буфер, содержащий dNTPs
BUFFER	Буфер EM5	500 мкл	Буфер для ПЦР в реальном времени - Буфер, содержащий BSA и глицерин
CONTROL +	RV-EA PC	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогена и IC
CONTROL IC	RV-EA IC	1,000 мкл	Экзогенный внутренний контроль (ВК)
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для удобной интерпретации результатов
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или ее региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА

Все компоненты Allplex™ RV Essential Assay следует хранить при температуре ≤ -20°C. Все компоненты стабильны при рекомендуемых условиях хранения до истечения срока годности, указанного на этикетке. Данный продукт можно использовать в течение 30 дней после первого вскрытия набора, и его эффективность не меняется в течение 5 циклов замораживания и размораживания. Если реагенты будут использоваться лишь периодически, их следует хранить в аликвотах.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые неопудренные перчатки (латексные или нитриловые)
- Пипетки (регулируемые) и стерильные наконечники для пипеток
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл
- Набор для выделения нуклеиновых кислот (см. Выделение нуклеиновых кислот)
- Чистое место
- Ледогенератор
- Настольная центрифуга
- Вихревой смеситель
- CFX96™ Система детекции ПЦР в реальном времени (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Низкопрофильные стрипы на 8 пробирок объемом 0,2 мл без крышек (белый цвет, кат. номер TLS0851, Bio-Rad)
- Оптические плоские полоски на 8 колпачков (кат. номер TCS0803, Bio-Rad)
- Hard Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые (кат. № HSP9655, Bio-Rad)
- Hard Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые, со штрих-кодом (кат. № HSP9955, Bio-Rad)
- Постоянная прозрачная термозапечатка (кат. № 1814035, Bio-Rad)*.
- Герметизатор для ПЦР-пластин PX1 (автоматический герметик, кат. № 181-4000, Bio-Rad)*.

  * Убедитесь, что вы используете термозапайку и запайщик пластин, перечисленные выше, вместе.
- Стрип EU 0,1 мл 8 пробирок, LP, W, Extra Robust (кат. номер B72719, BIOplastics)
- EU Optical Wide area 8-Cap Strip (кат. номер B57801, BIOplastics)
- 96 x 0,1 мл, LP, W, FULL, 96-луночный планшет (кат. № B70679, BIOplastics)**.
- Оптический герметизирующий лист Opti-Seal (кат. № 157300, BIOplastics)**.

  ** Для расходных материалов BIOplastics 96-луночные планшеты должны использоваться только с оптическим уплотнительным листом.

ПРОТОКОЛ

1. Сбор, хранение и транспортировка образцов

Примечание: Все образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал. Разрешается использовать только те образцы, которые собраны, хранятся и транспортируются в строгом соответствии со следующими правилами и инструкциями.

Примечание: чтобы обеспечить высокое качество образцов, их следует транспортировать как можно быстрее и при указанных температурах.

A. Сбор образцов

Назофарингеальный аспират, Назофарингеальный мазок, Бронхоальвеолярный лаваж

- Образцы носоглоточного аспирата, носоглоточного мазка и бронхоальвеолярного лаважа регулярно исследуются на наличие распространенных респираторных патогенов.

Производитель	Устройство для взятия образцов	Кат. №.
COPAN	ESwab	482CE
COPAN	ПЕРНАЗАЛЬНЫЙ АППЛИКАТОР ENAT PM 2 МЛ	606CS01P
COPAN	UTM с флокированными тампонами	360C / 305C
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ГИБРИДЫ	UTM с гибким флокированным тампоном Minitip	403C / 406C
COPAN	MSwab® комплект	6E012N / 6E013N
COPAN	MSwab® bulk	6E011N
Noble Biosciences	Клиническая среда для переноса вирусов (CTM)	UTNFS-3B-2-N1P / UTNFS-3B-2
SG Medical	Набор GeneTM (GTS1)	T5002
SG Medical	Набор GeneTM (GTS2)	T5001
SG Medical	Набор ALLTM (ATS 1)	T5004
SG Medical	Набор ALLTM (ATS 2)	T5003
SG Medical	ALLTM Medium	T5103

B. Хранение и транспортировка образцов

Образец	Хранение и транспортировка		Примечание
	Темп.	Продолжительность*	
Назофарингеальный аспират	2~8°C	3 дня	- На характеристики может повлиять длительное хранение образцов. - Образцы также должны соответствовать местным и национальным инструкциям по транспортировке патогенного материала.
Мазок из носоглотки			
Бронхоальвеолярный лаваж			

*** Продолжительность:** Период времени от взятия образца до проведения окончательного теста (включает транспортировку и хранение образцов до проведения теста).

2. Выделение нуклеиновых кислот

[Методы экстракции в различных образцах].

Примечание: пожалуйста, используйте автоматическую систему экстракции в соответствии с образцом, указанным в следующей таблице.

Образец	Автоматизированная система экстракции						
	Microlab NIMBUS IVD / STARlet IVD		Seegene NIMBUS / STARlet		KingFisher Flex*	MagNA Pure 96*	Maelstrom ™ 9600**
	Универсальный набор картриджей	Набор вирусной ДНК/РНК 200C**	Универсальный набор картриджей	Набор вирусной ДНК/РНК 200C**			
Назофарингеальный аспират	O	X	O	X	O	O	X
Мазок из носоглотки	O	O	O	O	O	O	O
Бронхоальвеолярный лаваж	O	X	O	X	X	X	X

* Бронхоальвеолярный лаваж не был валидирован с KingFisher Flex и MagNA Pure 96.

** Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были валидированы с набором STARMag 96 X 4 Viral DNA/RNA 200 C Kit и Maelstrom™ 9600.

A. Внутренний контроль

Примечание: ВК, входящий в состав набора, позволяет пользователю не только подтвердить правильность процедуры выделения нуклеиновых кислот, но и выявить любое ингибирование ПЦР.

- При использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS или Seegene STARlet пробирка RV-EA IC должна быть загружена в оборудование для экстракции до выделения нуклеиновых кислот.
- При использовании KingFisher Flex или MagNA Pure 96 перед выделением нуклеиновых кислот в каждый образец добавляют 10 мкл RV-EA IC.

B. Автоматизированная система выделения нуклеиновых кислот

Примечание: пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. В остальных случаях обратитесь к протоколу производителя.

B-1. Microlab NIMBUS IVD

Автоматизированная система экстракции	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C**	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* * Пожалуйста, используйте номера каталогов, указанные выше, для покупки продукции Seegene Inc.

** Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были проверены

B-2. Microlab STARlet IVD

Автоматизированная система экстракции	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
Универсальный наборкартриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C**	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

Пожалуйста, используйте каталожные номера, указанные выше, для покупки продукции Seegene Inc.

** Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были проверены.

B-3. Seegene NIMBUS

Автоматизированная система экстракции	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C*	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

B-4. Seegene STARlet

Автоматизированная система экстракции	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C*	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

B-5. Система очистки KingFisher™ Flex, KingFisher с насадкой на 96 глубоких лунок

Автоматизированная система экстракции	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Система очистки KingFisher™ Flex, KingFisher с головкой на 96 глубоких лунок	Thermo Fisher Scientific	5400630	-
MagMAX™ Набор для выделения нуклеиновых кислот вирусов/патогенов*	Thermo Fisher Scientific	A42352	Образец: 200 мкл Элюирование: 80 мкл

* Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-6. MagNA Pure 96

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
MagNA Pure 96	Roche Diagnostics	06541089001	-
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit*	Roche Diagnostics	06543588001	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

* Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-7. Maelstrom™ 9600

- Проведите процесс экстракции, используя **протокол '665-Rapid'.**

Автоматизированная система экстракции	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Maelstrom™ 9600	Taiwan Advanced Nanotech Inc..	M9600*	-
TANBead® Набор для выделения нуклеиновых кислот OptiPure Viral Auto Tube**	Taiwan Advanced Nanotech Inc..	W665S66*	Образец: 300 мкл Элюирование: 80 мкл
Набор для выделения нуклеиновых кислот TANBead® OptiPure Viral Auto Plate**	Taiwan Advanced Nanotech Inc..	W665A46	Образец: 300 мкл Элюирование: 80 мкл
TANBead® Набор для выделения нуклеиновых кислот OptiPure Viral Bulk Plate**	Taiwan Advanced Nanotech Inc..	W665A10*	Образец: 300 мкл Элюирование: 80 мкл

* Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

** Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

1. Подготовка к одностадийной RT-PCR в режиме реального времени

Примечание: необходимо использовать правильные пробирки и колпачки (см. раздел МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НУЖНЫ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЕНЫ).

Примечание: при подготовке одноэтапных реакций RT-ПЦР необходимо использовать аэрозолестойкие фильтрующие насадки и плотные перчатки. Будьте предельно осторожны, чтобы предотвратить перекрестное загрязнение.

Примечание: полностью разморозьте все реагенты на льду.

Примечание: прокрутите пробирки с реагентами, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.
Примечание: Этапы A~D выполняются автоматически на приборах Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS и Seegene STARlet. Обратитесь к руководству по эксплуатации каждого прибора.

A. Приготовьте одностадийный мастермикс для RT-PCR.

5 мкл	RV-EA MOM
5 мкл	EM5
5 мкл	Буфер EM5
15 мкл	Общий объем одностадийной смеси для RT-PCR

Примечание: Рассчитайте общее количество каждого реагента, исходя из количества реакций, включая образцы и контроль.

B. Быстро перемешайте вихревым методом и коротко.

C. Аликвотируйте 15 мкл одностадийной смеси для RT-PCR Mastermix в пробирки для ПЦР.

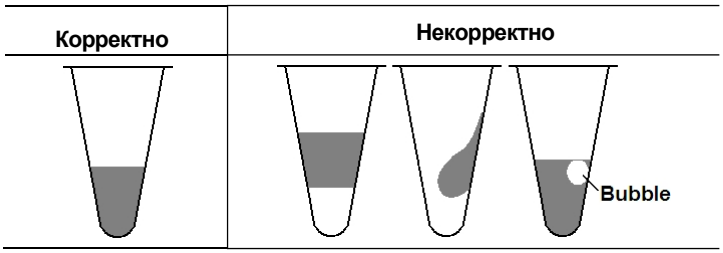
D. Добавьте 5 мкл нуклеиновых кислот каждого образца в пробирку, содержащую аликвоту одностадийной RT- PCR Mastermix.

15 мкл	Мастермикс для одностадийной RT-PCR
5 мкл	Нуклеиновая кислота образца
20 мкл	Общий объем реакции

E. Закройте крышку и ненадолго прокрутите пробирки для ПЦР.

F. Убедитесь, что жидкость, содержащая все компоненты ПЦР, на дне каждой пробирки для ПЦР. Если это не так, повторите центрифугирование при более высокой скорости вращения в течение более длительного времени.

Примечание: перед проведением ПЦР рекомендуется центрифугировать пробирки, чтобы удалить пузырьки воздуха и собрать остатки жидкости на дне пробирок.



Bubble	Пузыри воздуха

Примечание: для каждого образца используйте новый стерильный наконечник пипетки.

Примечание: для **отрицательного контроля (ОК)** вместо нуклеиновой образца используйте 5 мкл воды, не содержащей РНКазы.

Примечание: для **положительного контроля (ПК)** используйте 5 мкл ПК RV-EA вместо нуклеиновой образца.

Примечание: пожалуйста, будьте осторожны, не допускайте перекрестного загрязнения одностадийной RT-PCR мастер-миксом и образцами с положительным контролем.

Примечание: не маркируйте реакционную пробирку на ее крышке. Флуоресценция обнаруживается в верхней части каждой реакционной пробирки.

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

1. CFX96™ Система обнаружения ПЦР в реальном времени (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) может быть разделена на три этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск эксперимента.

A. Настройка протокола

1) В главном меню выберите **File (Файл)**→ **New (Новый)**→ **Protocol (Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor** (**Редактор протоколов)**.

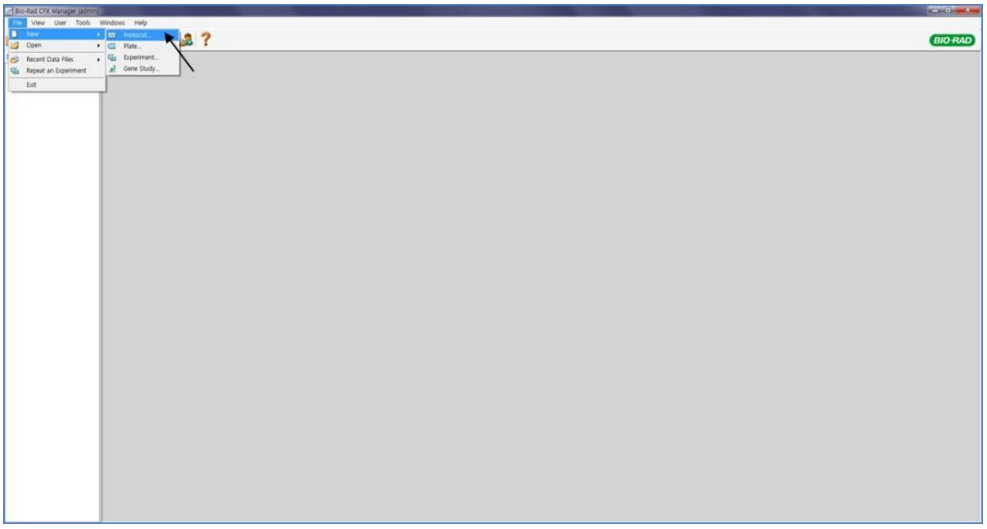


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **Protocol Editor** (**Редакторе Протоколов)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	50 C°	20 мин
2		95 C°	15 мин
3	45	95 C°	10 сек
4*		60 C°	15 сек
5*		72 C°	10 сек
6	GOTO Шаг 3, еще 44 раза		

*** Считывание с планшета на шаге 4 и 5**. Флуоресценция определяется при 60°C и 72°C.

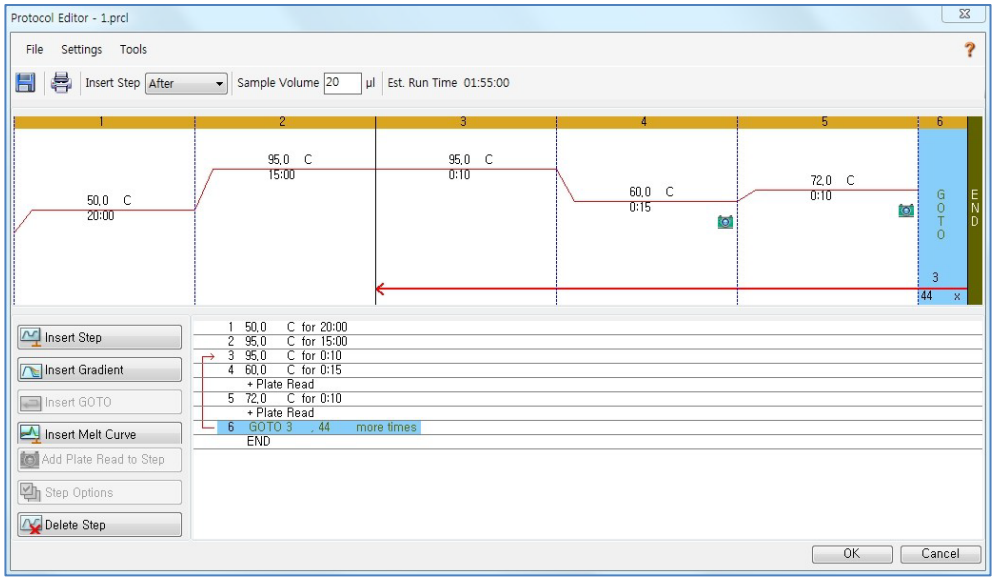


Рис. 2. **Редактор протоколов**

3) Щелкните на поле рядом с **Sample Volume** (**Объем образца)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл.

4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Experiment Setup (Настройка эксперимента)**.

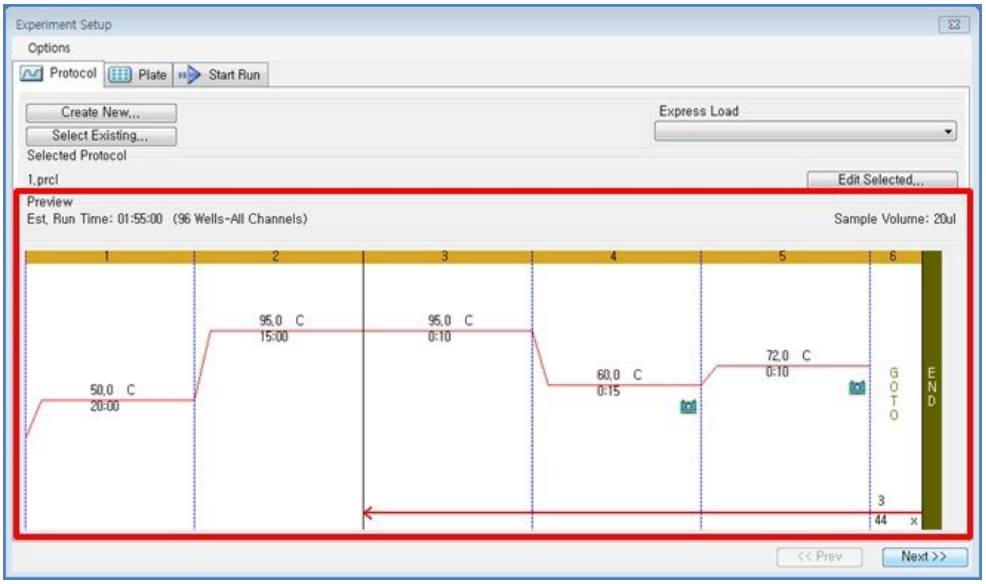


Рис. 3. **Настройка эксперимента: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **Plate (Планшет)** в **Experiment Setup (Настройка Эксперимента)** нажмите **Create New (Создать Новый)**, чтобы открыть окно **Plate Editor (Редактор Планшета).**

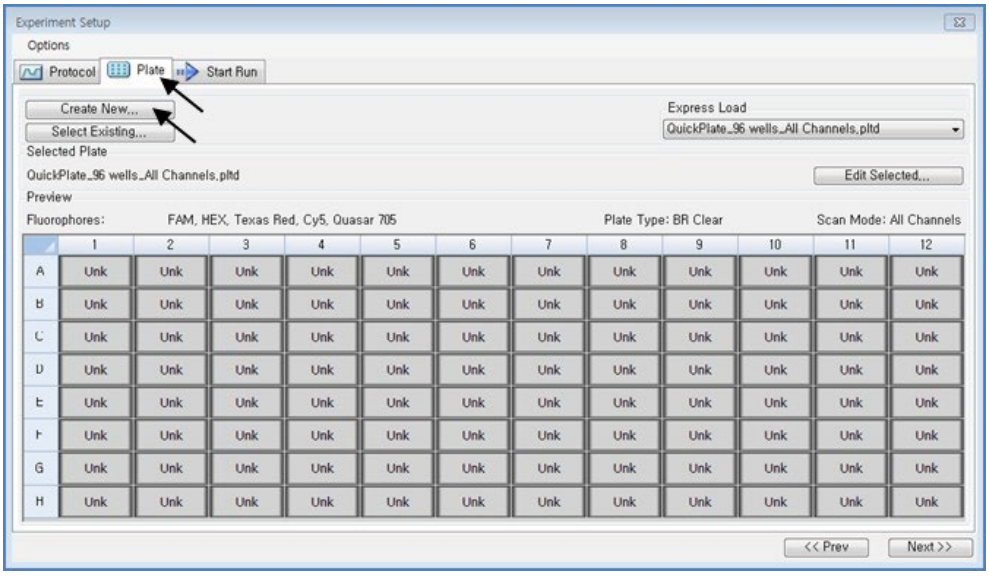


Рис. 4. **Редактор планшета**

2) Нажмите **Select Fluorophores (Выбрать Флуорофоры)**, чтобы указать флуорофоры (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), которые будут использоваться, и нажмите **OK.**

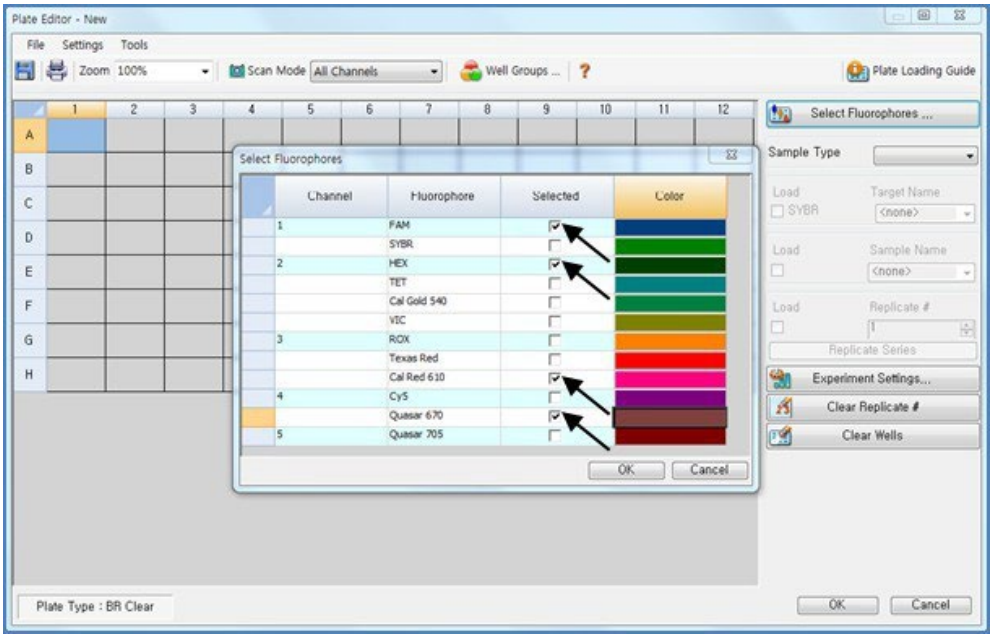


Рис. 5. **Выбор флуорофоров**

3) Выберите лунки, в которые будет помещена пробирка ПЦР, и выберите тип образца из списка раскрывающегося меню **Sample Type (Тип Образца)**.

- **Неизвестный**: Клинические образцы

Отрицательный контроль

Положительный контроль

4) Щелкните по соответствующим флажкам (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **Sample Name (Имя Образца)** и нажмите клавишу ввода.

6) В разделе **Settings** (**Настройки)** главного меню **Plate Editor (Редактора Планшетов) выберите Plate Size (96 wells) (Размер Планшета (96 лунок)** и **Plate Type (BR White) (Тип Планшета (BR белый).**

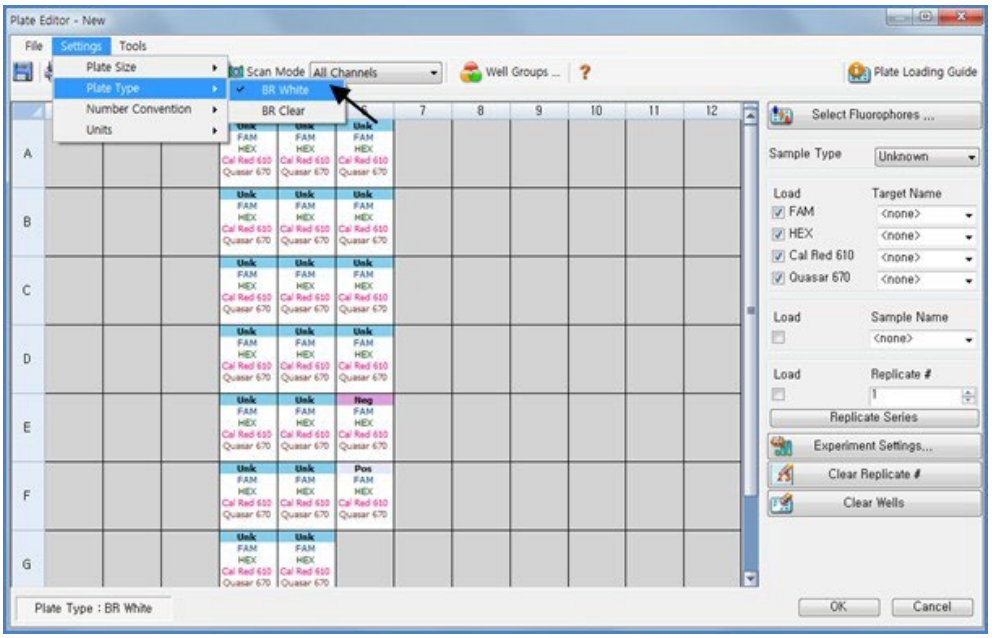


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **OK**, чтобы сохранить новый планшет.

8) Вы вернетесь в окно **Experiment Setup (Настройки Эксперимента)**.

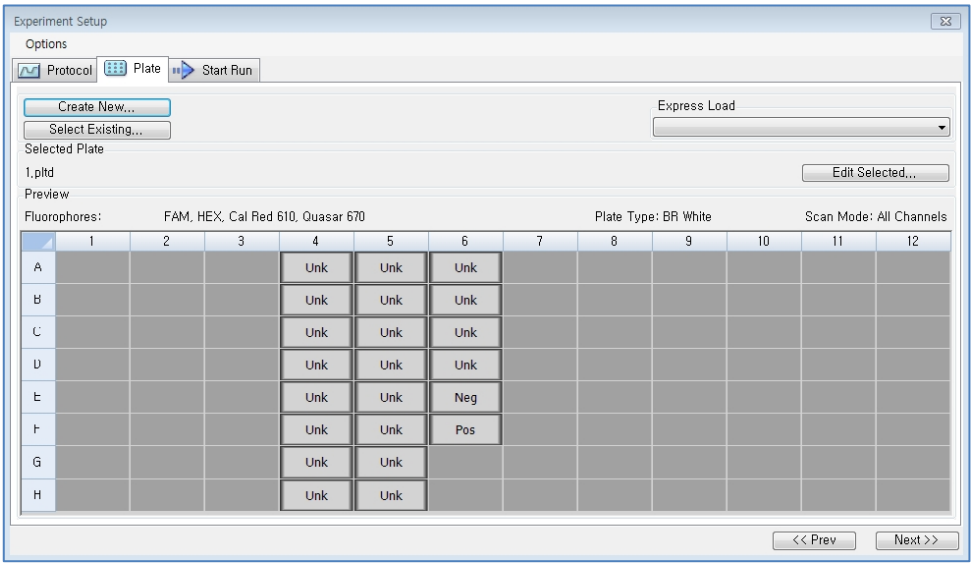


Рис. 7. **Настройки Эксперимента: Планшет**

9) Нажмите кнопку **Next (Далее)**, чтобы начать выполнение.

C. Начать запуск

1) На вкладке **Start Run (Начать Запуск)** в разделе **Experiment Setup (Настройки Эксперимента)** нажмите **Close Lid (Закрыть Крышку)**, чтобы закрыть крышку прибора.

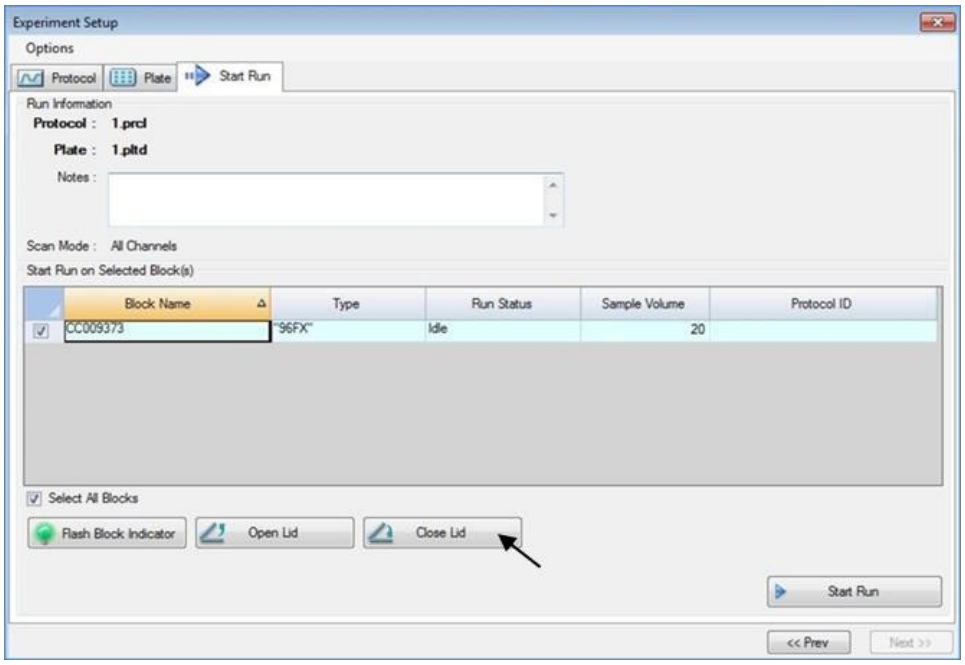


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2) Нажмите кнопку **Start Run (Начать запуск)**.

3) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **SAVE (СОХРАНИТЬ)**, и запуск начнется.

1.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные для всех этапов определения кривой амплификации в файле результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть любым по желанию пользователя (Для функции "Экспорт Seegene" автоматически создаются папки "QuantStep4" и "QuantStep5" для сохранения данных кривых амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX Manager™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **Quantitation (Количественная Оценка)**, чтобы подтвердить результаты кривой амплификации.

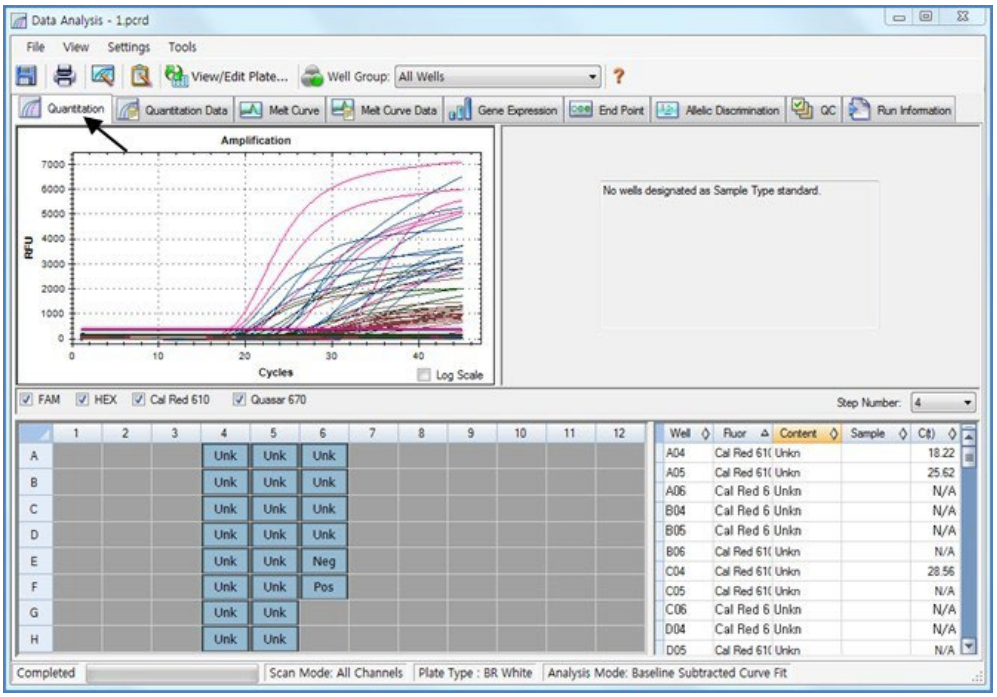


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

2. Выберите **No Baseline Subtraction (Без вычитания базовой линии)** в пункте **Analysis Mode** (**Режим анализа)** меню **Settings** (**Настройки**).

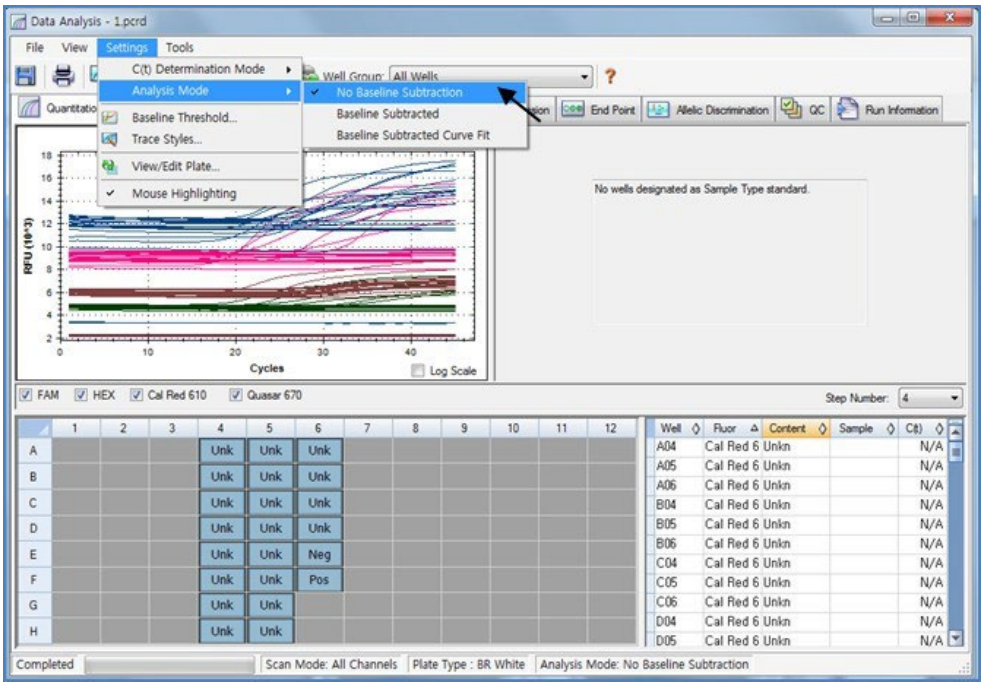


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите **Seegene Export (Экспорт Seegene)** в меню **Tools (Инструменты).**

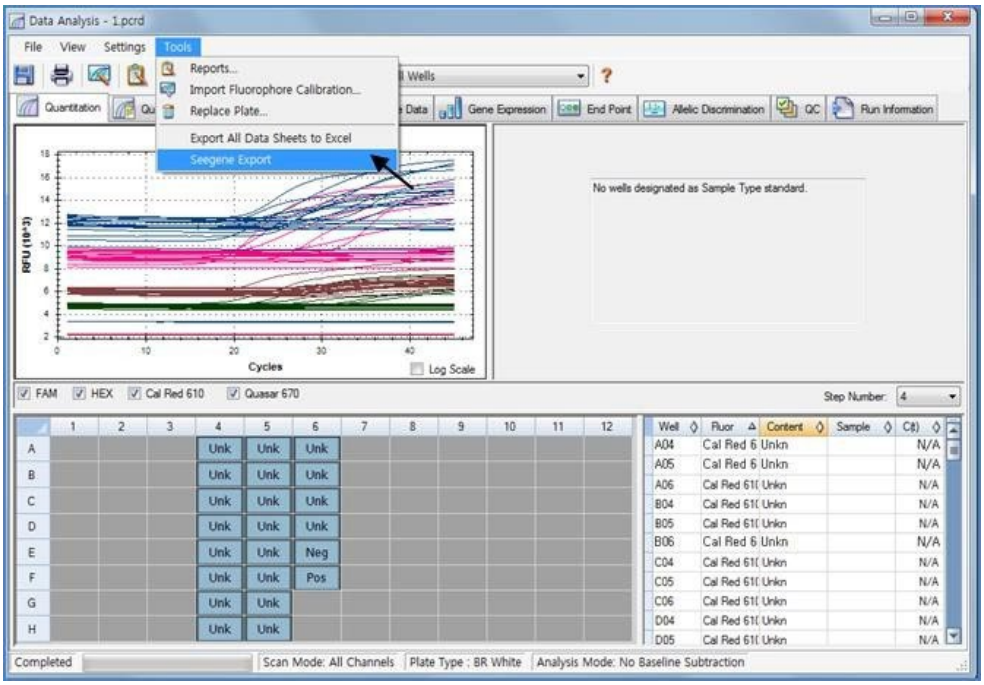


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

3) Выберите место для сохранения данных и нажмите **OK**.

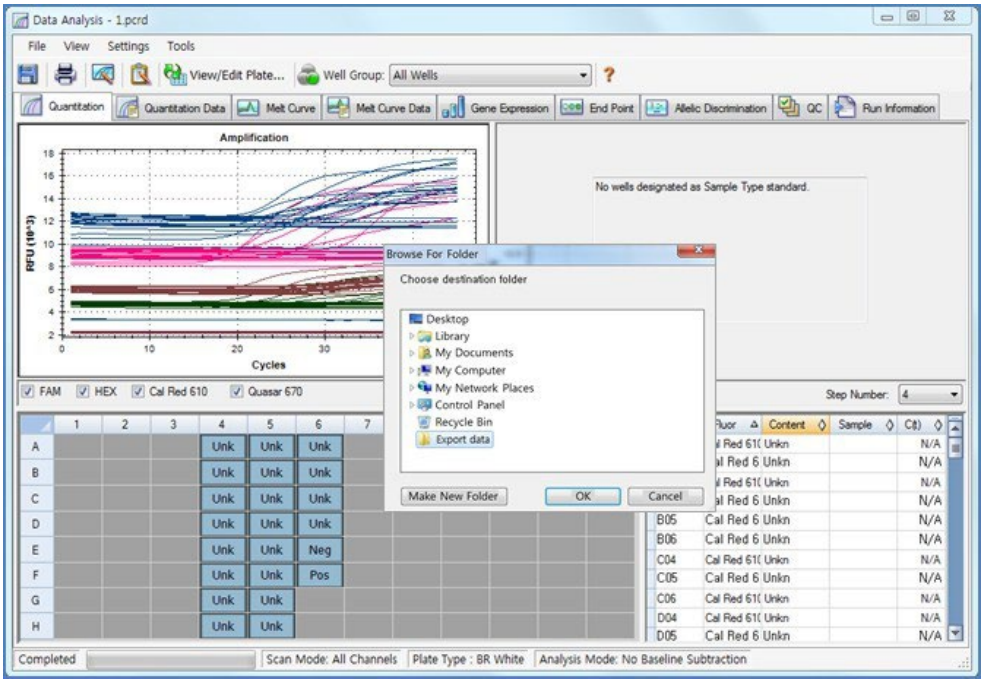


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **Option** (**Параметры**), чтобы выбрать **CFX96** в **Instrument (Инструмент).**

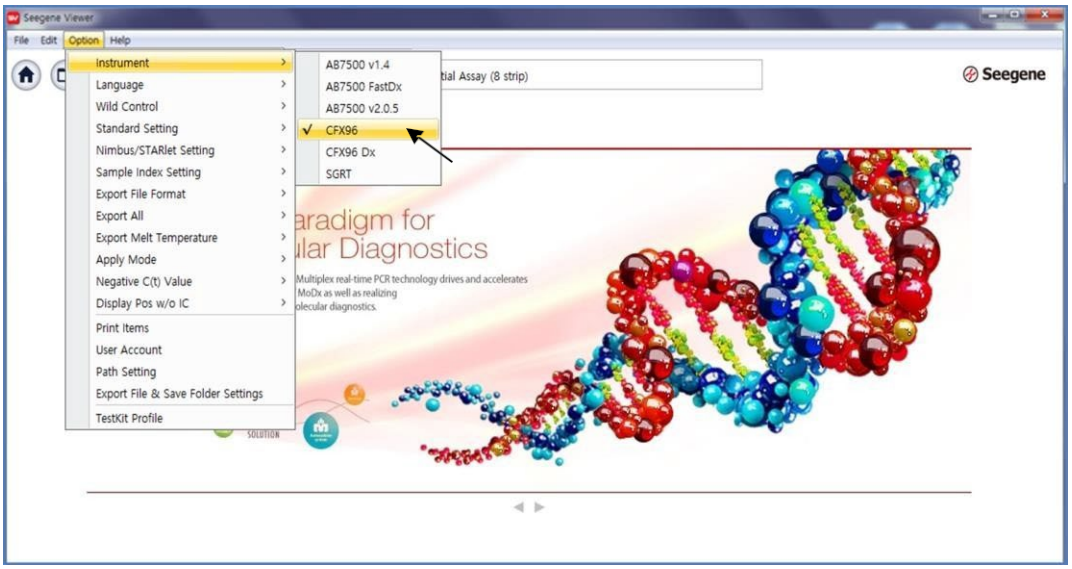


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите кнопку **Open (Открыть)**, чтобы найти сохраненный файл в папке "QuantStep4", откройте файл результатов и выберите тестовый набор в меню **PRODUCT (ПРОДУКТ).**

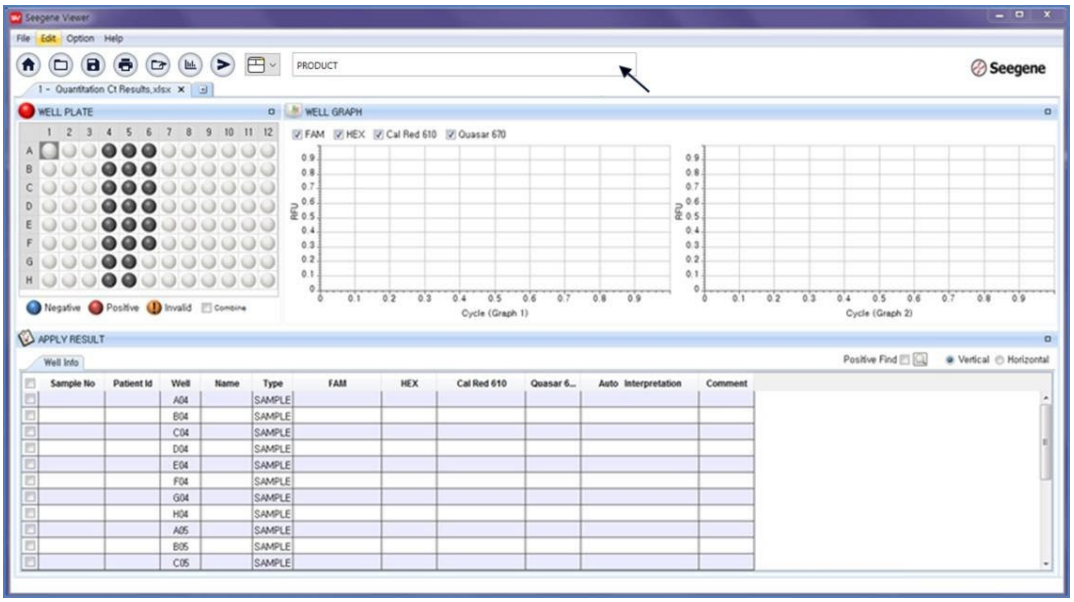


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

Примечание: пожалуйста, проверьте тип пробирки при выборе набора для тестирования.

3) Проверьте результат для каждой лунки.

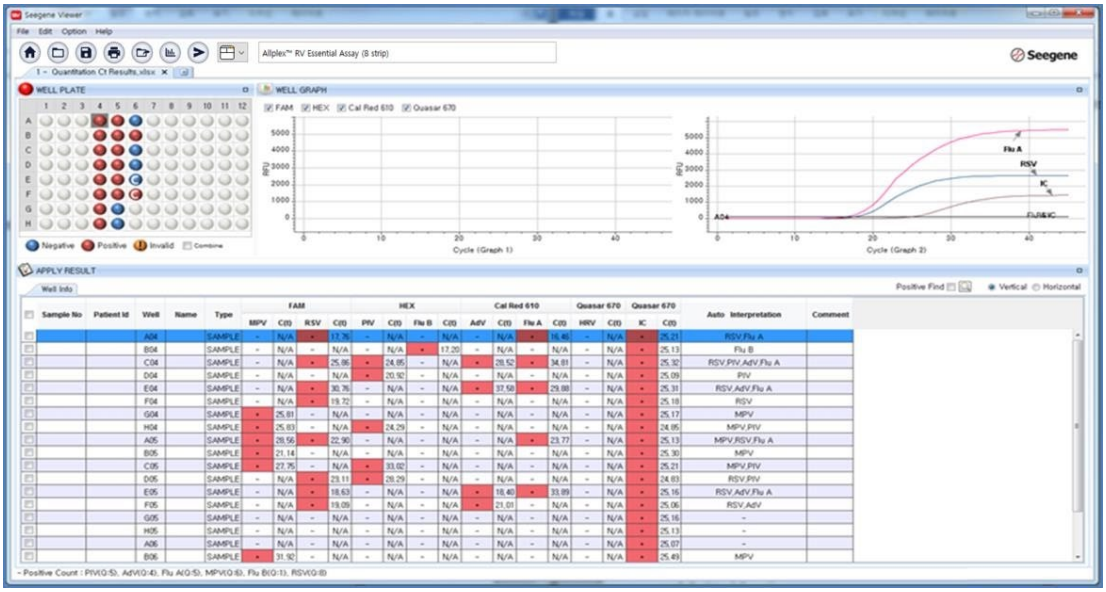


Рис. 15. **Результат тестирования в программе Seegene Viewer**

4) Критерии валидности результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для подтверждения достоверности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и ОК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие критерии:

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer (Ct)								
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		Авто интерпретация
	MPV	RSV	PIV	Грипп B	AdV	Грипп A	HRV	BK	
RV-EA Положительный контроль	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Отрицательный контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае нарушения валидности результаты пробы не следует интерпретировать или сообщать, а необходимо повторить запуск.

2. Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Dx System (Bio-Rad) может быть разделена на три этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск эксперимента.

A. Настройка протокола

1) В главном меню **выберите File (Файл)**→ **New (Новый)**→ **Protocol (Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор Протоколов)**.

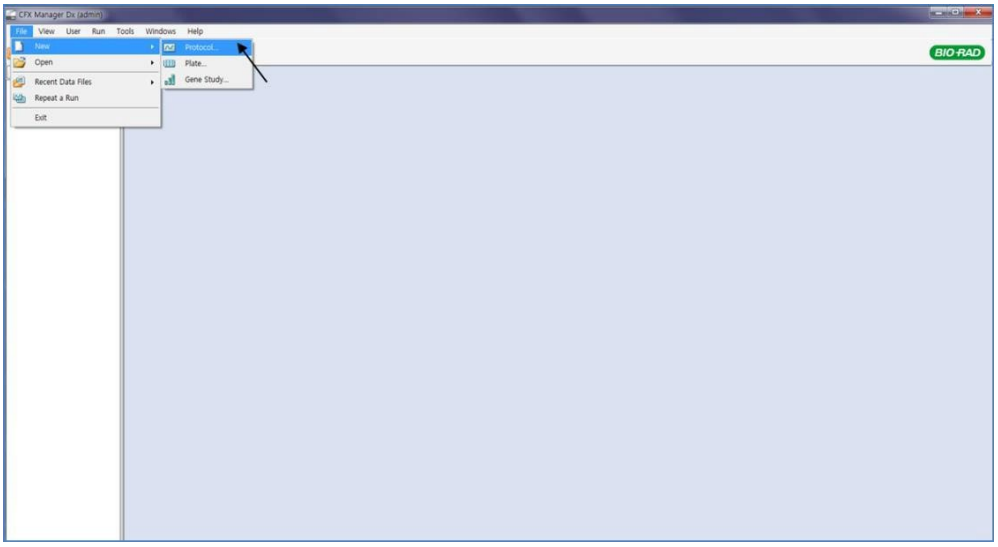


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **Protocol Editor (Редакторе Протоколов)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	50 C°	20 мин
2		95 C°	15 мин
3	45	95 C°	10 сек
4*		60 C°	15 сек
5*		72 C°	10 сек
6	GOTO Шаг 3, еще 44 раза		

*** Считывание с планшета на шаге 4 и 5**. Флуоресценция определяется при 60°C и 72°C.

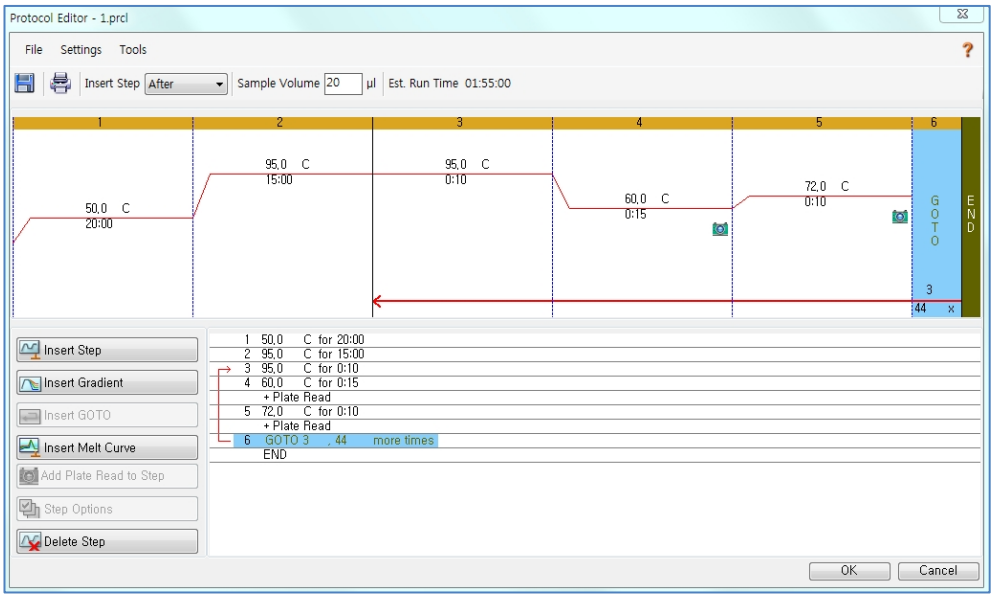


Рис. 2. **Редактор протоколов**

3) Щелкните на поле рядом с **Sample Volume (Объем Образца)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл

4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Run Setup (Настройка Запуска)**.

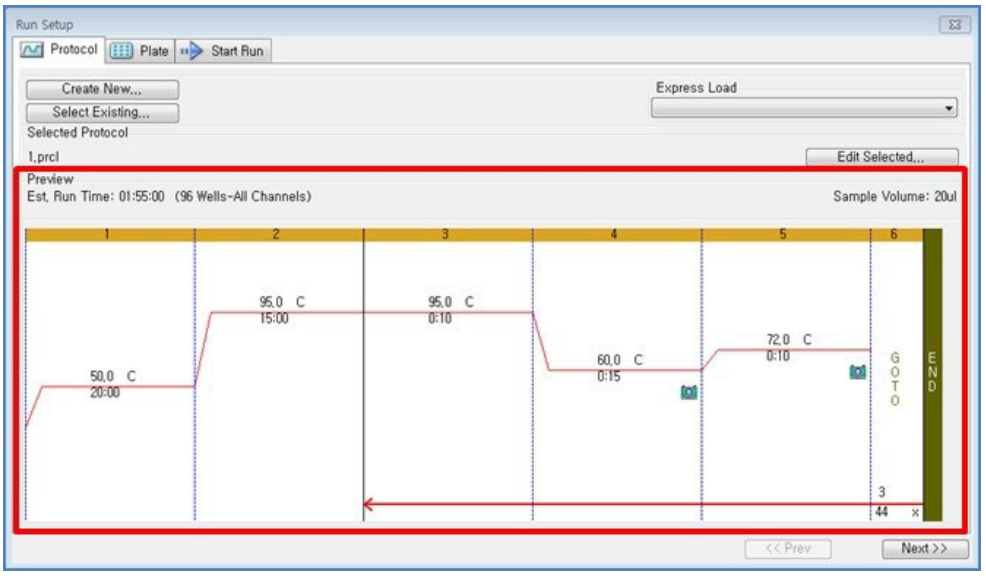


Рис. 3. **Настройка запуска: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **Plate (Планшет)** в **Run Setup (Настройка запуска)** нажмите **Create New (Создать Новый)**, чтобы открыть окно **Plate Editor (Редактор Планшета).**

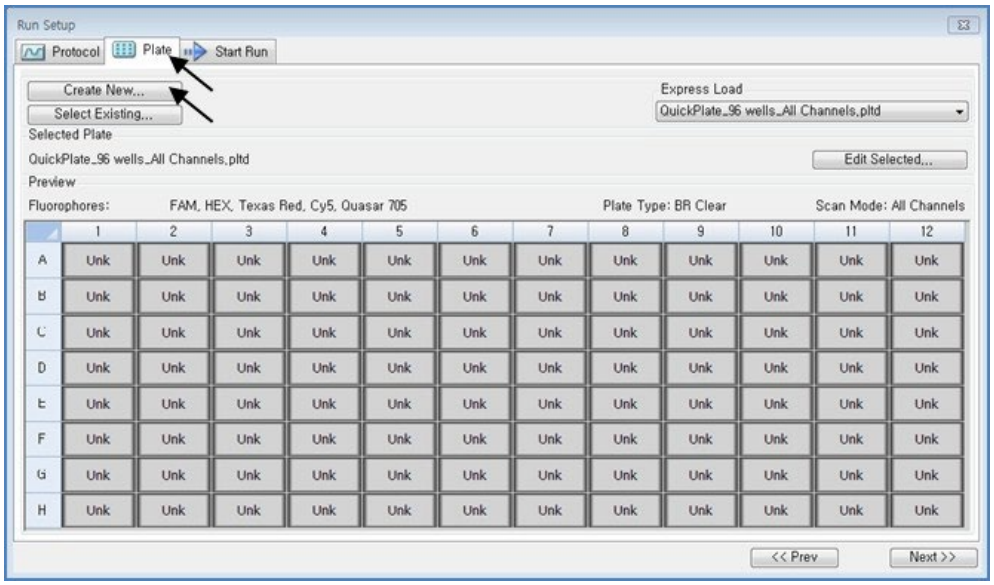


Рис. 4. **Редактор планшета**

2) Нажмите кнопку **Select Fluorophores (Выбрать флуорофоры),** чтобы указать флуорофоры (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610***, ***Quasar 670, Quasar 705***), которые будут использоваться, и нажмите **OK.**

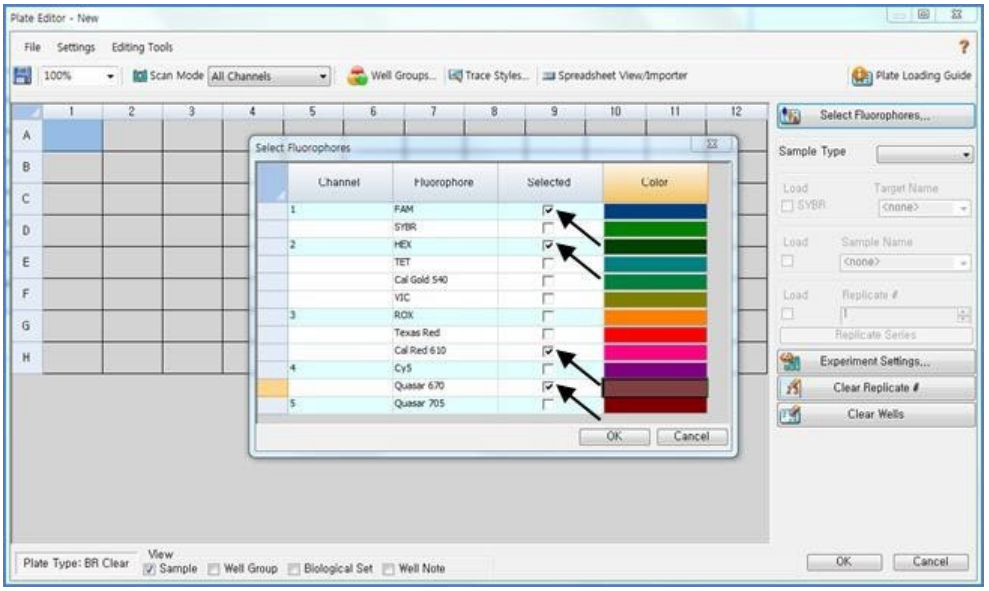


Рис. 5. **Выбор флуорофоров**

3) Выберите лунки, в которые будет помещена пробирка ПЦР, и выберите тип образца из списка раскрывающегося меню **Sample Type (Тип образца)**.

Неизвестный: Клинические образцы

Отрицательный контроль

Положительный контроль

4) Щелкните по соответствующим флажкам (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **Sample Name (Имя Образца)** и нажмите клавишу ввода.

6) В разделе **Settings (Настройки)** главного меню **Plate Editor (Редактора Планшетов)** выберите **Plate Size (96 wells) (Размер планшета (96 лунок)** и **Plate Type (BR White) (Тип планшета (BR White).**

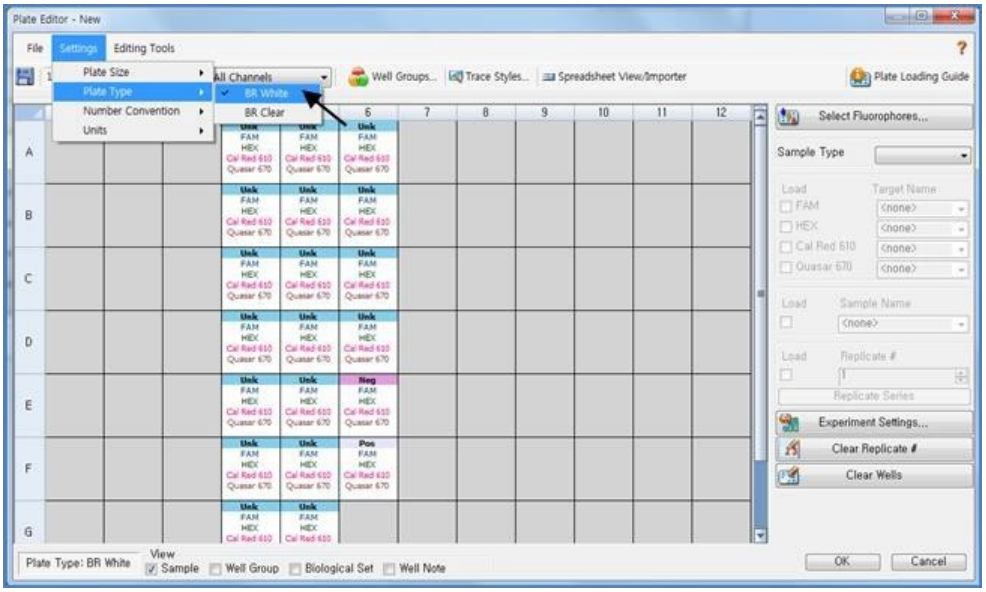


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **OK,** чтобы сохранить новый планшет.

8) Вы вернетесь в окно **Run Setup (Настройка запуска).**

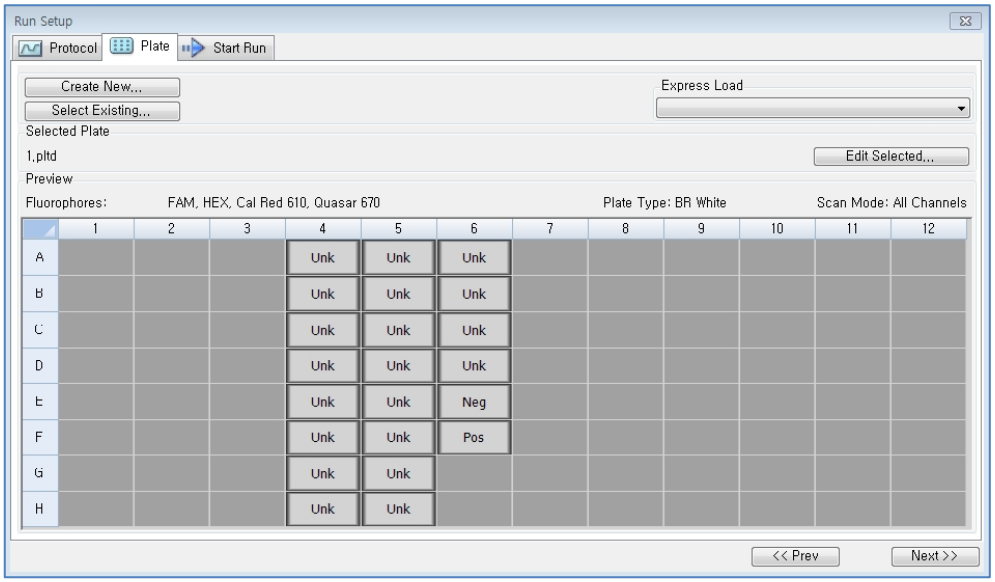


Рис. 7. **Настройка запуска: Планшет**

9) Нажмите кнопку **Next (Далее)**, чтобы начать запуск.

C. Начать запуск

1) На вкладке **Start Run (Начать запуск**) в разделе **Run Setup (Настройка запуска**) нажмите **Close Lid** (**Закрыть крышку**), чтобы закрыть крышку прибора

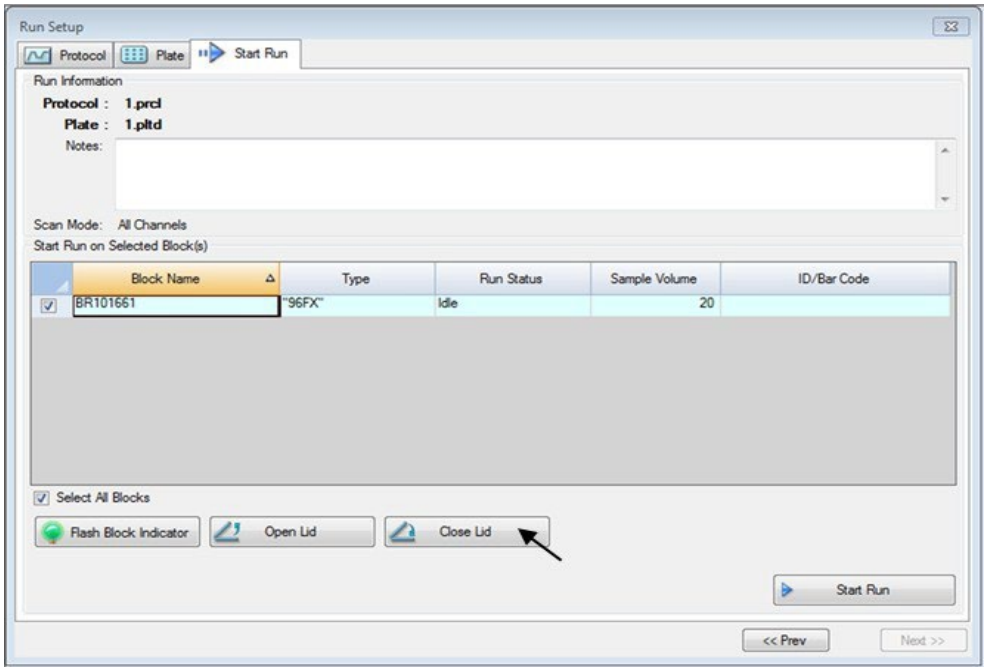


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2)Нажмите кнопку **Start Run (Начать запуск)**.

3)Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **SAVE (СОХРАНИТЬ)**, и запуск начнется.

2.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные для всех этапов определения кривой амплификации в файле результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть любым по желанию пользователя (Для функции "Экспорт Seegene " автоматически создаются папки "QuantStep4" и "QuantStep5" для сохранения данных кривых амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX Manager™

3) После проведения теста перейдите на вкладку **Quantification (Количественное Определение)**, чтобы подтвердить результаты кривой амплификации.

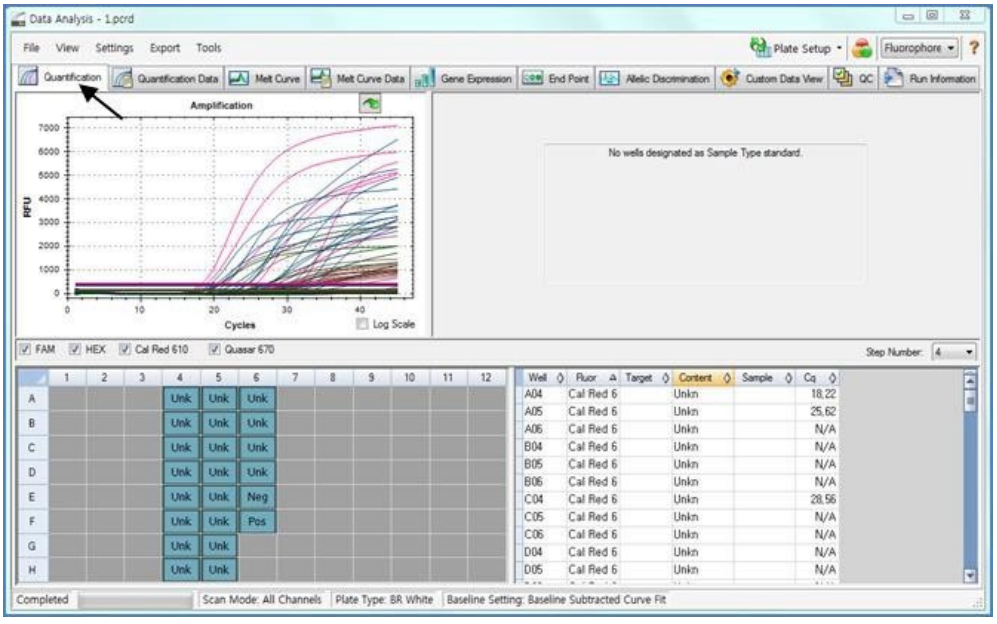


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

4) Выберите **No Baseline Subtraction (Без вычитания базовой линии)** в **Baseline Setting** (**Настройки базовой линии)** в меню **Setting** (**Настройки)/**

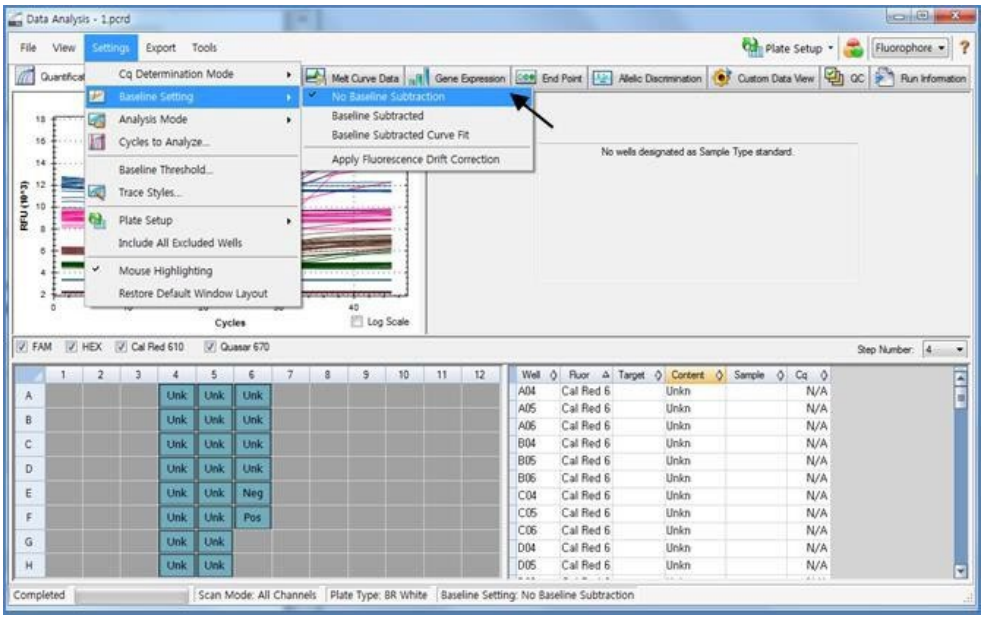


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

5) Выберите **Export Seegene** (**Экспорт Seegene)** в меню **Export (Экспорт)**.

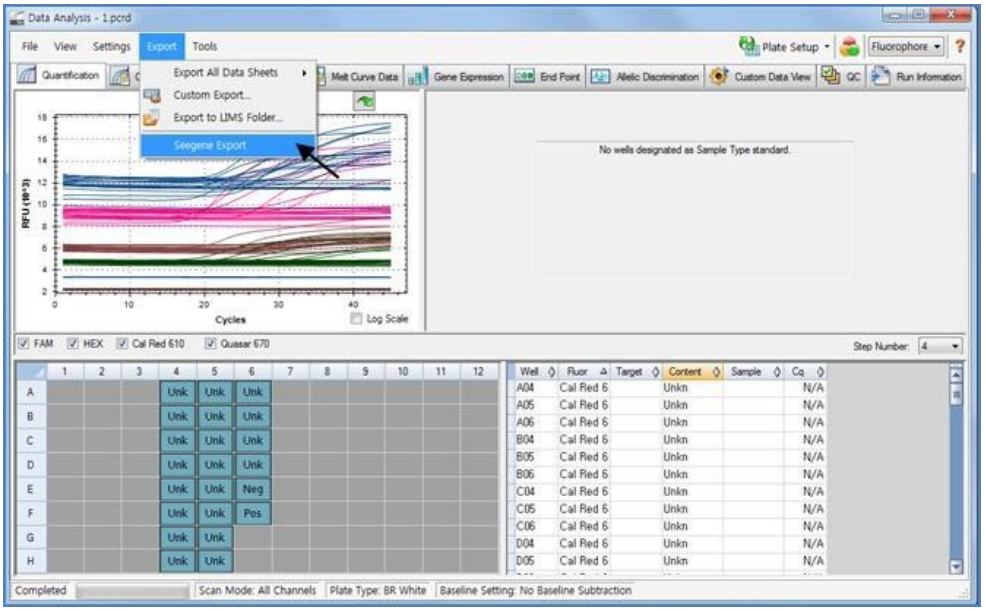


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

6) Выберите место для сохранения данных и нажмите **OK**.

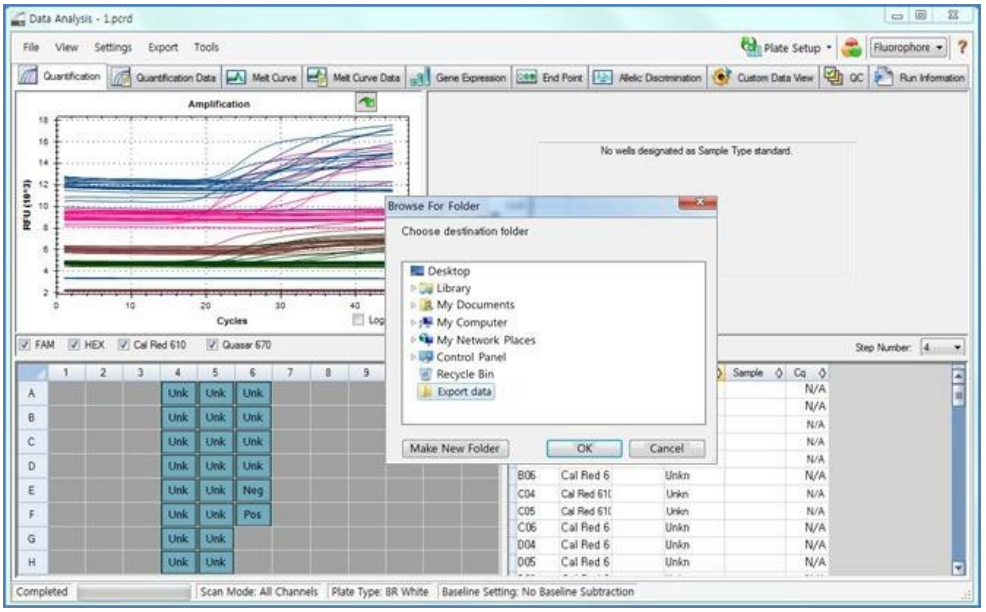


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **Option (Параметры),** чтобы выбрать **CFX96 Dx** в меню **Instrument (Инструмент)**.

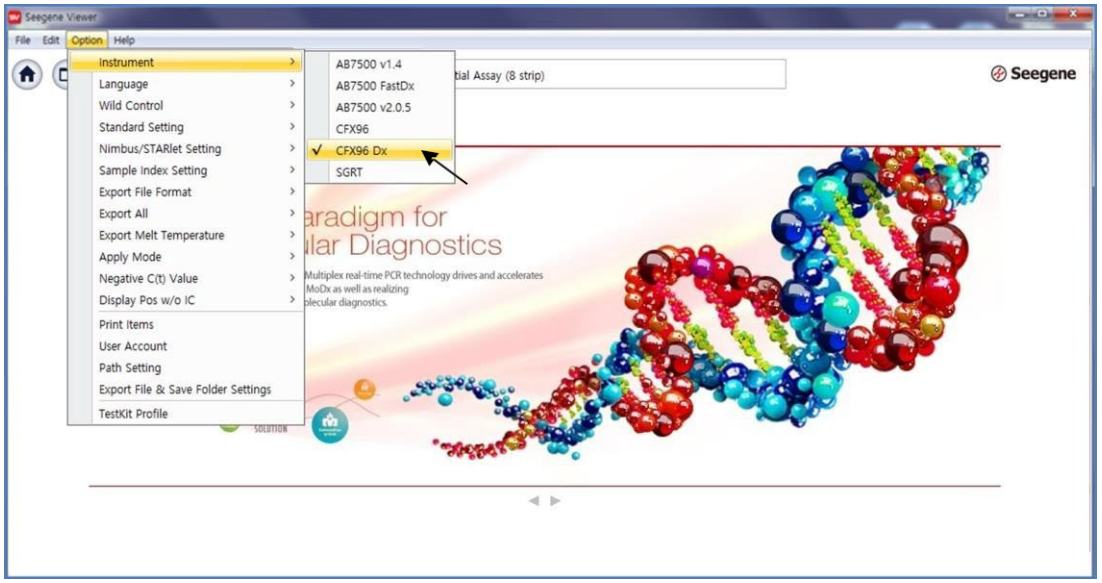


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите кнопку **Open (Открыть)**, чтобы найти сохраненный файл в папке "QuantStep4", откройте файл результатов и выберите тестовый набор в меню **PPRODUCT** (**ПРОДУКТ**).

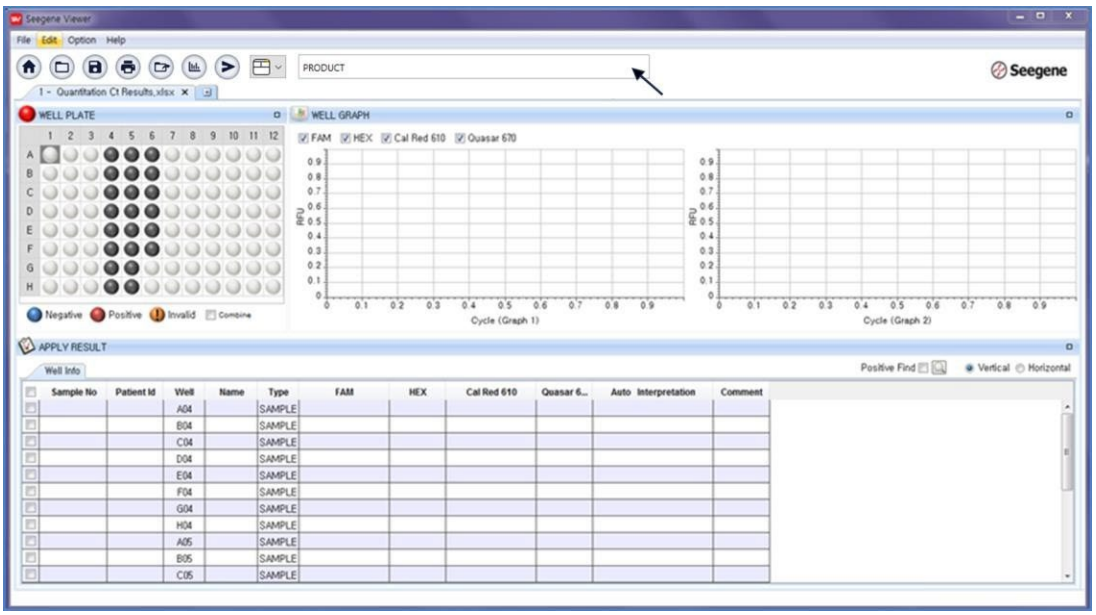


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

Примечание: пожалуйста, проверьте тип пробирки при выборе набора для тестирования.

3) Проверьте результат для каждой лунки.

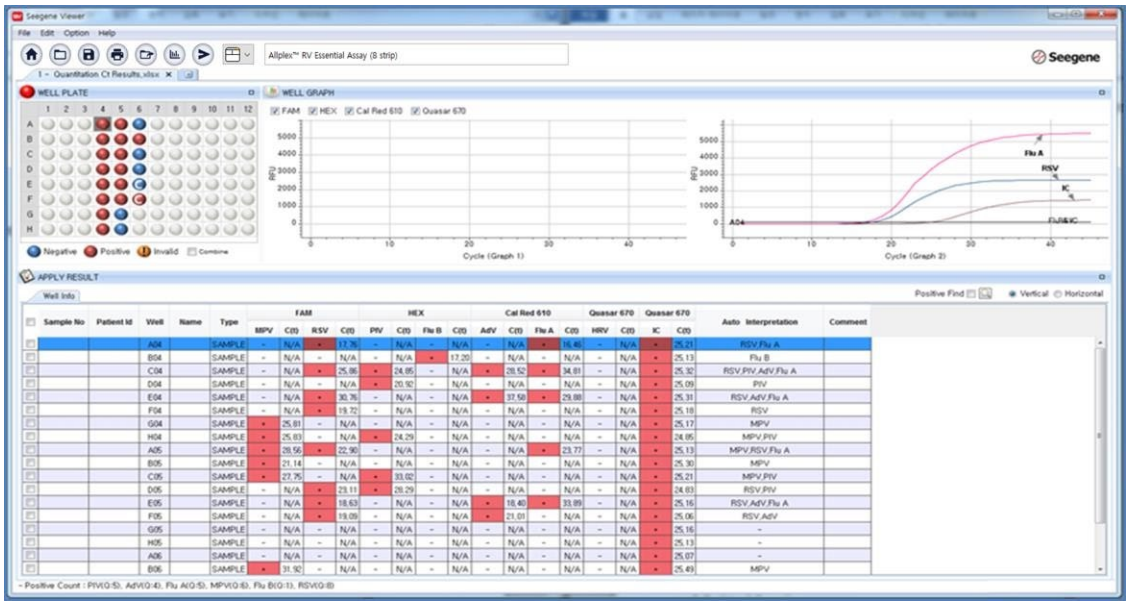


Рис. 15. **Результат тестирования в программе Seegene Viewer**

4) Критерии валидности результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для подтверждения достоверности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и ОК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие критерии:

Контроль	Результат работы Seegene Viewer (Ct)								
	FAM		HEX		Cal Red610		Quasar 670		Авто интерпретация
	MPV	RSV	PIV	Грипп B	AdV	Грипп A	HRV	BK	
RV-EA Положительный контроль	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Отрицательный контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае нарушения достоверности результаты не следует интерпретировать или сообщать о них, а ПЦР- реакцию необходимо повторить.

.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Интерпретация результатов

Флуорофор	Аналит	
	График 1	**График 2**
FAM	MPV	RSV
HEX	PIV	Грипп B
Cal Red 610	AdV	Грипп A
Quasar 670	HRV	IC

Значение Ct	**Результат**
≤ 40	Обнаружено (+)
> 40 или N/A	Не обнаружено (-)

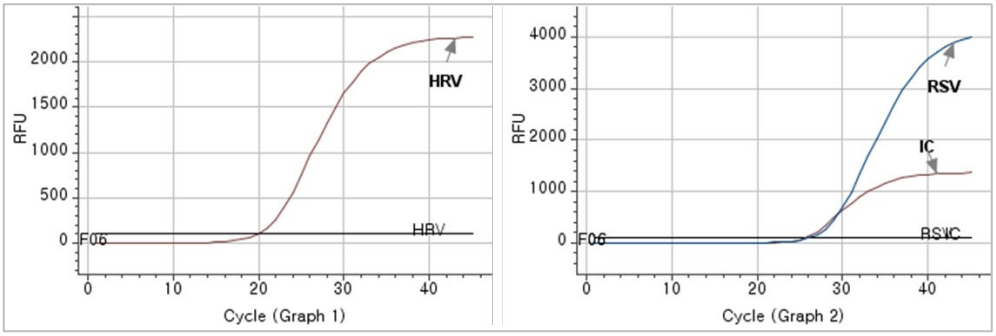
Целевой результат			**Интерпретация**
График 1	**График 2**	**Результат IC**	
+	-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаруженная**
-	+		
+	+		
+	-	-	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаружена*** - Могут присутствовать дополнительные аналиты, которые не были обнаружены.
-	+		
+	+		
-	-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, не обнаружена**
-	-	-	**Недействительный**** - Результаты указывают на неадекватный сбор образца, процесс (т.е. отсутствие добавления экзогенного ВК) или наличие ингибиторов. - Повторите тест с выделением нуклеиновой кислоты, используя другую аликвоту исходного образца. - Если в реэкстрагированной нуклеиновой кислоте получен тот же результат, пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест с этапа экстракции (после добавления RV-EA IC). - Если в разбавленном образце получен тот же результат, пожалуйста, соберите образцы снова.

* Высокий уровень целевых нуклеиновых кислот может вызвать помехи при обнаружении и считывании данных внутреннего контроля. Недействительный сигнал ВК не означает, что положительные результаты для мишеней недействительны.

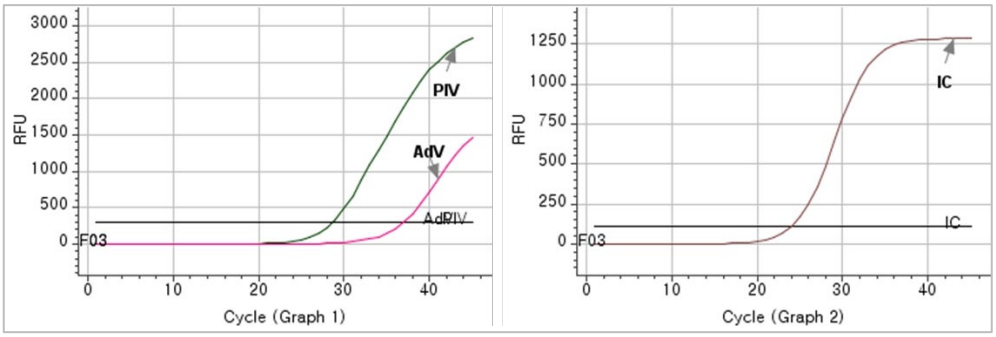
** Подробные инструкции см. в разделе ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ.

2. Применение к клиническим образцам

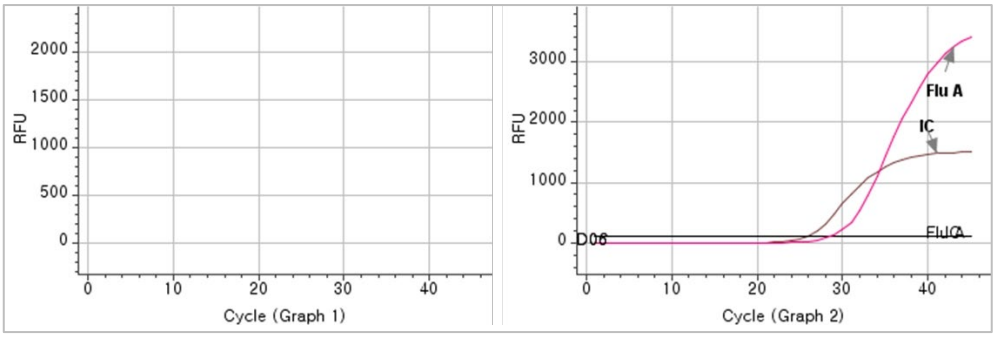
Образец 1



Образец 2



Образец 3



Образец	Результат работы Seegene Viewer (Ct)								
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670		Авто интерпретация
	MPV	RSV	PIV	Грипп B	AdV	Грипп A	HRV	IC	
1	Н/Д	26.23	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	20.17	25.89	PCB, BCP
2	Н/Д	Н/Д	28.72	Н/Д	37.02	Н/Д	Н/Д	24.03	PIV, AdV
3	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	28.64	Н/Д	25.87	Грипп A

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Allplex™ RV Essential Assay		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Нет сигнала	Флуорофоры для данных анализ не протоколу	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Неправильная настройка термоциклера реального времени	Пожалуйста, проверьте условия термоциклирования и повторите тест при правильных настройках.
	Неправильное хранение или истекший срок годности тест- набора	Проверьте условия хранения (см. стр. 11) и срок годности (см этикетку) набора для тестирования и при необходимости используйте новый набор.
	Нарушение процесса выделения нуклеиновых кислот	Отсутствие сигнала, включая ВК, может указывать на потерю нуклеиновой кислоты во время экстракции. Убедитесь, что вы используете рекомендуемый метод экстракции. Если это связано с ингибиторами, повторно экстрагируйте исходный образец или разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест с этапа экстракции (после добавления RV-EA IC).
Нет сигнала внутреннего контроля	Высокая нагрузка на нуклеиновую кислоту патогена	Если сигнал патогена-мишени наблюдается, но не ВК, то ВК-амплификация может быть подавлена высоким титром патогена-мишени. Чтобы подтвердить сигнал ВК, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
Предполагаемые ложноположительные или целевые сигналы, наблюдаемые в отрицательном контроле	Загрязнение	Обеззараживайте все поверхности и инструменты гипохлоритом натрия и этанолом. На протяжении всей процедуры используйте только фильтрующие насадки и меняйте их между пробирками. Повторите всю процедуру с выделением нуклеиновых кислот с помощью нового набора реагентов.

AllplexTM RV Essential Assay		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Предполагаемый ложноотрицательный сигнал или отсутствие сигнала в положительном контроле	Ошибка при сборе образцов	Пожалуйста, проверьте метод взятия образца и повторно возьмите образец.
	Неправильное хранение образца	Пожалуйста, повторно соберите образец и повторите всю процедуру. Убедитесь, что образец хранится в соответствии с рекомендациями.
	Ошибка при выделении нуклеиновых кислот	Пожалуйста, проверьте процедуру выделения нуклеиновой кислоты, а также концентрацию нуклеиновой кислоты и повторно выделите нуклеиновую кислоту.
	Ошибка при добавлении нуклеиновой кислоты в соответствующие пробирки для ПЦР	Проверьте номера образцов в пробирках с нуклеиновой кислотой и убедитесь, что добавили нуклеиновую кислоту в правильные пробирки для ПЦР, а при необходимости тщательно повторите тест.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Неправильная смесь для ПЦР	Убедитесь, что все компоненты добавлены в смесь для RT-ПЦР (чувствительность снижается при использовании предварительно составленного премикса). Перед использованием все реагенты должны быть гомогенизированы.
Скачки на всех циклах кривой амплификации	Пузырек в пробирке для ПЦР	Центрифугируйте пробирку для ПЦР перед запуском.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

1. Специфичность

Allplex™ RV Essential Assay был протестирован на перекрестную реактивность с 93 стандартными материалами и организмами, как указано ниже. Специфические мишени, предназначенные для обнаружения, были идентифицированы Allplex™ RV Essential Assay.

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
1	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-95	Обнаружен грипп A
2	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-97	Обнаружен грипп A
3	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-98	Обнаружен грипп A
4	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-219	Обнаружен грипп A
5	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-825	Обнаружен грипп A
6	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-897	Обнаружен грипп A
7	Influenza A virus (H1N1)	ATCC	VR-1683	Обнаружен грипп A
8	Influenza A virus (H1N1-pdm09)	ATCC	VR-1736	Обнаружен грипп A
9	Influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-544	Обнаружен грипп A
10	Influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-547	Обнаружен грипп A
11	Influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-810	Обнаружен грипп A
12	Influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-822	Обнаружен грипп A
13	Influenza A virus (H3N2)	ATCC	VR-1680	Обнаружен грипп A
14	Influenza B virus	ATCC	VR-101	Обнаружен грипп B
15	Influenza B virus	ATCC	VR-102	Обнаружен грипп B
16	Influenza B virus	ATCC	VR-103	Обнаружен грипп B
17	Influenza B virus	ATCC	VR-295	Обнаружен грипп B
18	Influenza B virus	ATCC	VR-296	Обнаружен грипп B
19	Influenza B virus	ATCC	VR-523	Обнаружен грипп B
20	Influenza B virus	ATCC	VR-786	Обнаружен грипп B
21	Influenza B virus	ATCC	VR-823	Обнаружен грипп B
22	Influenza B virus	ATCC	VR-1804	Обнаружен грипп B
23	Human respiratory syncytial virus A	ATCC	VR-26	Обнаружен RSV
24	Human respiratory syncytial virus B	ATCC	VR-955	Обнаружен RSV
25	Human metapneumovirus	BEI	NR-22232	Обнаружен MPV

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
26	Human adenovirus 1	ATCC	VR-1	Обнаружен AdV
27	Human adenovirus 2	KBPV	VR-58	Обнаружен AdV
28	Human adenovirus 3	ATCC	VR-3	Обнаружен AdV
29	Human adenovirus 4	ATCC	VR-1572	Обнаружен AdV
30	Human adenovirus 5	KBPV	VR-61	Обнаружен AdV
31	Human adenovirus 7	ATCC	VR-7	Обнаружен AdV
32	Human adenovirus 8	ATCC	VR-1368	Обнаружен AdV
33	Human adenovirus 14	ATCC	VR-15	Обнаружен AdV
34	Human adenovirus 18	ATCC	VR-1095	Обнаружен AdV
35	Human adenovirus 23	ATCC	VR-1101	Обнаружен AdV
36	Human adenovirus 31	ATCC	VR-1109	Обнаружен AdV
37	Human adenovirus 40	ATCC	VR-931	Обнаружен AdV
38	Human adenovirus 41	ATCC	VR-930	Обнаружен AdV
39	Human rhinovirus 8	ATCC	VR-488	Обнаружена BCP
40	Human rhinovirus 14	ATCC	VR-284	Обнаружена BCP
41	Human rhinovirus 16	ATCC	VR-283	Обнаружена BCP
42	Human rhinovirus 42	ATCC	VR-338	Обнаружена BCP
43	Human parainfluenza virus 1	ATCC	VR-1380	Обнаружен PIV
44	Human parainfluenza virus 2	ATCC	VR-92	Обнаружен PIV
45	Human parainfluenza virus 3	ATCC	VR-93	Обнаружен PIV
46	Human parainfluenza virus 4A	ATCC	VR-1378	Обнаружен PIV
47	Human parainfluenza virus 4B	ATCC	VR-1377	Обнаружен PIV
48	Human coronavirus 229E	ATCC	VR-740	Не обнаружено
49	Human coronavirus OC43	ATCC	VR-1558	Не обнаружено
50	Measles virus	KBPV	VR-35	Не обнаружено
51	Mumps virus	KBPV	VR-51	Не обнаружено
52	Human herpesvirus 1	ATCC	VR-260	Не обнаружено
53	Human herpesvirus 4	ATCC	VR-1492	Не обнаружено
54	Human herpesvirus 5	ATCC	VR-807	Не обнаружено
55	Human coxsackievirus A9	KBPV	VR-11	Не обнаружено
56	Human coxsackievirus A24	ATCC	VR-583	Не обнаружено
57	Human coxsackievirus B1	KBPV	VR-13	Не обнаружено
58	Human coxsackievirus B2	KBPV	VR-14	Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
59	Human coxsackievirus B3	KBPV	VR-15	Не обнаружено
60	Human coxsackievirus B4*	KBPV	VR-16	Обнаружена BCP
61	Human coxsackievirus B5	KBPV	VR-17	Не обнаружено
62	Human coxsackievirus B6	KBPV	VR-18	Не обнаружено
63	Human echovirus 6	KBPV	VR-19	Не обнаружено
64	Human echovirus 7	KBPV	VR-20	Не обнаружено
65	Human echovirus 9	ATCC	VR-39	Не обнаружено
66	Human echovirus 11	KBPV	VR-22	Не обнаружено
67	Human echovirus 25	KBPV	VR-24	Не обнаружено
68	Human echovirus 30	KBPV	VR-25	Не обнаружено
69	Human enterovirus 70	ATCC	VR-836	Не обнаружено
70	Human enterovirus 71	ATCC	VR-784	Не обнаружено
71	*Bordetella bronchiseptica*	ATCC	BAA-588	Не обнаружено
72	*Bordetella holmesii*	ATCC	51541	Не обнаружено
73	*Bordetella parapertussis*	ATCC	15311	Не обнаружено
74	*Candida albicans*	KCCM	50651	Не обнаружено
75	*Chlamydia trachomatis* type A	ATCC	VR-571B	Не обнаружено
76	*Corynebacterium diphtheriae*	ATCC	14779	Не обнаружено
77	*Escherichia coli*	KCTC	2443	Не обнаружено
78	*Haemophilus influenzae*	KCCM	42099	Не обнаружено
79	*Lactobacillus acidophilus*	KCTC	3140	Не обнаружено
80	*Legionella pneumophila*	KCTC	12009	Не обнаружено
81	*Moraxella catarrhalis*	ATCC	BAA-1425	Не обнаружено
82	*Mycoplasma genitalium*	ATCC	49895	Не обнаружено
83	*Mycoplasma hominis*	ATCC	23114	Не обнаружено
84	*Mycoplasma pneumoniae*	ATCC	15531	Не обнаружено
85	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	700825	Не обнаружено
86	*Neisseria meningitidis*	KCCM	41562	Не обнаружено
87	*Pseudomonas aeruginosa*	KCTC	2004	Не обнаружено
88	*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*	KCCM	40881	Не обнаружено
89	*Staphylococcus epidermidis*	KCCM	35494	Не обнаружено
90	*Streptococcus pneumoniae*	KCCM	40410	Не обнаружено
91	*Streptococcus pyogenes*	KCCM	11873	Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
92	*Streptococcus salivarius*	KCCM	11926	Не обнаружено
93	*Ureaplasma urealyticum*	ATCC	27618	Не обнаружено

† Тесты на специфичность повторяли 3 раза.

※ ATCC: Американская коллекция типовых культур

BEI : Ресурсы BEI; репозиторий исследовательских ресурсов по биозащите и новым инфекциям

KCTC: Корейская коллекция типовых культур

KBPV: Корейский банк патогенных вирусов

KCCM:Корейский центр культуры микроорганизмов

* Олигомеры для выявления риновируса в Allplex™ RV Essential Assay перекрестно реагируют с коксакивирусом человека B4.

2. Чувствительность

Чувствительность определяется как наименьшая концентрация микроорганизмов, которая может быть стабильно обнаружена (≥ 95% положительных результатов среди всех протестированных образцов).
Чувствительность Allplex™ RV Essential Assay определялась с помощью стандартных организмов, помещенных в универсальную транспортную среду (от 105 до 100 копий/реакция). Предел обнаружения для Allplex™ RV Essential Assay составил 100 ~ 500 копий/реакцию. Предел обнаружения вируса парагриппа человека составляет 500 копий/реакция, а других - 100 копий/реакция.

3. Воспроизводимость

Воспроизводимость Allplex™ RV Essential Assay оценивалась между участками, партиями продукта, экспериментаторами и временными точками с использованием 3 образцов концентрации каждого аналита. Значения CV соответствовали критериям менее 10 %.
Результаты соответствовали установленным выше критериям, что подтверждает воспроизводимость характеристик AllplexT™ RV Essential Assay.

4. Мешающие вещества

Этот тест проводился с использованием мешающих веществ, состоящих из 8 веществ, чтобы подтвердить эффективность Allplex™ RV Essential Assay в присутствии потенциальных мешающих веществ. Добавление веществ не повлияло на результат: неспецифическое обнаружение или ингибирование амплификации мишени. Исходя из полученных результатов, 8 мешающих веществ не оказывали влияния на результаты Allplex™ RV Essential Assay.

№.	Мешивающиеся вещества	Концентрация
1	Оксиметазолин (Африн назальный спрей)	15% (v/v)
2	Будесонид (назальные кортикостероиды)	1,26 мг/мл
3	Флутиказона пропионат (назальные кортикостероиды)	0,5 мг/мл
4	Бензокаин	1,7 мг/мл
5	Ментол	1,7 мг/мл
6	Муцин (бычья подчелюстная железа, тип I-S)	60 мкг/мл
7	Занамивир (противовирусный препарат от гриппа)	3,3 мг/мл
8	Мупироцин (антибиотик, назальная мазь)	6,6 мг/мл

5. Клиническое исследование

В общей сложности 180 клинических образцов были протестированы с помощью Allplex™ RV Essential Assay и референсного анализа.

Уровень соответствия всех целей должен превышать 95%. Данный сравнительный тест показал 100% соответствие в клинических образцах между Allplex™ RV Essential Assay и референсным анализом. Таким образом, подтверждается, что качество Allplex™ RV Essential Assay соответствует действительности.

Аналит	Чувствительность (по сравнению с эталонным анализом)		
	TP/ (TP+FN)	%[a)]	95% CI[c)]
Метапневмовирус человека (MPV)	22/22	100	84.56~100.0
Респираторно-синцитиальный вирус человека (RSV)	28/28	100	87.66~100.0
Вирус парагриппа человека (PIV)	57/57	100	93.73~100.0
Вирус гриппа B (Flu B)	13/13	100	75.29~100.0
Аденовирус человека (AdV)	21/21	100	83.89~100.0

Аналит	Чувствительность (по сравнению с эталонным анализом)		
	TP/ (TP+FN)	%[a)]	95% CI[c)]
Вирус гриппа A (грипп A)	16/16	100	79.41~100.0
Риновирус человека (HRV)	27/27	100	87.23~100.0

Аналит	Специфичность (по сравнению с эталонным анализом)		
	TN/ (TN+FP)	%[b)]	95% CI[c)]
Метапневмовирус человека (MPV)	158/158	100	97.69~90.90
Респираторно-синцитиальный вирус человека (RSV)	152/152	100	97.60~100.0
Вирус парагриппа человека (PIV)	123/123	100	97.05~100.0
Вирус гриппа B (Flu B)	167/167	100	97.82~100.0
Аденовирус человека (AdV)	159/159	100	97.71~100.0
Вирус гриппа A (грипп A)	164/164	100	97.78~100.0
Риновирус человека (HRV)	153/153	100	97.62~100.0

a) Чувствительность: 100 X TP/(TP+FN)

b) Специфичность: 100 X TN/(FP+TN)

c) Были рассчитаны двусторонние 95% доверительные интервалы.

ССЫЛКИ

1. A. J. Easton, J. B. Domachowske, and H. F. Rosenberg. [Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis.] Clinical Microbiology Reviews. (2004) 17: 390-412
2. C. E. Corless, M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, E. B. Kaczmarski, and A. J. Fox. [Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR.] Journal of Clinical Microbiology. (2000) 38: 1747-1752
3. D. H. Lee. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 5-10
4. H. K. Chang, J. H. Park, M. S. Song, T. K. Oh, S. Y. Kim, C. J. Kim, H. Kim, M. H. Sung, H. S. Han, Y. S.

   Hahn, and Y. K. Choi. [Development of multiplex rt-PCR assays for rapid detection and subtyping of influenza type A viruses from clinical specimens.] Journal of Microbiology and Biotechnology. (2008) 18(6): 1164-9
5. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 1-4
6. J. Y. Chun, K. J. Kim, I. T. Hwang, Y. J. Kim, D. H. Lee, I. K. Lee, and J. K. Kim. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Research. (2007) 35: e40
7. K. Suwannakarn, S. Payungporn, T. Chieochansin, R. Samransamruajkit, A. Amonsin, T. Songserm, A. Chaisingh, P. Chamnanpood, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, and Y. Poovorawan. [Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays.] Journal of Virological Methods. (2008) 152(1-2): 25-31
8. M. Hindiyeh, V. Levy, R. Azar, N. Varsano, L. Regev, Y. Shalev, Z. Grossman, and E. Mendelson. [Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001-2002 influenza season in Israel.] Journal of Clinical Microbiology. (2005) 43: 589- 595
9. M. T. Coiras, J. C. Aguilar, M. L. Garcia, I. Casas, and P. Perez-Brena. [Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays.] Journal of Medical Virology. (2004) 72: 484-495
10. M. T. Coiras, P. Perez-Brena, M. L. Garcia, and I. Casas. [Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assays.] Journal of Medical Virology. (2003) 69: 132-144
11. M. W. Syrmis, D. M. Whiley, M. Thomas, I. M. Mackay, J. Williamson, D. J. Siebert, M. D. Nissen, and T. P. Sloots. [A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples.] Journal of Diagnostics. (2004) 6: 125-131

12. P. Boonsuk, S. Payungporn, T. Chieochansin, R. Samransamruajkit, A. Amonsin, T. Songserm, A. Chaisingh,P. Chamnanpood, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, and Y. Poovorawan. [Detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, and H5) by multiplex polymerase chain reaction.] The Tohoku Journal of Experimental Medicine. (2008) 215(3): 247-55
13. S. Bellau-Pujol, A. Vabret, L. Legrand, J. Dina, S. Gouarin, J. Petitjean-Lecherbonnier, B. Pozzetto, C. Ginevra, and F. Freymuth. [Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses.] Journal of Virological Methods. (2005) 126: 53-63
14. Y. J. Lee, D. Y. Kim, K. H. Lee, and J. Y. Chun. [Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR.] Scientific Reports. (2014) 4: 1-6
15. Y. Jinno, K. Yoshiura, and N. Niikawa. [Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR.] Nucleic Acids Research. (1990) 18: 6739
16. Medimmune progresses development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type-3 vaccines. *Pharmaceutical News*, Oct 13, 2004
17. Respiratory syncytial virus. *Microbiology and Bacteriology*, Aug 6, 2000

6 августа 2000 г.

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ

Ключ к символам, используемым в руководстве и на этикетках

Символ	Пояснение
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии
REF	Номер по каталогу
	Срок годности
	Верхний предел температуры
PRIMER	Олигонуклеотидная смесь для амплификации и детекции
ENZYME	Ферментная смесь
BUFFER	Буфер
WATER	Вода, не содержащая РНКаз
CONTROL +	Положительный контроль (ПК)
CONTROL IC	Внутренний контроль (ВК)
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Производитель
	Дата изготовления
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Внимание
	Содержит достаточное количество <n> тестов
UDI	Уникальный идентификатор устройства
rxns	Штрих-код реакции для автоматизированной системы экстракции

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №.	Продукт	Размер
Серия Allplex™		
RV9750Y	Allplex™ RV Essential Assay	50 реакций
RV9750X	**Allplex™ RV Essential Assay**	**100 реакций***

* Только для использования с Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS и Seegene STARlet

Дополнительный продукт

SG1701	Ribo_spin vRD (Набор для выделения вирусной РНК/ДНК)	50 заготовок

Автоматизированные системы экстракции

65415-02	Микролаборатория NIMBUS IVD	EA
173000-075	Микролаборатория STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
744300.4.UC384	Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	384T / 1 коробка
EX00013C	Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C	384T / 1 коробка
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T / 1 коробка
EX00017P	STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00017T	STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	96T / 1 коробка
M9600	Maelstrom™ 9600	EA
W665S66	Набор для выделения нуклеиновых кислот TANBead ® OptiPure Viral Auto Tube	72 T / 1 коробка
W665A10	Набор для выделения нуклеиновых кислот TANBead ® OptiPure Viral Bulk Plate	960 T / 1crt

Только для профессионального использования

AllplexTM

Respiratory Panel 1A

(Flu / RSV / Flu A subtyping)

(Кат. № RP9702X, RP10231Z)

Мультиплексная одноступенчатая система RT-PCR в режиме реального времени для выявления Influenza A virus, Influenza B virus, Human respiratory syncytial virus A, Human respiratory syncytial virus B, and subtyping of Influenza A virus (Human Influenza A virus subtype H1, H3, и H1pdm09) из назофарингеального аспирата, назофарингеального мазка и бронхоальвеолярного лаважа.

Для использования с

1. **CFX96TM Система обнаружения ПЦР в реальном времени (CFX ManagerTM Software-IVD v1.6)**
2. **Система CFX96TM Dx (программное обеспечение CFX ManagerTM Dx v3.1)**

CE IVD **Только для диагностики *in vitro***

REF **RP9702X** Σ **100** REF **RP10231Z** Σ **25**

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548

EC REP **Медицинские технологии Promedt Consulting GmbH Ernst-Heckel-Straße 7, 66386 St.Ingbert, Германия**

Недоступно в США.

УВЕДОМЛЕНИЯ 3

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 5

ОБЗОР ПРОЦЕССОВ И ПРОЦЕДУР 5

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ 6

РЕАГЕНТЫ 9

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА 11

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (не предоставляются) 11

ПРОТОКОЛ 12

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ 21

РЕЗУЛЬТАТЫ 43

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ 46

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 54

СПИСОК СИМВОЛОВ 56

УВЕДОМЛЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Надежность результатов зависит от правильности процедуры сбора, хранения, транспортировки и обработки образцов.
- **Можно использовать одну и ту же выделенную нуклеиновую кислоту для Allplex™ Respiratory Panel 1A, 1, 2 и 3.**
- **Если тот же образец также должен быть протестирован с помощью Allplex™ Respiratory Panel 4 или Allplex™ PneumoBacter Assay, добавьте оба RP-V IC и RP-B IC или PB-IC при выделении нуклеиновой кислоты (см. стр. 14).**
- **Если этот продукт используется с Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH, он обеспечивает максимум 5 отдельных циклов.**
- **Этот тест был подтвержден для следующих типов образцов: назофарингеальный аспират, назофарингеальный мазок и бронхоальвеолярный лаваж.** Данный тест не был подтвержден для других типов образцов.
- **Храните образцы нуклеиновых кислот при ≤ -20°C до использования, а во время работы - на льду, чтобы защитить от деградации.**
- Чувствительность анализа может снизиться, если образцы неоднократно замораживались/размораживались или хранились в течение длительного периода времени.
- Рабочий процесс в лаборатории должен быть однонаправленным.
- Надевайте одноразовые перчатки и меняйте их перед входом в разные зоны. В случае загрязнения немедленно смените перчатки или обработайте их реагентом для обеззараживания ДНК.
- Принадлежности и оборудование должны быть закреплены за рабочими зонами и не должны перемещаться из одной зоны в другую.
- Не дозируйте через рот.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих зонах лаборатории. При работе с образцами и реактивами надевайте одноразовые перчатки, лабораторные халаты и средства защиты глаз. Мойте руки, тщательно обрабатывайте образцы и реактивы для испытаний.
- Избегайте загрязнения реагентов при извлечении аликвот из пробирок с реагентами. Рекомендуется использовать стерилизованные одноразовые наконечники для пипеток, устойчивые к аэрозолям.
- Не объединяйте реагенты из разных партий или из разных пробирок одной партии.
- Не используйте продукт после истечения годности.
- Не используйте все одноразовые предметы повторно.
- Используйте пробирки с завинчивающимися крышками и предотвратите возможное разбрызгивание или перекрестное загрязнение образцов во время подготовки.

- Пожалуйста, будьте осторожны, чтобы не загрязнить реагенты с выделенными нуклеиновыми кислотами, продуктами ПЦР и положительным контролем. Для предотвращения загрязнения реагентов рекомендуется использовать фильтр-пипетки.
- Используйте отдельные рабочие зоны для каждого эксперимента.
- Во избежание загрязнения рабочих зон амплифицированными продуктами открывайте пробирки или полоски для ПЦР-реакции только в специально отведенных рабочих зонах после окончания амплификации.
- Храните положительные материалы отдельно от реагентов набора.
- При работе с образцами необходимо соблюдать правила лабораторной безопасности (см. раздел "Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях" и документы CLSI). Кроме того, тщательно очистить и продезинфицировать все рабочие поверхности с помощью 0,5% гипохлорита натрия (в деионизированной или дистиллированной воде). Компоненты продукта (остатки продукта, упаковка) могут рассматриваться как лабораторные отходы. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с действующими федеральными, государственными и местными нормами.
- Срок годности - 12 месяцев с даты изготовления при температуре≤ -20°C. Пожалуйста, обратитесь к этикетке для точного срока годности.
- Seegene NIMBUS и Seegene STARlet - это то же самое оборудование, что и Microlab NIMBUS IVD и Microlab STARlet IVD, соответственно, хотя производитель отличается. Поскольку аппаратные изменения в приборах отсутствуют, результаты тестирования одинаковы.
- Торговая марка "CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD" заменена на "CFX96™ Dx System". Поскольку аппаратные изменения в системах отсутствуют, ожидается, что обе системы дадут одинаковые результаты.
- "CFX Manager™ Dx Software v3.1" является обновленной версией "CFX Manager™ Software- IVD v1.6". Обновленное программное обеспечение содержит улучшения в меню "Run". Эти улучшения не влияют на результаты анализа данных, поэтому результаты будут такими же.
- Данный набор предназначен для дифференциальной диагностики инфекций, вызванных целевыми патогенами: вирусом гриппа A (Flu A), вирусом гриппа B (Flu B), респираторно-синцитиальным вирусом человека A (RSV A), респираторно-синцитиальным вирусом человека B (RSV B), вирусом гриппа A подтипа H1 (Flu A- H1), вирусом гриппа A подтипа H3 (Flu A-H3) и вирусом гриппа A подтипа H1pdm09 (Flu A-H1pdm09).
- **AIOS** сочетает в себе Seegene STARlet, продаваемый компанией Seegene, с оборудованием для ПЦР в реальном времени (CFX96 Dx, производитель: Bio-Rad) и герметизатором пластин (производитель: SAMICK THK) для создания автоматизированной структуры связи между выделением нуклеиновых кислот и ПЦР.

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Allplex™ Respiratory Panel 1A - качественный тест *in vitro* для однократного или многократного выявления вируса гриппа A (Flu A), вируса гриппа B (Flu B), респираторно-синцитиального вируса человека A (RSV A), респираторно-синцитиального вируса человека B (RSV B), вирус гриппа A человека подтипа H1 (Flu A- H1), вирус гриппа A человека подтипа H3 (Flu A-H3) и вирус гриппа A человека подтипа H1pdm09 (Flu A- H1pdm09) из носоглоточного аспирата, носоглоточного мазка и бронхоальвеолярного лаважа.

Грипп А: Праймеры разработаны на консервативных участках матричного гена (M1) для выявления различных подтипов вируса гриппа A. По результатам анализа *in silico*, они имеют более широкий охват в отношении птичьего гриппа по сравнению с **Allplex™** Respiratory Panel 1.

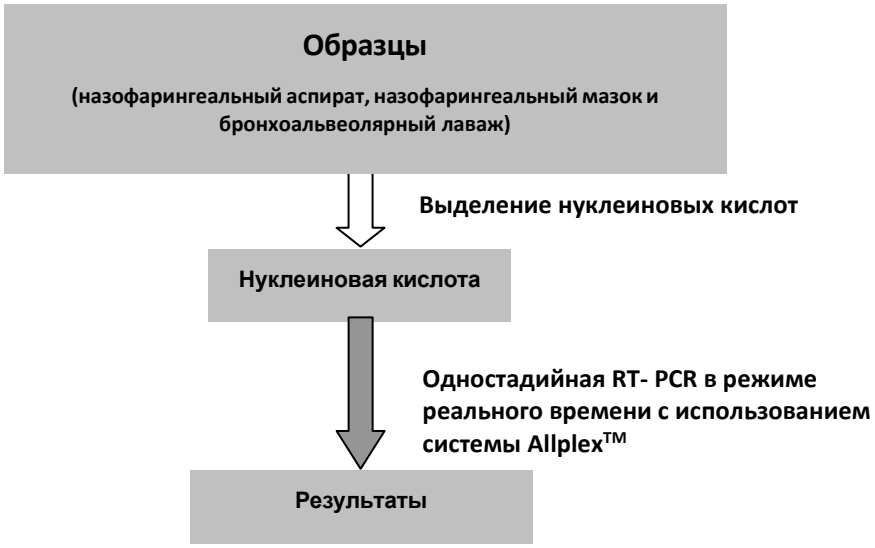
Подтипы гриппа А: Праймеры разработаны для консервативных областей в гене гемагглютинина (HA). Они выявляют почти все подтипы (H1, H3 и H1pdm09) вируса гриппа A человека.

ОБЗОР ПРОЦЕССОВ И ПРОЦЕДУР

1. Принципы

Allplex™ Respiratory Panel 1A использует запатентованную Seegene технологию MuDT™, которая позволяет получать значения нескольких Ct (пороговых циклов) в одном флуоресцентном канале без анализа кривой расплава на приборах для ПЦР в реальном времени.
Allplex™ Respiratory Panel 1A - это мультиплексный одностадийный анализ RT-PCR в режиме реального времени, который позволяет одновременно амплифицировать и обнаруживать целевые нуклеиновые кислоты Flu A, Flu B, RSV A, RSV B, Flu A-H1, Flu A-H3, Flu A-H1pdm09 и внутренний контроль (IC).
В ПЦР эффективность амплификации часто снижается из-за ингибиторов, присутствующих в клинических образцах. Поэтому IC включается в состав продукта в качестве экзогенного контроля всего процесса для мониторинга выделения нуклеиновых кислот и проверки возможного ингибирования RT-PCR. IC коамплифицируется с целевыми нуклеиновыми кислотами в клиническом образце.

2. Обзор процедур



СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

1. Респираторная вирусная инфекция

Респираторные инфекции подразделяются на две основные категории: инфекции верхних дыхательных путей и инфекции нижних дыхательных путей. Инфекция верхних дыхательных путей вызывается патогенными микроорганизмами, проникающими через нос, глотку, ушные раковины, околоносовые пазухи и т. д. Любая инфекция, обнаруженная в дыхательных путях, расположенных ниже гортани, классифицируется как инфекция нижних дыхательных путей. Среди инфекций нижних дыхательных путей вирусные инфекции можно разделить на четыре основные группы: пневмония, бронхиолит, круп и трахеобронхит. Для каждого вируса существуют возрастные различия у заразившихся. Кроме того, симптомы могут отличаться у пациентов, даже если тип вируса один и тот же. Хотя каждый вирус может вызывать симптомы всех четырех типов инфекций нижних дыхательных путей, некоторые симптомы проявляются чаще при определенной инфекции, чем другие. Например, RSV может проявляться у людей всех возрастов, от младенцев до взрослых, но взрослых он вызывает инфекцию верхних дыхательных путей, а у младенцев - бронхиолит. Обычно RSV вызывает пневмонию у младенцев, и большинство пациентов с диагнозом «инфекция нижних дыхательных путей» - это дети младше двух лет, в основном младше шести месяцев.

Хотя взрослые люди имеют хороший уровень иммунитета благодаря повторным заражениям респираторными вирусами в детстве, их иммунная система ограничена, несовершенна и уязвима для респираторных вирусов: чаще всего это инфекции верхних дыхательных путей. Однако у пациентов с ослабленным иммунитетом могут развиваться инфекции нижних дыхательных путей, такие как пневмония. В случае с гриппом, поскольку он представляет собой вирусную антигенную вариацию, пациенты с основными заболеваниями и пожилые люди часто заражаются и заболевают пневмонией. Кроме того, он может ухудшить течение основных заболеваний, что приведет к смерти пациента. Последние исследования утверждают, что RSV вызывает те же симптомы, что и грипп.

2. Вирус гриппа

Вирус гриппа (семейство *Orthomyxoviridae*) представляет собой однонитевой РНК-геном, состоящий из 8 отдельных сегментов рибонуклеопротеина. Такая сегментация генома редко встречается среди вирусов и может способствовать быстрому развитию новых штаммов гриппа за счет обмена генными сегментами между различными вирусами, инфицирующими одну и ту же клетку. Существует три типа вирусов гриппа: A, B и C. Вирусы A и B наиболее распространены среди трех типов. Особенно известен вирус типа A, которым заражаются не только люди, но и птицы, а также различные виды млекопитающих. Среди вирусов гриппа, поражающих людей, H1N1 и H3N2 становятся проблемой для заражения детей и пожилых людей. Типы B и C поражают только людей. Начальными симптомами гриппа являются выделения из носа, заложенность носа, боль в горле, кашель, лихорадка, назофарингит или схожие симптомы острого ринита, озноб и боль в мышцах, которые сильнее, чем при обычной простуде. Характерно, что симптом гриппа сопровождается высокой температурой и развитием осложнений, вызванных бактериальными инфекциями.

3. Респираторный синцитиальный вирус (RSV)

Респираторно-синцитиальный вирус (семейство *Paramyxoviridae*) - это оболочечный вирус с геномом из однонитевой РНК. RSV имеет высокую частоту встречаемости среди других респираторных заболеваний. Он классифицируется как клинически значимый, поскольку способен вызывать смерть у детей с врожденным пороком сердца, недоношенных младенцев и детей после операций на открытом сердце. Бронхиолит - наиболее распространенный тип RSV-инфекции у младенцев, но после года он проявляется не так часто. С другой стороны, пневмония является проблемой для всех младенцев. RSV ответственен за развитие 45~75% бронхиолитов, 15~25% пневмоний у младенцев и 6~8% крупов. Изначально RSV был известен как патоген, развивающий заболевания у младенцев, но последние исследования показывают, что RSV, встречающийся у взрослых, может приводить к таким же тяжелым последствиям, как грипп, например, переноситься и приводить к смерти. Кроме того, если пациенты с ослабленной иммунной системой (трансплантация костного мозга или твердых органов) заражаются RSV, вызывающим пневмонию, вероятность летального исхода может возрасти более чем на 50%.

4. Сезонный грипп

Сезонный грипп - это острая вирусная инфекция, вызываемая вирусом гриппа. Вирусы гриппа типа А подразделяются на подтипы в соответствии с видами и комбинациями вирусных поверхностных белков. Среди множества подтипов вируса гриппа А в последнее время среди людей циркулируют подтипы H1N1 и H3N2. Вирусы гриппа циркулируют во всех частях света. Случаи заболевания вирусом гриппа типа С встречаются гораздо реже, чем типа А и В. Поэтому в состав сезонных противогриппозных вакцин включены только вирусы гриппа А и В. Эпидемии гриппа происходят ежегодно осенью и зимой в регионах с умеренным климатом. Заболевания приводят к госпитализации и смертности, в основном среди групп повышенного риска (младенцы, пожилые люди или хронические больные). Во всем мире ежегодные эпидемии приводят к трем-пяти миллионам случаев тяжелых заболеваний и 250-500 тысячам смертей. Большинство смертей, связанных с гриппом, в промышленно развитых странах происходит среди людей в возрасте 65 лет и старше.

5. Вирус гриппа А свиного происхождения подтипа H1N1 (H1pdm09)

H1N1, подтип вируса гриппа А, является наиболее распространенной причиной гриппа (гриппа) у людей. Некоторые штаммы H1N1 являются эндемичными и вызывают небольшую часть всех гриппоподобных заболеваний и значительную часть всех случаев сезонного гриппа. Например, в 2006 году штаммы H1N1 вызвали примерно половину всех случаев заражения гриппом среди людей. Другие штаммы H1N1 эндемичны среди свиней (свиной грипп) и птиц (птичий грипп). В июне 2009 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила, что пандемия гриппа 2009 года вызвана новым штаммом H1N1 свиного происхождения, и повысила уровень тревоги до фазы 6; это была первая глобальная пандемия со времен гонконгского гриппа 1968 года. В средствах массовой информации этот штамм обычно называют "свиным гриппом". Выделенный от пациентов в США штамм H1pdm09 свиного происхождения, как выяснилось, состоит из генетических элементов четырех различных вирусов гриппа - североамериканского мексиканского гриппа, североамериканского птичьего гриппа, человеческого гриппа и вируса свиного гриппа, обычно встречающегося в Азии и Европе: "необычная смесь генетических последовательностей". Этот новый штамм, по-видимому, является результатом реассортации вирусов гриппа человека и свиней, во всех четырех различных штаммах подтипа H1N1.

РЕАГЕНТЫ

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 100 реакций.

Информация для заказа (REF RP9702X)

Allplex™ Respiratory Panel 1A			
Символ	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	5X RP1A MOM	500 мкл	Смесь олиго-компонентов MuDT (MOM): - Реагент для амплификации и обнаружения
ENZYME	В режиме реального времени Одношаговый фермент	200 мкл	Ферментная смесь для одностадийной RT-PCR
BUFFER	5X Буфер для одношагового режима реального времени	500 мкл	Буфер для одностадийной RT-PCR - Буфер, содержащий dNTPs
CONTROL +	RP1A PC	80 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогена и IC
CONTROL IC	RP-V IC	1,000 мкл	Экзогенный внутренний контроль (IC) для **Allplex**™ Respiratory Panel 1A, 1, 2 и 3
WATER	Вода, не содержащая РНК	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для удобной интерпретации результатов
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 25 реакций.

Информация для заказа (REF RP10231Z)

Allplex™ Respiratory Panel 1A			
Символ	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	5X RP1A MOM	125 мкл	Смесь олиго-компонентов MuDT (MOM): - Реагент для амплификации и обнаружения
ENZYME	В режиме реального времени Одношаговый фермент	50 мкл	Ферментная смесь для одностадийной RT-PCR
BUFFER	5X Буфер для одношагового режима реального времени	125 мкл	Буфер для одностадийной RT-PCR - Буфер, содержащий dNTPs
CONTROL +	RP1A PC	80 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогена и IC
CONTROL IC	RP-V IC	250 мкл	Экзогенный внутренний контроль (IC) для AllplexTM Respiratory Panel 1A, 1, 2, и 3
WATER	Вода, не содержащая РНК	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для удобной интерпретации результатов
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА

Все компоненты Allplex™ Respiratory Panel 1A должны храниться при температуре ≤ -20°C. Все компоненты стабильны при рекомендуемых условиях хранения до истечения срока годности, указанного на этикетке. Данный продукт можно использовать в течение 35 дней после первого вскрытия набора, и его эффективность не меняется в течение 5 циклов замораживания и размораживания. Если реагенты будут использоваться только периодически, их следует хранить в аликвотах.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ (не предоставляются)

- Одноразовые перчатки (латексные или нитриловые)
- Пипетки (регулируемые) и стерильные наконечники для пипеток
- Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл
- Набор для выделения нуклеиновых кислот (см. Выделение нуклеиновых кислот)
- Чистая скамейка
- Ледогенератор
- Настольная центрифуга
- Вихревой смеситель
- CFX96™ Система детекции ПЦР в реальном времени (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Низкопрофильные стрипы на 8 пробирок объемом 0,2 мл без крышек (цвет белый, кат. номер TLS0851, Bio-Rad)
- Оптические плоские полоски на 8 колпачков (кат. номер TCS0803, Bio-Rad)
- Hard Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые (кат. № HSP9655, Bio-Rad)
- Hard Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые, со штрих-кодом (кат. № HSP9955, Bio-Rad)
- AIOS (кат. № SG72100, Seegene)
- Прокалываемый колпачок (кат. № 922119, SPL) (только для использования в AIOS)
- Постоянная прозрачная термозапечатка (кат. № 1814035, Bio-Rad)*.
- Герметизатор для ПЦР-пластин PX1 (автоматический герметик, кат. № 181-4000, Bio-Rad)*.

* Убедитесь, что вы используете термозапайку и запайщик пластин, перечисленные выше, вместе.

ПРОТОКОЛ

1. Сбор, хранение и транспортировка образцов

Примечание: Все образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционный материал. Разрешается использовать только те образцы, которые собраны, хранятся и транспортируются в строгом соответствии со следующими правилами и инструкциями.
Примечание: Чтобы обеспечить высокое качество образцов, их следует транспортировать как можно быстрее и при указанных температурах.

A. Сбор образцов

Назофарингеальный аспират, Назофарингеальный мазок, Бронхоальвеолярный лаваж

- Образцы носоглоточного аспирата, носоглоточного мазка и бронхоальвеолярного лаважа регулярно исследуются на наличие распространенных респираторных патогенов.
- Получение образцов из дыхательных путей может быть затруднено у некоторых пациентов. В таких случаях можно просто и эффективно собрать носоглоточные мазки, используя новые нейлоновые флокированные тампоны (COPAN, Италия) и универсальную транспортную среду (UTM).

Производитель	Устройство для взятия образцов	Кат. №
COPAN	ESwab	482CE
COPAN	ESwab 2 мл с PnR - мазок P	4E151S**
COPAN	ПЕРНАЗАЛЬНЫЙ АППЛИКАТОР ENAT PM 2 МЛ	606CS01P*
COPAN	ENAT KIT PNR КОЛПАЧОК 2МЛ+ПРОГР.ГИБКИЙ ФЛОКСВАБ BP80	6U082S01**
COPAN	UTM с флокированными тампонами	360C / 305C
DIAGNOSTIC HYBRIDS	UTM с гибким флокированным тампоном Minitip	403C / 406C
COPAN	UTM 2 мл с PnR - P мазок	3U082N01**

* Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

** После использования для дальнейшего хранения укупорьте сменным колпачком (кат. № 2E003S500, COPAN).

Б. Хранение и транспортировка образцов

Образец	Хранение и транспортировка		Примечание
	Температ.	Продолжительность	
Назофарингеальный аспират	2~8°C	3 дня	-На характеристики может повлиять длительное хранение образцов. -Образцы также должны соответствовать местным и национальным инструкциям по транспортировке патогенного материала.
Мазок из носоглотки			
Бронхоальвеолярный лаваж			

*** Продолжительность:** Период времени от взятия образца до проведения окончательного теста (включает транспортировку и хранение образцов до проведения теста).

2. Выделение нуклеиновых кислот

A. Внутренний контроль

Примечание: ВК, входящий в состав набора, позволяет пользователю не только подтвердить процедуру выделения нуклеиновых кислот, но и выявить любое ингибирование RT-PCR.

- Перед выделением нуклеиновых кислот пробирку RP-V IC необходимо загрузить в оборудование для экстракции.
- При использовании данного продукта с **Allplex**™ Respiratory Panel 4 или **Allplex**™ PneumoBacter

  Пробирки RP-V IC и RP-B IC или PB-IC должны быть загружены в экстракционное оборудование перед выделением нуклеиновых кислот.

B. Автоматизированная система выделения нуклеиновых кислот

Примечание: Пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. В остальных случаях обратитесь к протоколу производителя.

B-1. Microlab NIMBUS IVD

Примечание: См. руководство по эксплуатации Microlab NIMBUS IVD.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C**	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag™ N/S Kit***	Seegene	EX00031C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

** Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

*** Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-2. Microlab STARlet IVD

Примечание: См. руководство по эксплуатации Microlab STARlet IVD.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C**	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag™ N/S Kit***	Seegene	EX00031C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

** Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

*** Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-3. Seegene NIMBUS

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene NIMBUS.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C*	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag™ N/S Kit**	Seegene	EX00031C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

** Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-4. Seegene STARlet

Опция: Автоматизированная структура связей (см. эксплуатации AIOS)

Автоматизированная структура связей	Производитель	Кат. №
AIOS	Seegene	SG72100*

***** Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.
Примечание: Замените колпачок положительного контроля (PC) на колпачок с возможностью прокалывания. После завершения операции замените колпачок положительного контроля (PC) оригинальным колпачком.
Примечание: Прокалываемый колпачок является одноразовым изделием и должен быть утилизирован после одного использования.
Примечание: Если этот продукт используется с AIOS, применяемым Seegene STARlet, он обеспечивает максимум 3 отдельных цикла.

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene STARlet.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C*	Seegene	EX00013C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag™ N/S	Seegene	EX00031C	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

** Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-5. Seegene STARlet 96MPH

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene STARlet 96MPH.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
Seegene STARlet 96MPH	Seegene	SG71101	-
Набор STARMag™ S96H*	Seegene	EX00032P EX00033P EX00034P EX00035P	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-6. MaelstromTM 9600

Примечание: Продолжайте процесс извлечения, используя **'STARMAGM96'.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
Maelstrom™ 9600	Тайвань Advanced Nanotech Inc.	M9600	-
Набор STARMag™ M96*	Seegene	EX00029P EX00030P	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

* Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-7. SEEPREP32

Примечание: Продолжайте процесс извлечения, используя **"Pro-Protocol A".**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	Seegene	EX00009P	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	Seegene	EX00009T	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)*	Seegene	EX00017P	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)*	Seegene	EX00017T	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

* Назофарингеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж не были подтверждены.

Примечание: Продолжайте процесс извлечения с помощью **'STARMag-SP32'.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
Набор STARMag™ SP32 (Plate Type)*	Seegene	EX00028P	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл
Набор STARMag™ SP32 (Tube Type)*	Seegene	EX00028T	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

* Бронхоальвеолярный лаваж не подтвержден.

B-8. NucliSENS® easyMAG®

Примечание: Выполните процесс извлечения, используя **"общий протокол"**.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
NucliSENS® easyMAG®	bioMérieux	200111	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

C. Наборы для выделения нуклеиновых кислот вручную

Примечание: Пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. Для других объемов см. протокол производителя.

Набор для извлечения	Производитель	Кат. №	Рекомендуемый объем
QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit*	QIAGEN	57704	Образец: 190 мкл Элюирование: 40 мкл
Набор для отжима вирусов QIAamp® DSP*	QIAGEN	61704	Образец: 190 мкл Элюирование: 40 мкл
Ribo_spin vRD* (Viral RNA/DNA Extraction Kit)	GeneAll	302-150 SG1701**	Образец: 290 мкл Элюирование: 40 мкл

** Для приобретения продукции Seegene Inc. используйте каталожные номера, указанные выше.

D. Сводка

Примечание: Пожалуйста, используйте автоматическую систему экстракции или ручные наборы в соответствии с образцом, указанным в следующей таблице.

Образец	Автоматизированная система отбора							
	Microlab NIMBUS IVD / STARlet IVD			Seegene NIMBUS / STARlet			Seegene STARlet 96MPH	Maelstrom ™ 9600
	Универсальный набор картриджей	Viral DNA/RNA 200 C Kit*	STARMag™ N/S Kit**	STARMag ™ M96 Kit**	Viral DNA/RNA 200 C Kit*	STARMag ™ N/S Kit**	STARMag™ S96H Kit**	STARMag ™ M96 Kit**
Назофарингеальный аспират	O	X	O	O	X	O	O	O
Мазок из носоглотки	O	O	O	O	O	O	O	O
Бронхоальвеолярный лаваж	O	X	X	O	X	X	X	X

Образец	Автоматизированная система отбора				Ручная система отбора		
	SEEPREP32			NucliSENS® easyMAG ®	QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit	QIAamp® DSP Virus Spin Kit	Ribo_ spin vRD
	STARMag 96 ProPrep	STARMag 96 ProPrep C*	STARMag™ SP32 Kit**				
Назофарингеальный аспират	O	X	O	O	O	O	O
Мазок из носоглотки	O	O	O	O	O	O	O
Бронхоальвеолярный лаваж	O	X	X	O	O	O	O

3. Подготовка к одностадийному RT-PCR в режиме реального времени

Примечание: Необходимо использовать правильные трубки и колпачки (см. раздел НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ).
Примечание: При подготовке одноэтапных реакций RT-ПЦР необходимо использовать аэрозолестойкие фильтрующие насадки и плотные перчатки. Будьте предельно осторожны, чтобы предотвратить перекрестное загрязнение.
Примечание: Полностью разморозьте все реагенты на льду.

Примечание: Кратковременно прокрутите пробирки с реагентами, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

Примечание: Этапы A~D выполняются автоматически на Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH. См. в каждом руководстве по эксплуатации.

A. Приготовьте одностадийный RT-PCR Mastermix.

5 мкл	5X RP1A MOM
5 мкл	Вода, не содержащая РНК
5 мкл	5X Буфер для одношагового режима реального времени
2 мкл	В режиме реального времени Одношаговый фермент
17 мкл	Общий объем одностадийной смеси для RT-PCR

Примечание: Рассчитайте общее количество каждого реагента, исходя из количества реакций, включая образцы и контроль.

B. Быстро перемешайте вихревым методом и коротко .

C. Аликвотируйте 17 мкл одностадийной смеси для RT-PCR Mastermix в пробирки для ПЦР.

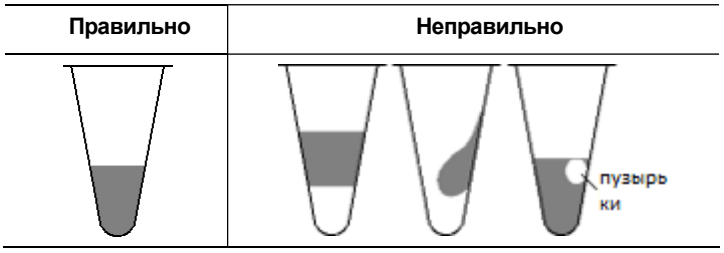
D. Добавьте 8 мкл нуклеиновых кислот каждого образца в пробирку, содержащую аликвоту одностадийной RT- PCR Mastermix.

17 мкл	Mastermix для одностадийной RT-PCR
8 мкл	Нуклеиновая кислота образца
25 мкл	Общий объем реакции

E. Закройте крышку и ненадолго прокрутите пробирки для ПЦР.

F. Убедитесь, что жидкость, содержащая все компоненты ПЦР, на дне каждой пробирки для ПЦР. Если это не так, повторите центрифугирование при более высокой скорости вращения в течение более длительного времени.

Примечание: Перед проведением ПЦР рекомендуется центрифугировать пробирки, чтобы удалить пузырьки воздуха и собрать остатки жидкости на дне пробирок.



Примечание: Для каждого образца используйте новый стерильный наконечник пипетки.
Примечание: Для **отрицательного контроля (ОК)** вместо нуклеиновой образца используйте 8 мкл воды, не содержащей РНК.

Примечание: Для **положительного контроля (ПК)** используйте 8 мкл ПК RP1A вместо нуклеиновой кислоты образца.

Примечание: Пожалуйста, будьте осторожны, не допускайте перекрестного загрязнения одноэтапной RT-PCR мастер-миксом и образцами с положительным контролем.

Примечание: Не маркируйте реакционную пробирку на ее крышке. Флуоресценция обнаруживается в верхней части каждой реакционной пробирки.

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

1. CFX96™ Система обнаружения ПЦР в реальном времени (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) может быть разделена на три этапа: Настройка протокола, настройка пластины и запуск.

A. Настройка протокола

1) В главном меню выберите **File → New → Protocol** (**Файл – Новый – Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор протоколов)**.

Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **редакторе протоколов** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	50 C°	20 мин
2		95 C°	15 мин
3	45	95 C°	10 сек
4*		60 C°	1 мин
5*		72 C°	10 сек
6	GOTO Шаг 3, еще 44 раза		

*** Считывание планшета на шаге 4 и 5**. Флуоресценция определяется при 60°C и 72°C.

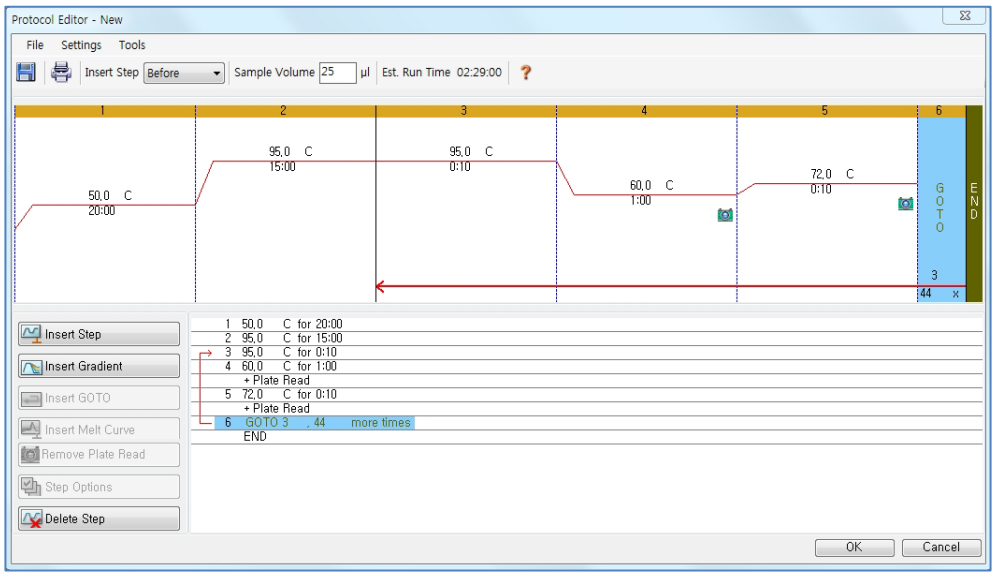


Рис. 2. **Редактор протоколов**

3) Щелкните на поле рядом с **Sample Volume (Объем Образца)**, чтобы ввести непосредственно 25 мкл.

4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Experiment Setup (Настройка эксперимента)**.

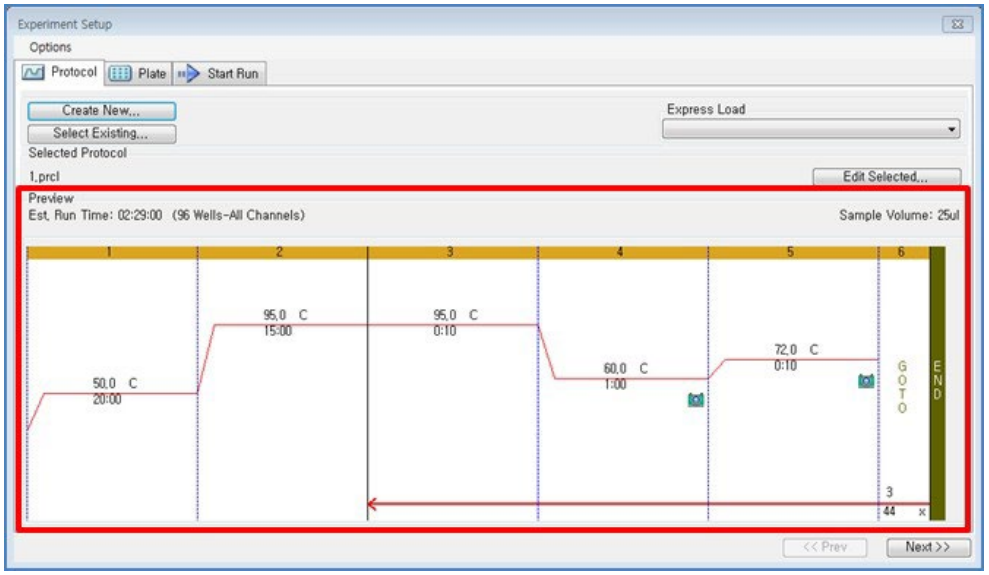


Рис. 3. **Экспериментальная установка: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **Plate (Планшет)** в **Experiment Setup (Настройки эксперимента)** нажмите **Create New (Создать новый)**, чтобы открыть окно **Plate Editor (Редактор планшета).**

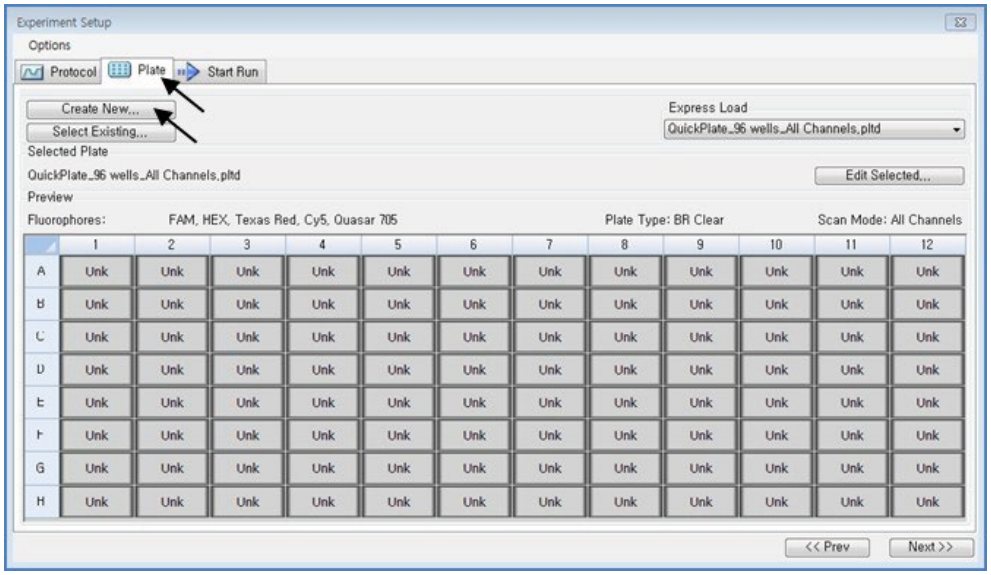


Рис. 4. **Редактор планшета**

2) Нажмите **Select Fluorophores** (**Выбрать флуорофоры)**, чтобы указать флуорофоры (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), которые будут использоваться, и нажмите **OK**.

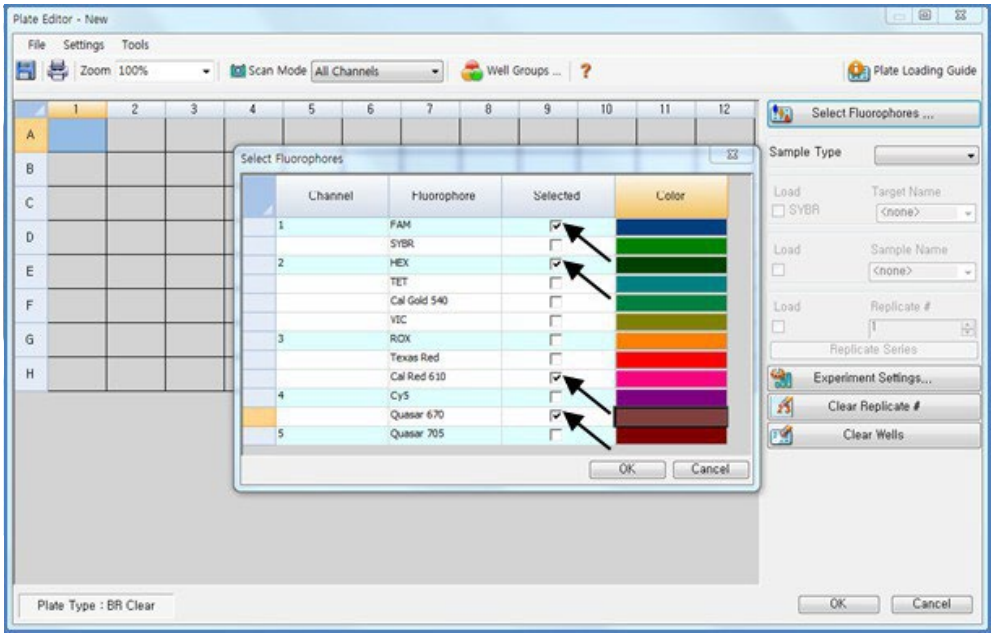


Рис. 5. **Выбор флуорофоров** (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**)

3) Выберите лунки, в которые будет помещена ПЦР-пробирка, и выберите тип образца в раскрывающемся меню **Sample Type (Тип образца).**

- **Неизвестный**: Клинические образцы
- **Отрицательный контроль**
- **Положительный контроль**

4) Щелкните по соответствующим флажкам (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **Sample Name (Имя Образца)** и нажмите клавишу ввода.

6) В разделе **Settings (Настройки)** главного меню **Plate Editor (Редактора Планшета)** выберите **Plate Size (96 wells)** (**Размер планшета (96 лунок)** и **Plate Type (BR White)** (**Тип планшета (BR White).**

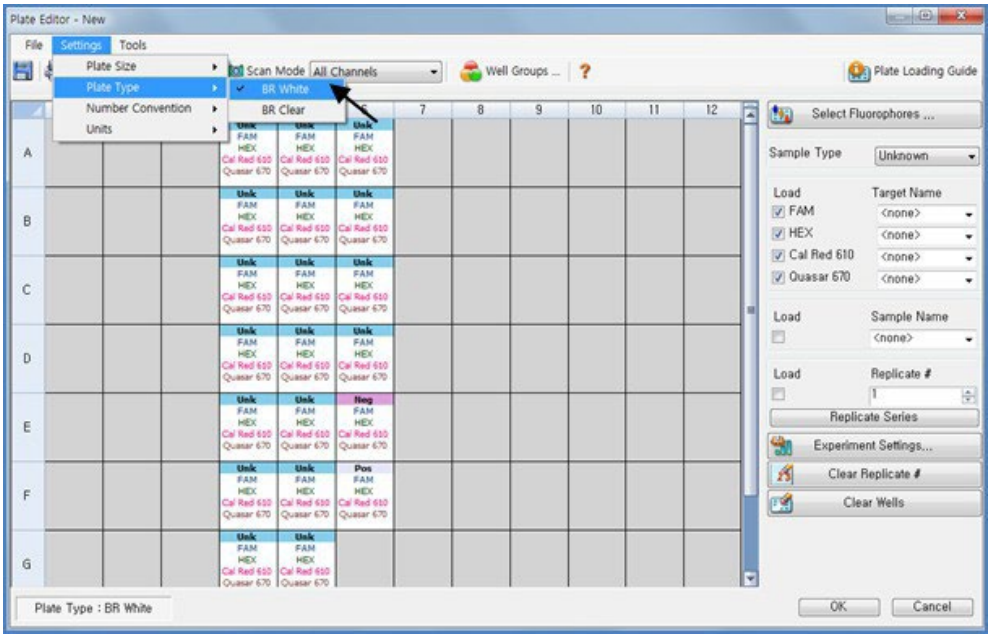


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **OK,** чтобы сохранить новый планшет.

8) Вы вернетесь в окно **Experiment Setup (Настройки эксперимента)**

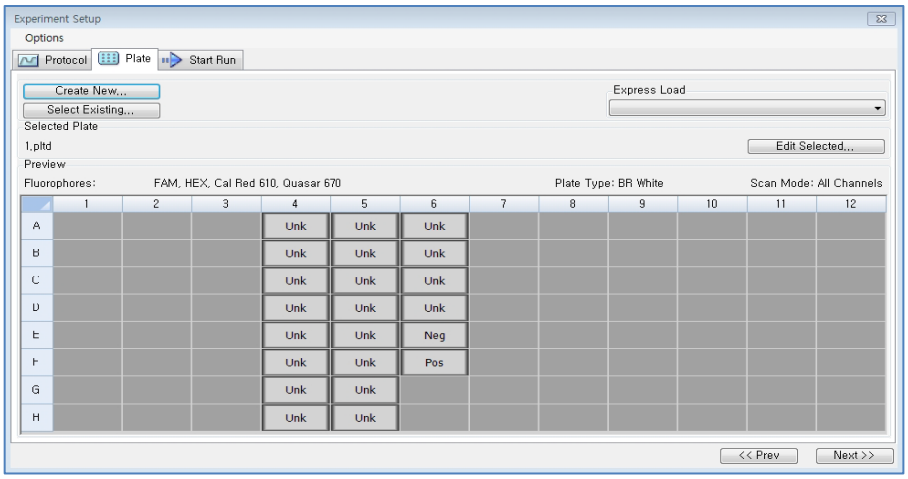


Рис. 7. **Настройки эксперимента: Планшет**

9) Нажмите кнопку **Next (Далее)**, чтобы начать выполнение.

C. Start Run (Начать запуск)

1) На вкладке **Start Run (Начать Запуск)** в разделе **Experiment Setup (Настройки Эксперимента)** нажмите **Close Lid (Закрыть Крышку)**, чтобы закрыть крышку прибора.

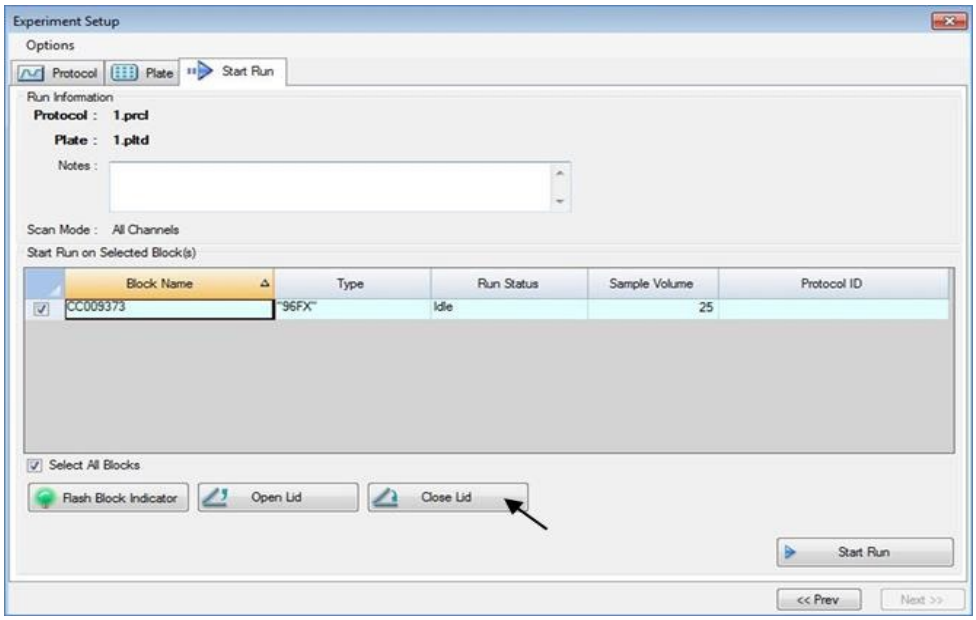


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2) Нажмите кнопку **Start Run (Начать выполнение)**.
3) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **SAVE (СОХРАНИТЬ)**, и запуск начнется.

1.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Создайте одну папку для сохранения результатов определения кривой амплификации.

2) Название папки может быть любым по желанию пользователя (Для функции «Seegene Export» автоматически создаются папки «QuantStep4» и «QuantStep5» для сохранения данных каждой кривой амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX Manager™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **Quantitation tab (Количественная оценка),** чтобы подтвердить результаты кривой амплификации.

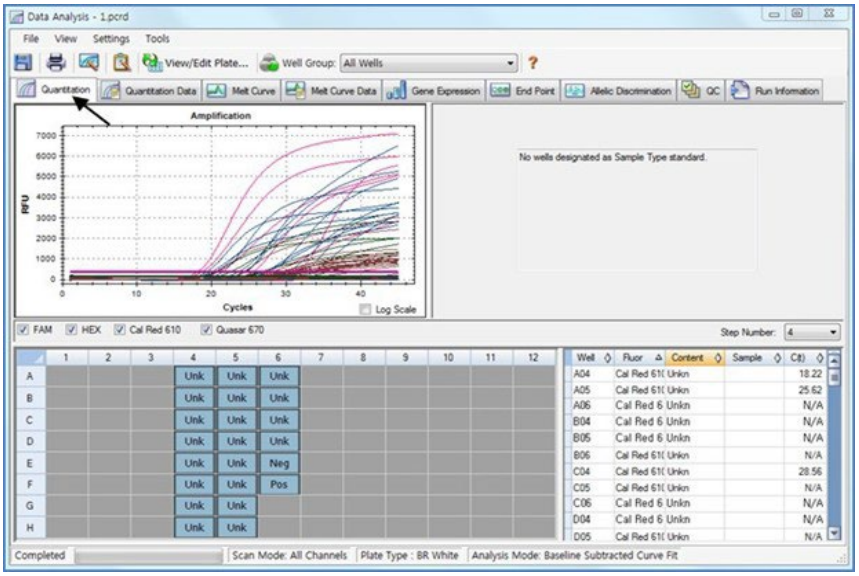


Рис. 9. **Результаты кривой ампификации**

2) Выберите **No Baseline Subtraction (Без вычитания базовой линии)** в **Analysis Mode (Режим анализа)** меню **Settings (Настройки).**

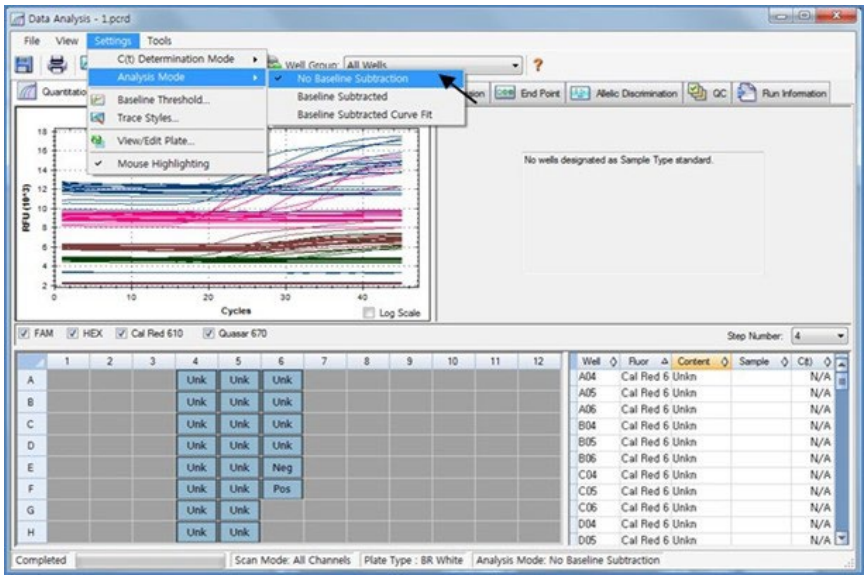


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите пункт **Seegene Export** в меню **Tools (Инструменты).**

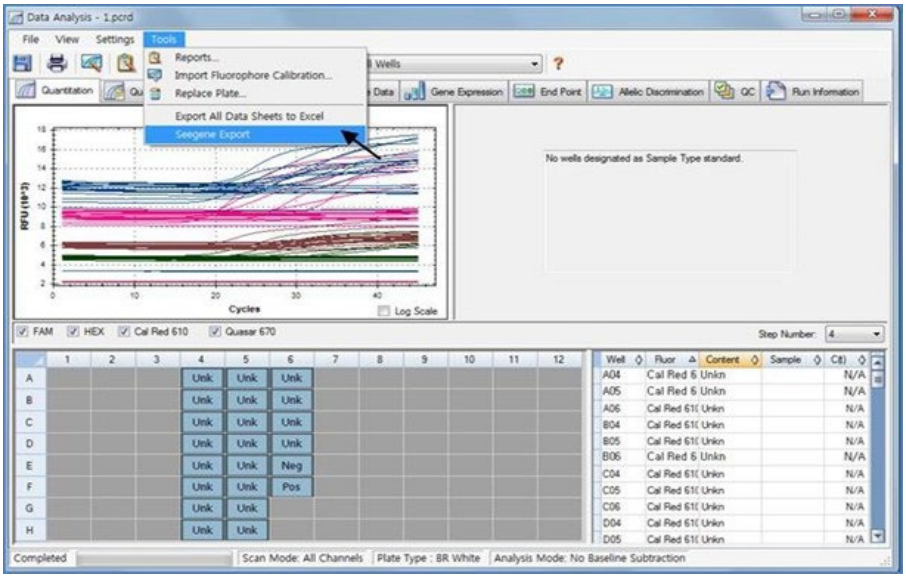


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

4) Выберите место для сохранения данных и нажмите **OK**.

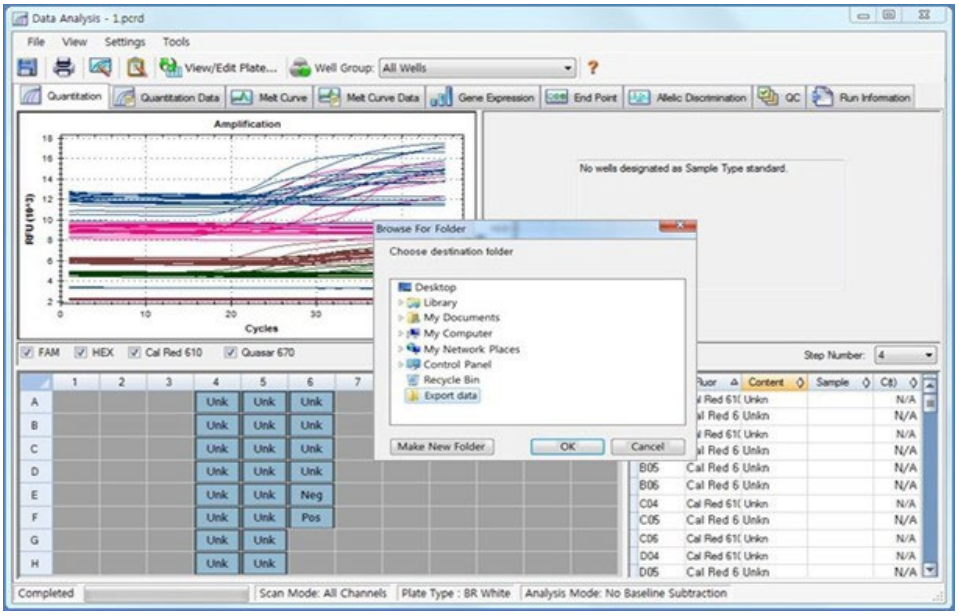


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **Option (Опции)**, чтобы выбрать **CFX96** в меню **Instrument (Инструменты).**

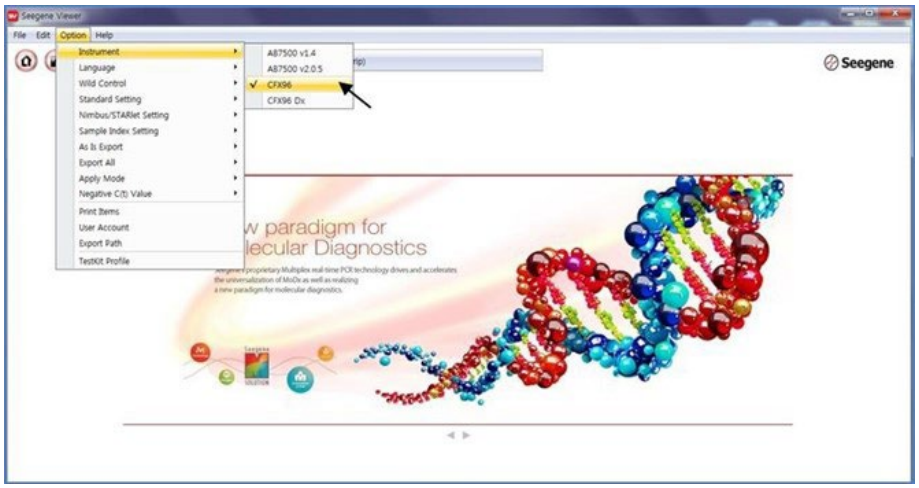


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите кнопку **Open (Открыть)**, чтобы найти сохраненный файл в папке «QuantStep4», откройте файл результатов и выберите тестовый набор в меню **PRODUCT (ПРОДУКТ).**

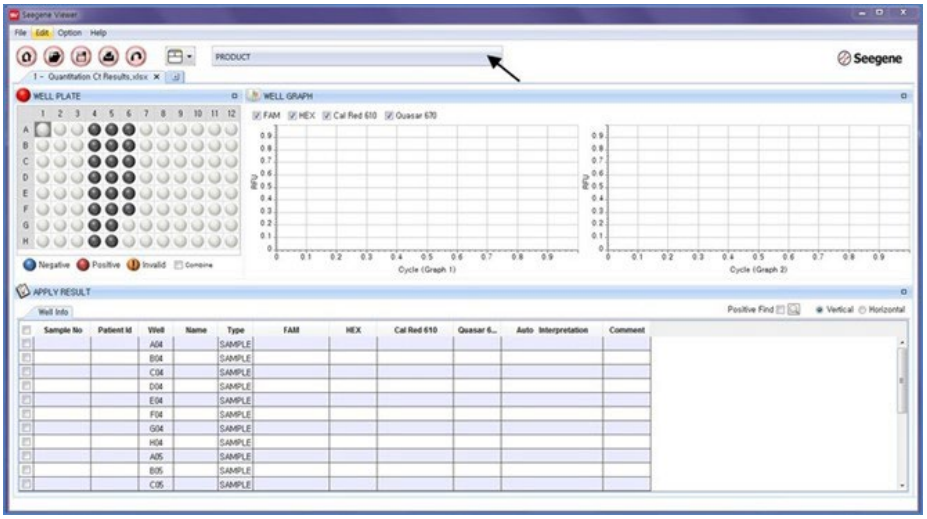


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

Примечание: Пожалуйста, уточните тип пробирки при выборе набора для тестирования (8 полосок, 96 планшет или 96 пленок).

3) Проверьте результат для каждой лунки.

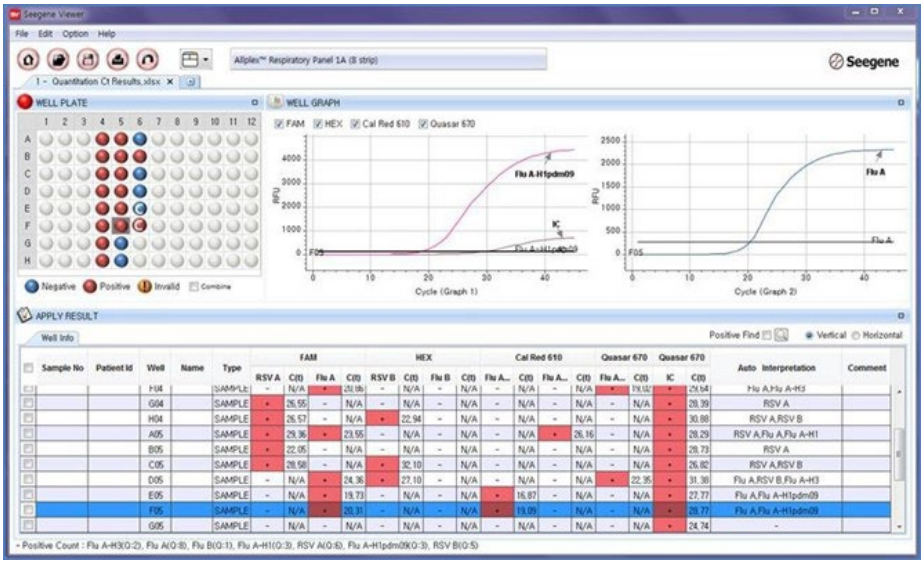


Рис. 15. **Результат тестирования в Seegene Viewer**

4) Сокращения в отчете.

Аналит	Seegene Viewer
Flu A-H1pdm09	pdm09
Flu A-H1	H1
Flu A-H3	H3

5) Критерии достоверности результатов контроля

a. Действительный прогон анализа

Для подтверждения достоверности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться PC (положительным контролем) и NC (отрицательным контролем). Проба считается достоверной, если соблюдены все следующие критерии:

Контроль	Результат работы Seegene Viewer (Ct)								
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		Авто интерпретация
	RSVA	FluA	RSVB	FluB	pdm09	H1	IC	H3	
RP1A PC	≤ 40	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	Положит. Контроль(+)
NC	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Отриц. Контроль (-)

b. Недействительный прогон анализа

В случае нарушения достоверности результаты не следует интерпретировать или сообщать о них. А реакцию ПЦР необходимо повторить.

2. Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента **CFX96**™ Dx System (Bio-Rad) может быть разделена на три этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск.

1) **Настройка протокола**

В главном меню выберите **File → New → Protocol (Файл – Новый – Протокол),** чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор протоколов).**

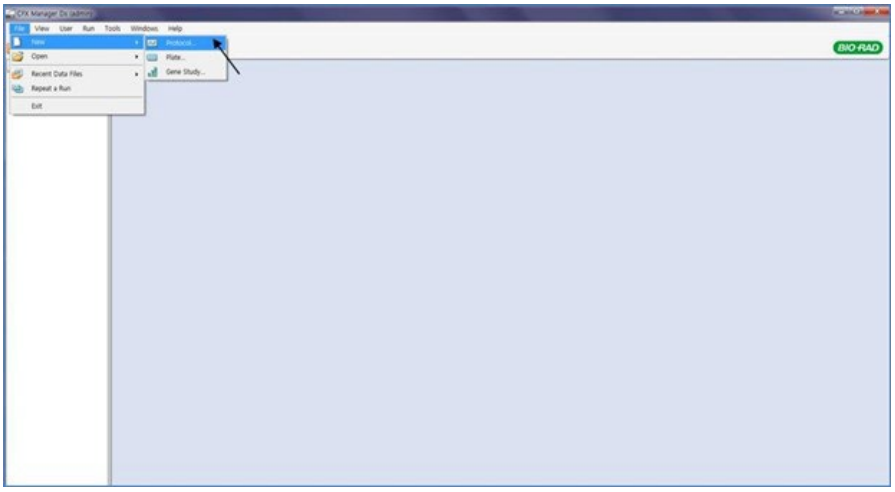


Рис. 1. **Настройка протокола**

1) В **Protocol Editor (Редактор протоколов)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Примечание*: Считывание планшета на шаге 4 и 5. Флуоресценция определяется при 60°C и 72°C.

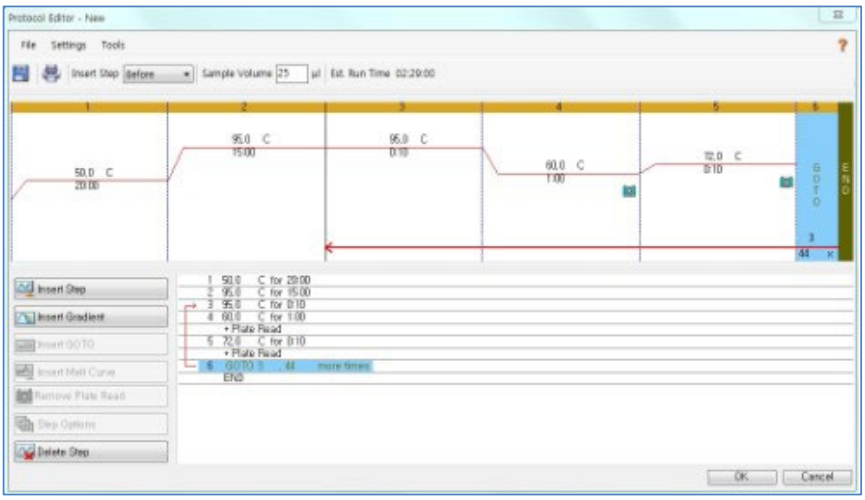


Рис. 2. **Редактор протоколов**

2) Щелкните на поле рядом с **Sample Volume (Объем образца)**, чтобы ввести непосредственно 25 мкл.

3) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Run Setup (Настройка запуска)**.

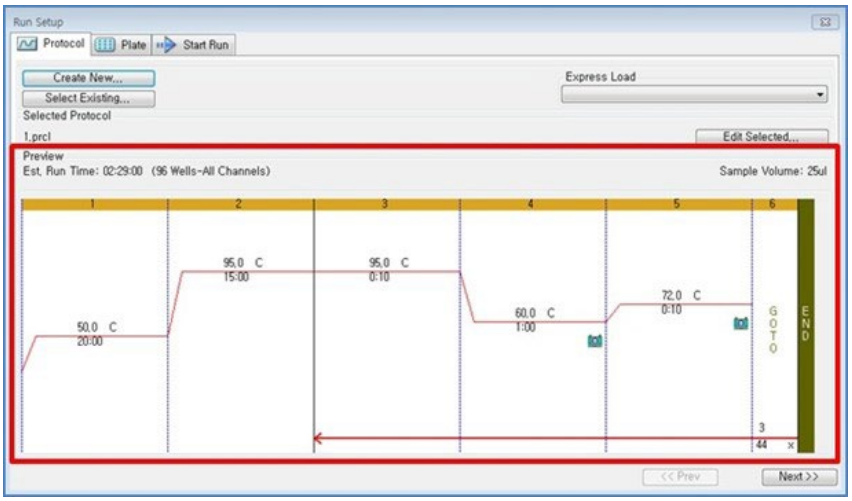


Рис. 3. **Настройка запуска: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **Plate (Планшет)** в **Run Setup (Настройки запуска)** нажмите **Create New (Создать новый)** , чтобы открыть окно **Plate Editor (Редактор планшета).**

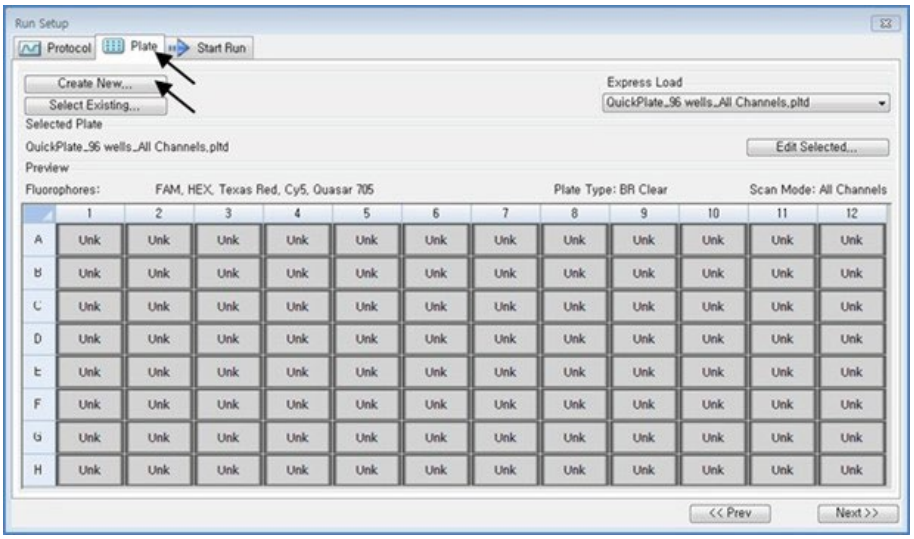


Рис. 4. **Редактор планшета**

2) Нажмите **Select Fluorophores** (**Выбрать флуорофоры)**, чтобы указать флуорофоры (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), которые будут использоваться, и нажмите **OK.**

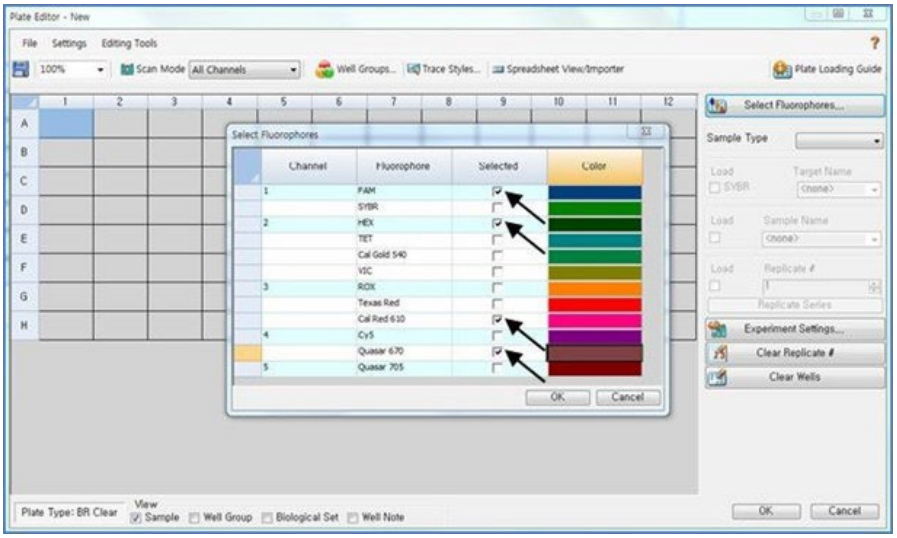


Рис. 5. **Выбор флуорофоров** (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**)

3) Выберите лунки, в которые будет помещена ПЦР-пробирка, и выберите тип образца в раскрывающемся меню **Sample Type (Тип образца).**

- **Неизвестный**: Клинические образцы
- **Отрицательный контроль**
- **Положительный контроль**

4) Щелкните по соответствующим флажкам (**FAM**, **HEX**, **Cal Red 610** и **Quasar 670**), чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **Sample Name (Имя Образца)** и нажмите клавишу ввода.

6) В разделе **Settings (Настройки)** главного меню **Plate Editor (Редактора Планшета)** выберите **Plate Size (96 wells) (Размер планшета (96 лунок))** и **Plate Type (BR White) (Тип планшета (BR White))**.

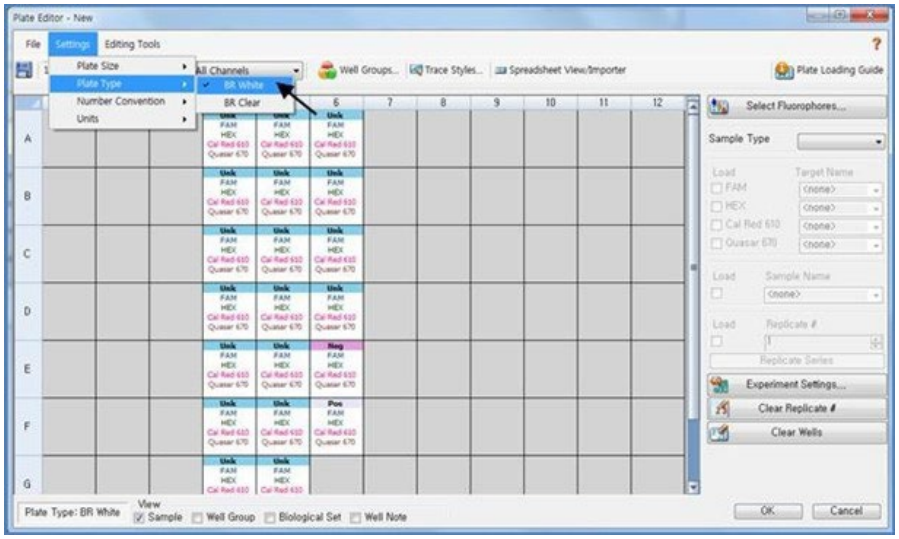


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **OK,** чтобы сохранить новй планшет.

8) Вы вернетесь в окно **Run Setup (Настройка Запуска).**

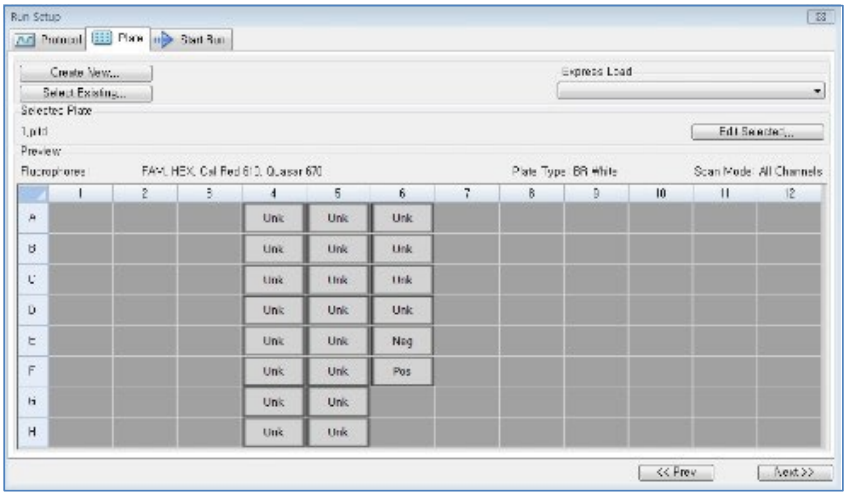


Рис. 7. **Настройка запуска: Планшет**

9) Нажмите кнопку **Next (Далее)**, чтобы начать выполнение.

C. Start Run (**Начать запуск)**

1) На вкладке **Start Run (Начать Запуск)** в разделе **Experiment Setup (Настройка Эксперимента)** нажмите **Close Lid (Закрыть Крышку)**, чтобы закрыть крышку прибора.

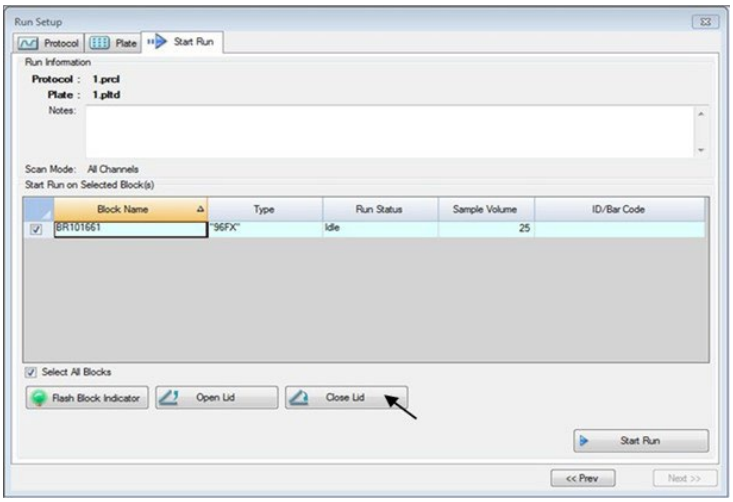


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2) Нажмите кнопку **Start Run** (**Начать выполнение)**.
3) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **SAVE (СОХРАНИТЬ)**, и запуск начнется.

2.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Создайте одну папку для сохранения результатов определения кривой амплификации.
2) Название папки может быть любым по желанию пользователя (Для функции «Seegene Export» автоматически создаются папки «QuantStep4» и «QuantStep5» для сохранения данных каждой кривой амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX Manager™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **Quantitation tab (Количественная оценка),** чтобы подтвердить результаты кривой амплификации.

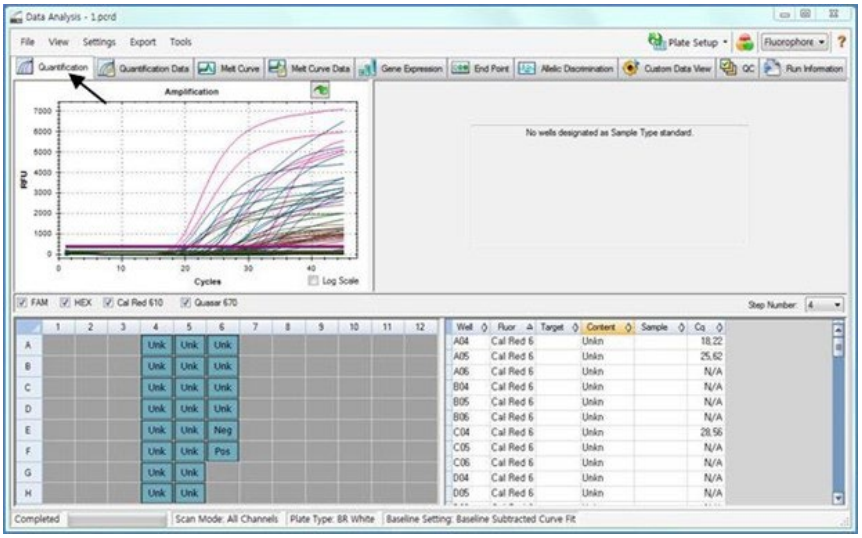


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

2) Выберите **No Baseline Subtraction (Без вычитания базовой линии)** в **Analysis Mode (Режим анализа)** меню **Settings (Настройки).**

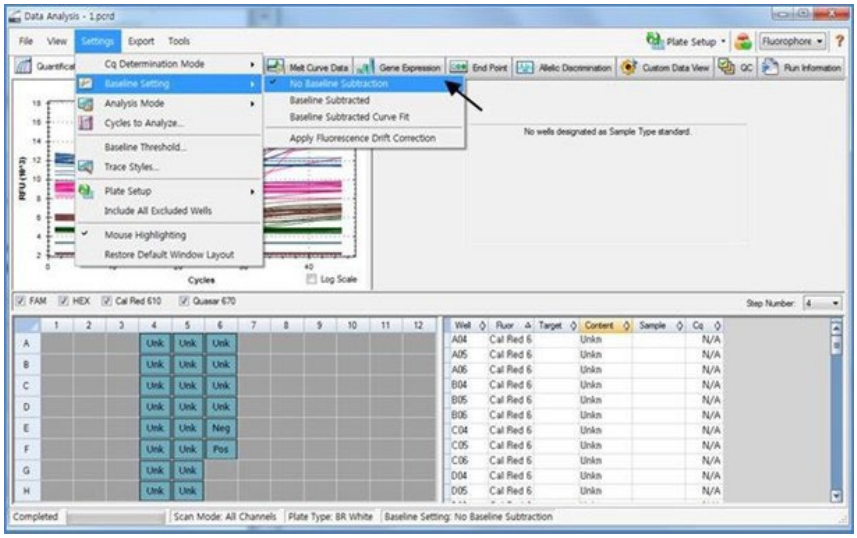


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите **Seegene Export** в меню **Export (Экспорт)**.

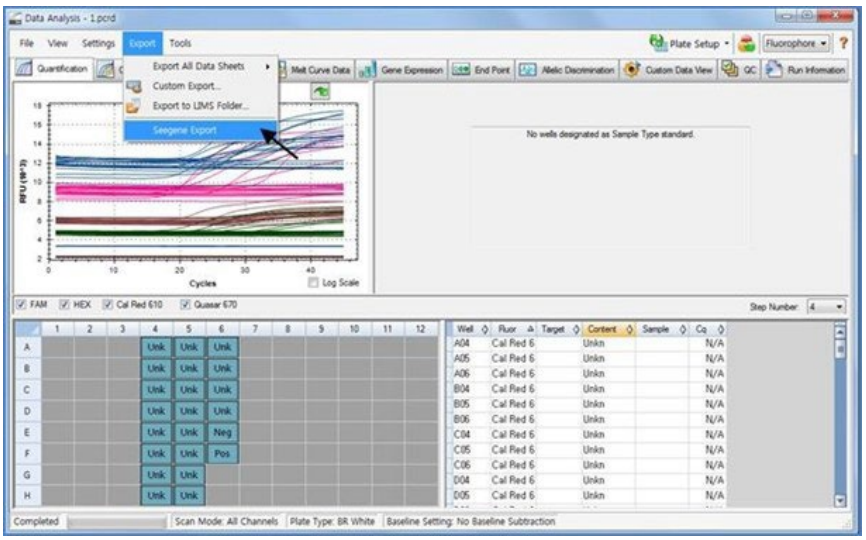


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

4) Выберите место для сохранения данных и нажмите **OK**.

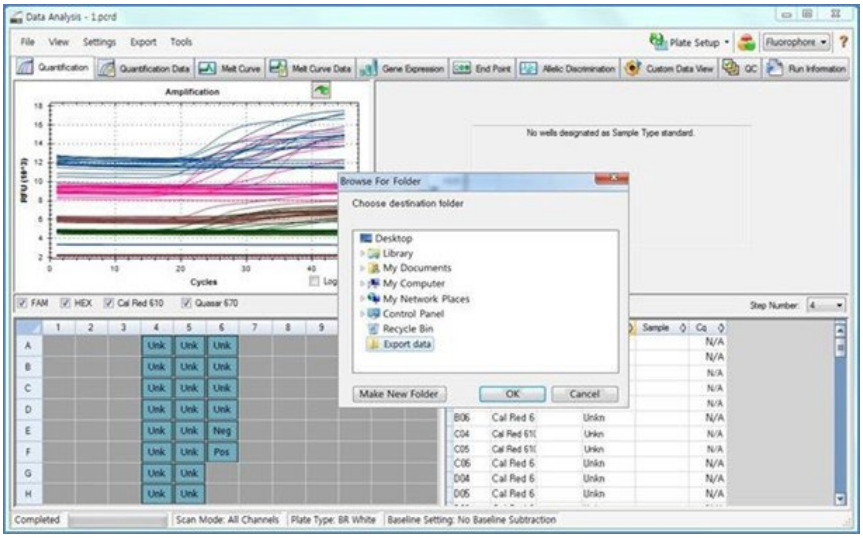


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **Option (Опции)**, чтобы выбрать **CFX96 Dx** в меню **Instrument (Инструменты).**

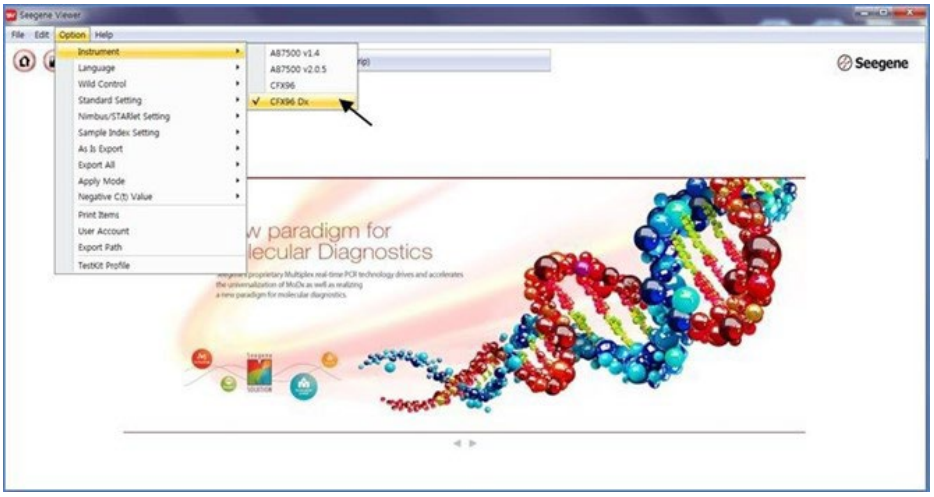


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите кнопку **Open** (**Открыть)**, чтобы найти сохраненный файл в папке «QuantStep4», откройте файл результатов, выберите тестовый набор в меню **PRODUCT (ПРОДУКТ).**

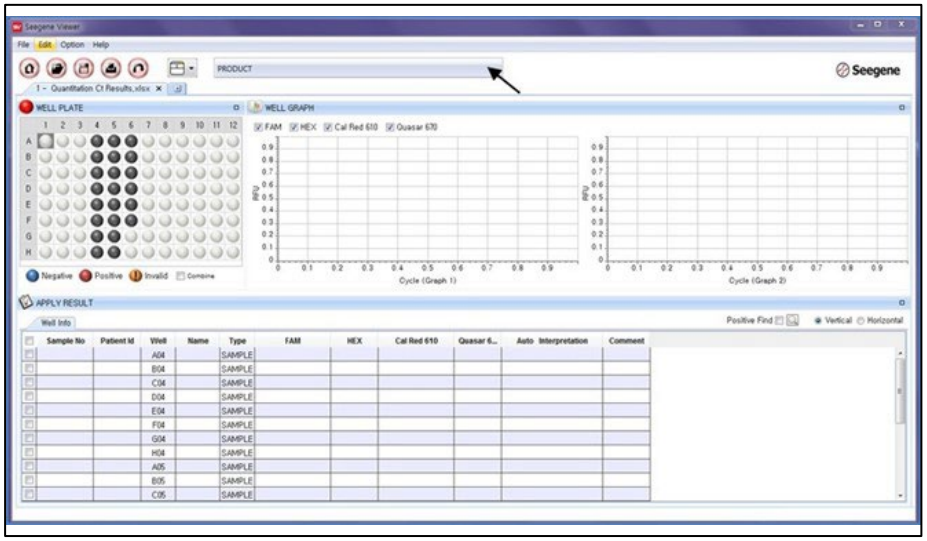


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

Примечание: Пожалуйста, уточните тип пробирки при выборе тест-набора (8 полосок, 96 планшет или 96 пленок).

3) Проверьте результат для каждой лунки.

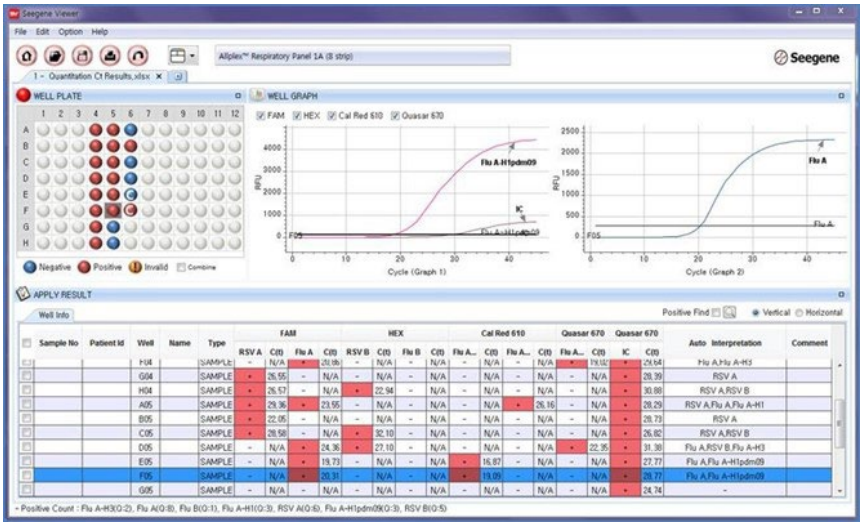


Рис. 15. **Результат тестирования в программе Seegene Viewer**

4) Сокращения в отчете.

Аналит	Seegene Viewer
Flu A-H1pdm09	pdm09
Flu A-H1	H1
Flu A-H3	H3

5) Критерии достоверности результатов контроля

a. Действительный прогон анализа

Для подтверждения достоверности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться PC (положительным контролем) и NC (отрицательным контролем). Проба считается достоверной, если соблюдены все следующие критерии:

Контроль	Результат работы Seegene Viewer (Ct)								
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar670		Авто интерпретация
	RSVA	FluA	RSVB	FluB	pdm09	H1	IC	H3	
RP1A PC	≤ 40	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	≤ 42	Положит. Контроль(+)
NC	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Отрицат. Контроль (-)

b. Недействительный прогон анализа

В случае нарушения достоверности результаты не следует интерпретировать или сообщать о них. А реакцию ПЦР необходимо повторить.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Интерпретация результатов

Флуорофор	Аналит	
	График 1	График 2
FAM	RSV A	Грипп A
HEX	RSV B	Грипп B
Cal Red 610	Грипп A-H1pdm09	Грипп A-H1
Quasar 670	IC	Грипп A-H3

Аналит	Значение Ct	Результат
RSV A	≤ 40	Обнаружено (+)
	> 40 или N/A	Не обнаружено (-)
Другие	≤ 42	Обнаружено (+)
	> 42 или N/A	Не обнаружено (-)

Целевой результат*		Результат IC	Интерпретация
График 1	График 2		
+	-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаружена**
-	+		
+	+		
+	-	-	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаружена**** - Могут присутствовать дополнительные аналиты, которые не были обнаружены.
-	+		
+	+		
-	-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, не обнаружена**
-	-	-	**Недействительный*** - Результаты указывают на неправильный сбор образца, процесс (т.е. отсутствие добавления экзогенного IC) или наличие ингибиторов. - Повторите тест с выделением нуклеиновой кислоты, используя другую аликвоту исходного образца. - Если в реэкстрагированной нуклеиновой кислоте наблюдается тот же результат, пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест с этапа экстракции (после добавления RP-V IC). - Если в разбавленном образце получен тот же результат, пожалуйста, соберите образцы снова.

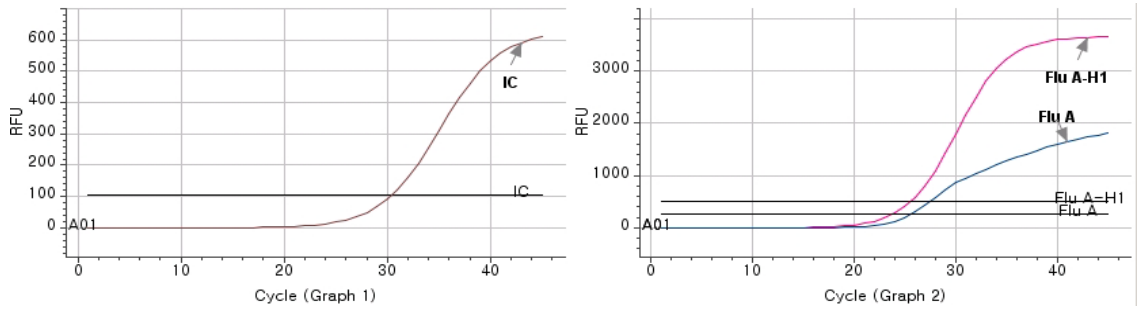
* Если обнаружен только вирус гриппа A, но не подтип вируса гриппа A, то либо подтип не идентифицируется данным продуктом, либо титр вируса в образце очень низкий. Подтип вируса гриппа A может быть определен с помощью секвенирования. Если выявлен только подтип вируса гриппа A, образец содержит очень низкий титр вируса, поэтому результат следует считать выявленным как подтип вируса гриппа A.

** Высокий уровень целевых нуклеиновых кислот может вызвать помехи при обнаружении и считывании данных внутреннего контроля. Недействительные сигналы внутреннего контроля не означают, что положительные результаты для мишеней недействительны.

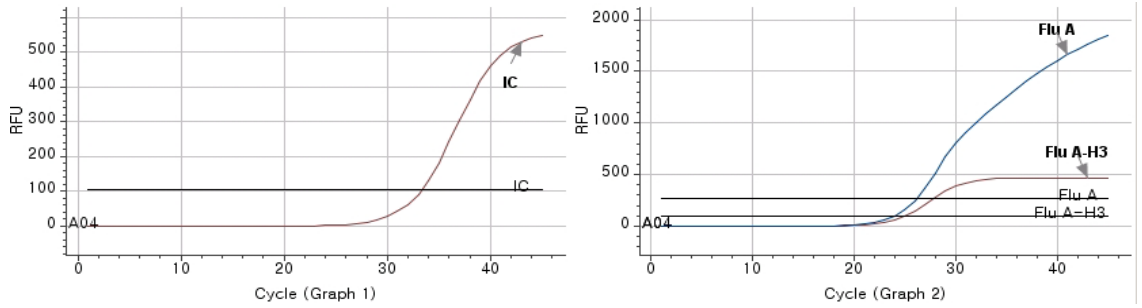
*** Подробные инструкции см. в разделе «Устранение неисправностей».

2. Применение к клиническим образцам

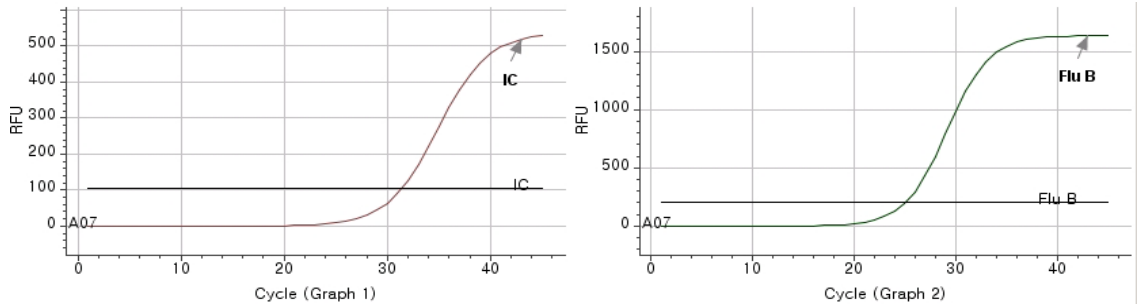
Образец 1



Образец 2



Образец 3



Образец	Результат работы Seegene Viewer (Ct)								
	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670		
	RSV A	Flu A	RSV B	Flu B	Flu A H1pdm09	Flu A H1	Flu AH3	IC	Авто интерпретация
1	Н/Д	25.71	Н/Д	Н/Д	Н/Д	25.61	Н/Д	30.47	Грипп А, Грипп А-Н1
2	Н/Д	26.24	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	25.11	33.35	Грипп А, Грипп А-Н3
3	Н/Д	Н/Д	Н/Д	25.04	Н/Д	Н/Д	Н/Д	31.42	Грипп В

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Allplex™ Respiratory Panel 1A		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Нет сигнала	Флуорофоры для анализа данных не соответствуют протоколу	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Неправильная настройка термоциклера реального времени	Пожалуйста, проверьте условия термоциклирования и повторите тест при правильных настройках.
	Неправильное хранение или истекший срок годности тест- набора	Проверьте условия хранения (см. стр. 11) и срок годности (см. этикетку) теста-комплекта и при необходимости используйте новый комплект.
	Нарушение процесса выделения нуклеиновых кислот	Отсутствие сигнала в IC может указывать на потерю нуклеиновой кислоты во время экстракции. Убедитесь, что вы используете рекомендованный метод экстракции. Если из-за ингибиторов, повторно извлеките исходный образец или разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест с момента извлечения.
Нет сигнала внутреннего контроля	Высокая нагрузка на нуклеиновую кислоту патогена	Если сигнал патогена-мишени наблюдается, но не IC, то IC-амплификация может быть подавлена высоким титром патогена-мишени. Чтобы подтвердить сигнал IC, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
Предполагаемые ложноположительные или целевые сигналы, наблюдаемые в отрицательном контроле	Загрязнение	Обеззараживайте все поверхности и инструменты гипохлоритом натрия и этанолом. На протяжении всей процедуры используйте только фильтрующие насадки и меняйте их между пробирками. Повторите всю процедуру с выделения нуклеиновых кислот с помощью нового набора реагентов.

AllplexTM Respiratory Panel 1A		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Предполагаемый ложноотрицательный сигнал или отсутствие сигнала в положительном контроле	Ошибка при сборе образцов	Пожалуйста, проверьте метод взятия образца и повторно возьмите образец.
	Неправильное хранение образца	Пожалуйста, повторно соберите образец и повторите всю процедуру. Убедитесь, что образец хранится в соответствии с рекомендациями.
	Ошибка при выделении нуклеиновых кислот	Пожалуйста, проверьте процедуру выделения нуклеиновой кислоты, а также концентрацию нуклеиновой кислоты и повторно выделите нуклеиновую кислоту.
	Ошибка при добавлении нуклеиновой кислоты в соответствующие пробирки для ПЦР	Проверьте номера образцов в пробирках с нуклеиновой кислотой и убедитесь, что добавили нуклеиновую кислоту в правильные пробирки для ПЦР, а при необходимости тщательно повторите тест.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом растворе и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Неправильная смесь для ПЦР	Убедитесь, что все компоненты добавлены в ПЦР-смесь (чувствительность снижается при использовании готовых премиксов). Перед использованием все реагенты должны быть гомогенизированы.
Скачки на всех циклах кривой амплификации	Пузырек в пробирке для ПЦР	Центрифугируйте пробирку для ПЦР перед запуском.

ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Особенности

Allplex™ Respiratory Panel 1A была протестирована на перекрестную реактивность с 101 стандартным материалом и образцами синтетической РНК, как указано ниже. Специфические цели, предназначенные для обнаружения, были идентифицированы **Allplex™** Respiratory Panel 1A.

№	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
1	*Human influenza A virus (H1N1)*	ATCC	VR-95	Обнаружены грипп A, грипп A-H1
2	*Human influenza A virus (H1N1)*	ATCC	VR-97	Обнаружены грипп A, грипп A-H1
3	*Human influenza A virus (H1N1)*	ATCC	VR-98	Обнаружены грипп A, грипп A-H1
4	*Human influenza A virus (H1N1)*	ATCC	VR-219	Обнаружены грипп A, грипп A-H1
5	*Human influenza A virus (H1N1)*	ATCC	VR-546	Обнаружены грипп A, грипп A-H1
6	*Human influenza A virus (H1N1)*	ATCC	VR-825	Обнаружены грипп A, грипп A-H1
7	*Human influenza A virus (H1pdm09)*	ATCC	VR-1736	Обнаружен грипп A-H1pdm09
8	*Human influenza A virus (H3N2)*	ATCC	VR-544	Обнаружены грипп A, грипп A-H3
9	*Human influenza A virus (H3N2)*	ATCC	VR-547	Обнаружены грипп A, грипп A-H3
10	*Human influenza A virus (H3N2)*	ATCC	VR-810	Обнаружены грипп A, грипп A-H3
11	*Human influenza A virus (H3N2)*	ATCC	VR-822	Обнаружены грипп A, грипп A-H3
12	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-101	Обнаружен грипп B
13	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-102	Обнаружен грипп B
14	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-103	Обнаружен грипп B
15	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-295	Обнаружен грипп B
16	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-296	Обнаружен грипп B
17	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-523	Обнаружен грипп B
18	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-786	Обнаружен грипп B
19	*Human influenza B virus*	ATCC	VR-823	Обнаружен грипп B
20	*Human respiratory syncytial virus A*	ATCC	VR-26	Обнаружен RSV A
21	*Human respiratory syncytial virus B*	ATCC	VR-955	Обнаружен RSV B
22	*Human influenza A virus (H7N9)*	Синтетическая РНК[1)]	KF055471.1	Обнаружен грипп A
23	*Human influenza A virus (H7N9)*	Синтетическая РНК[1)]	KP416633.1	Обнаружен грипп A

№	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
24	*Human influenza A virus (H7N9)*	Синтетическая РНК[1)]	NC026427.1	Обнаружен грипп A
25	*Avian influenza A virus (H5N8)*	Синтетическая РНК[1)]	KJ508983.1	Обнаружен грипп A
26	*Avian influenza A virus (H5N8)*	Синтетическая РНК[1)]	KP732700.1	Обнаружен грипп A
27	*Avian influenza A virus (H9N2)*	Синтетическая РНК[1)]	FJ793343.1	Обнаружен грипп A
28	*Avian influenza A virus (H9N2)*	Синтетическая РНК[1)]	KX867836.1	Обнаружен грипп A
29	*Human influenza A virus (H5N1)*	Синтетическая РНК[1)]	HM172159.1	Обнаружен грипп A
30	*Human influenza A virus (H5N1)*	Синтетическая РНК[1)]	HQ200425.1	Обнаружен грипп A
31	*Avian influenza A virus (H5N1)*	Синтетическая РНК[1)]	NC007363.1	Обнаружен грипп A
32	*Human metapneumovirus*	BEI	NR-22232	Не обнаружено
33	*Human adenovirus 1*	ATCC	VR-1	Не обнаружено
34	*Human adenovirus 2*	KBPV	VR-58	Не обнаружено
35	*Human adenovirus 3*	ATCC	VR-3	Не обнаружено
36	*Human adenovirus 4*	ATCC	VR-1572	Не обнаружено
37	*Human adenovirus 5*	KBPV	VR-61	Не обнаружено
38	*Human adenovirus 7*	ATCC	VR-7	Не обнаружено
39	*Human adenovirus 8*	ATCC	VR-1368	Не обнаружено
40	*Human adenovirus 14*	ATCC	VR-15	Не обнаружено
41	*Human adenovirus 18*	ATCC	VR-1095	Не обнаружено
42	*Human adenovirus 23*	ATCC	VR-1101	Не обнаружено
43	*Human adenovirus 31*	ATCC	VR-1109	Не обнаружено
44	*Human adenovirus 40*	ATCC	VR-931	Не обнаружено
45	*Human adenovirus 41*	ATCC	VR-930	Не обнаружено
46	*Human rhinovirus 8*	ATCC	VR-488	Не обнаружено
47	*Human rhinovirus 14*	ATCC	VR-284	Не обнаружено
48	*Human rhinovirus 16*	ATCC	VR-283	Не обнаружено
49	*Human rhinovirus 42*	ATCC	VR-338	Не обнаружено
50	*Human rhinovirus 90*	ATCC	VR-1291	Не обнаружено
51	*Human parainfluenza virus 1*	ATCC	VR-1380	Не обнаружено
52	*Human parainfluenza virus 2*	ATCC	VR-92	Не обнаружено
53	*Human parainfluenza virus 3*	ATCC	VR-93	Не обнаружено

№	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
54	*Human parainfluenza virus 4A*	ATCC	VR-1378	Не обнаружено
55	*Human parainfluenza virus 4B*	ATCC	VR-1377	Не обнаружено
56	*Human coronavirus 229E*	ATCC	VR-740	Не обнаружено
57	*Human coronavirus OC43*	ATCC	VR-1558	Не обнаружено
58	*Measles virus*	KBPV	VR-35	Не обнаружено
59	*Mumps virus*	KBPV	VR-51	Не обнаружено
60	*Human herpesvirus 1*	ATCC	VR-260	Не обнаружено
61	*Human herpesvirus 4*	ATCC	VR-1492	Не обнаружено
62	*Human herpesvirus 5*	ATCC	VR-807	Не обнаружено
63	*Coxsackievirus A9*	KBPV	VR-11	Не обнаружено
64	*Human coxsackievirus A24*	ATCC	VR-583	Не обнаружено
65	*Human coxsackievirus B1*	KBPV	VR-13	Не обнаружено
66	*Human coxsackievirus B2*	KBPV	VR-14	Не обнаружено
67	*Human coxsackievirus B3*	KBPV	VR-15	Не обнаружено
68	*Human coxsackievirus B4*	KBPV	VR-16	Не обнаружено
69	*Human coxsackievirus B5*	KBPV	VR-17	Не обнаружено
70	*Human coxsackievirus B6*	KBPV	VR-18	Не обнаружено
71	*Human echovirus 6*	KBPV	VR-19	Не обнаружено
72	*Human echovirus 7*	KBPV	VR-20	Не обнаружено
73	*Human echovirus 9*	ATCC	VR-39	Не обнаружено
74	*Human echovirus 11*	KBPV	VR-22	Не обнаружено
75	*Human echovirus 25*	KBPV	VR-24	Не обнаружено
76	*Human echovirus 30*	KBPV	VR-25	Не обнаружено
77	*Human enterovirus 70*	ATCC	VR-836	Не обнаружено
78	*Human enterovirus 71*	ATCC	VR-784	Не обнаружено
79	*Bordetella bronchiseptica*	ATCC	BAA-588	Не обнаружено
80	*Bordetella holmesii*	ATCC	51541	Не обнаружено
81	*Bordetella parapertussis*	ATCC	15311	Не обнаружено
82	*Candida albicans*	KCCM	50651	Не обнаружено
83	*Chlamydia trachomatis type A*	ATCC	VR-571B	Не обнаружено
84	*Corynebacterium diphtheriae*	ATCC	14779	Не обнаружено
85	*Escherichia coli*	KCTC	2443	Не обнаружено

№	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
86	*Haemophilus influenzae*	KCCM	42099	Не обнаружено
87	*Lactobacillus acidophilus*	KCTC	3140	Не обнаружено
88	*Legionella pneumophila*	KCTC	12009	Не обнаружено
89	*Moraxella catarrhalis*	ATCC	BAA-1425	Не обнаружено
90	*Mycoplasma genitalium*	ATCC	49895	Не обнаружено
91	*Mycoplasma hominis*	ATCC	23114	Не обнаружено
92	*Mycoplasma pneumoniae*	ATCC	15531	Не обнаружено
93	*Neisseria gonorrhoeae*	ATCC	700825	Не обнаружено
94	*Neisseria meningitidis*	KCCM	41562	Не обнаружено
95	*Pseudomonas aeruginosa*	KCTC	2004	Не обнаружено
96	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	KCCM	40881	Не обнаружено
97	*Staphylococcus epidermidis*	KCCM	35494	Не обнаружено
98	*Streptococcus pneumoniae*	KCCM	40410	Не обнаружено
99	*Streptococcus pyogenes*	KCCM	11873	Не обнаружено
100	*Streptococcus salivarius*	KCCM	11926	Не обнаружено
101	*Ureaplasma urealyticum*	ATCC	27618	Не обнаружено

† Тесты на специфичность повторяли 3 раза.

1) РНК вируса гриппа A птичьего происхождения была синтезирована *in vitro* на основе последовательностей с номером доступа NCBI, указанным в номере изолята.

※ ATCC: Американская коллекция типовых форм
KCTC: Корейская коллекция типовых форм
KCCM: Корейский центр культуры микроорганизмов
KBPV: Корейский банк патогенных вирусов
BEI : Ресурсы BEI; Репозиторий исследовательских ресурсов по биозащите и новым инфекциям

2. Восприимчивость

Восприимчивость определяется как наименьшая концентрация микроорганизмов, которая может быть стабильно обнаружена (≥ 95% положительных результатов среди всех протестированных образцов).
Восприимчивость **Allplex**™ Respiratory Panel 1A определялась с помощью стандартных организмов, пролитых на универсальную транспортную среду (от ^{105} до ^{100} копий/реакция). Предел обнаружения для AllplexTM Respiratory Panel 1A составил 100 копий/реакция.

3. Воспроизводимость

Воспроизводимость **Allplex**™ Respiratory Panel 1A оценивалась между участками, партиями продукта, экспериментаторами и временными точками с использованием 3 образцов концентрации каждого аналита. Значения CV соответствовали критериям менее 10 %.
Результаты соответствовали установленным выше критериям, что подтверждает воспроизводимость характеристик **Allplex**™ Respiratory Panel 1A.

4. Вмешивающиеся вещества

Этот тест проводился с использованием мешающих веществ, состоящих из 8 субстанций, чтобы подтвердить эффективность **Allplex**™ Respiratory Panel 1A в присутствии потенциальных мешающих веществ. Добавление веществ не повлияло на результат: неспецифическое обнаружение или ингибирование амплификации мишени. Исходя из полученных результатов, 8 мешающих веществ не оказали влияния на результаты **Allplex**™ Respiratory Panel 1A.

№	Вмешивающиеся вещества	Концентрация
1	Оксиметазолин (Африн назальный спрей)	15% (v/v)
2	Будесонид (назальные кортикостероиды)	1,26 мг/мл
3	Флутиказона пропионат (назальные кортикостероиды)	0,5 мг/мл
4	Бензокаин	1,7 мг/мл
5	Ментол	1,7 мг/мл
6	Муцин (бычья подчелюстная железа, тип I-S)	60 мкг/мл
7	Занамивир (противовирусный препарат от гриппа)	3,3 мг/мл
8	Мупироцин (антибиотик, назальная мазь)	6,6 мг/мл

5. Клиническое исследование

В общей сложности 38 клинических образцов были протестированы с помощью **Allplex**™ Respiratory Panel 1A и референсного анализа.
Уровень соответствия всех целей должен составлять более 95%. Данный сравнительный тест показал 100% соответствие в клинических образцах между **Allplex**™ Respiratory Panel 1A и референсным анализом. Таким образом, подтверждается, что качество **Allplex**™ Respiratory Panel 1A соответствует действительности.

Аналит	Восприимчивость (по сравнению с эталонным анализом)		
	TP/ (TP+FN)	%[a)]	95% CI[c)]
Человеческий респираторно-синцитиальный вирус A (RSV A)	5/5	100	47.82~100.0
Вирус гриппа A (грипп A)	14/14	100	76.84~100.0
Респираторно-синцитиальный вирус человека B (RSV B)	12/12	100	73.54~100.0
Вирус гриппа B (Flu B)	2/2	100	15.81~100.0
Вирус гриппа A человека подтипа H3 (Flu A-H3)	12/12	100	73.54~100.0

Аналит	Специфичность (по сравнению с эталонным анализом)		
	TN/ (TN+FP)	%[b)]	95% CI[c)]
Человеческий респираторно-синцитиальный вирус A (RSV A)	33/33	100	89.42~100.0
Вирус гриппа A (грипп A)	24/24	100	85.75~100.0
Респираторно-синцитиальный вирус человека B (RSV B)	26/26	100	86.77~100.0
Вирус гриппа B (Flu B)	36/36	100	90.26~100.0
Вирус гриппа A человека подтипа H1pdm09 (Flu A- H1pdm09)	38/38	100	90.75~100.0
Вирус гриппа A человека подтипа H1 (Flu A-H1)	38/38	100	90.75~100.0
Вирус гриппа A человека подтипа H3 (Flu A-H3)	26/26	100	86.77~100.0

a) Восприимчивость: 100 X TP/(TP+FN)

b) Специфичность: 100 X TN/(FP+TN)

c) Были рассчитаны двусторонние 95% допустимые отклонения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. J. Easton, J. B. Domachowske, and H. F. Rosenberg. [Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis.] Clinical Microbiology Reviews. (2004) 17: 390-412
2. C. E. Corless, M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, E. B. Kaczmarski, and A. J. Fox. [Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR.] Journal of Clinical Microbiology. (2000) 38: 1747-1752
3. D. H. Lee. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 5-10
4. H. K. Chang, J. H. Park, M. S. Song, T. K. Oh, S. Y. Kim, C. J. Kim, H. Kim, M. H. Sung, H. S. Han, Y. S. Hahn, and Y. K. Choi. [Development of multiplex rt-PCR assays for rapid detection and subtyping of influenza type A viruses from clinical specimens.] Journal of Microbiology and Biotechnology. (2008) 18(6): 1164-9
5. J. Y. Chun. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin. (2012) 1: 1-4
6. J. Y. Chun, K. J. Kim, I. T. Hwang, Y. J. Kim, D. H. Lee, I. K. Lee, and J. K. Kim. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Research. (2007) 35: e40
7. K. Suwannakarn, S. Payungporn, T. Chieochansin, R. Samransamruajkit, A. Amonsin, T. Songserm, A. Chaisingh, P. Chamnanpood, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, and Y. Poovorawan. [Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays.] Journal of Virological Methods. (2008) 152(1-2): 25-31
8. M. Hindiyeh, V. Levy, R. Azar, N. Varsano, L. Regev, Y. Shalev, Z. Grossman, and E. Mendelson. [Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001-2002 influenza season in Israel.] Journal of Clinical Microbiology. (2005) 43: 589- 595
9. M. T. Coiras, J. C. Aguilar, M. L. Garcia, I. Casas, and P. Perez-Brena. [Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays.] Journal of Medical Virology. (2004) 72: 484-495
10. M. T. Coiras, P. Perez-Brena, M. L. Garcia, and I. Casas. [Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assays.] Journal of Medical Virology. (2003) 69: 132-144
11. M. W. Syrmis, D. M. Whiley, M. Thomas, I. M. Mackay, J. Williamson, D. J. Siebert, M. D. Nissen, and T. P. Sloots. [A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples.] Journal of Diagnostics. (2004) 6: 125-131

12. P. Boonsuk, S. Payungporn, T. Chieochansin, R. Samransamruajkit, A. Amonsin, T. Songserm, A. Chaisingh, P. Chamnanpood, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, and Y. Poovorawan. [Detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, and H5) by multiplex polymerase chain reaction.] The Tohoku Journal of Experimental Medicine. (2008) 215(3): 247-55
13. S. Bellau-Pujol, A. Vabret, L. Legrand, J. Dina, S. Gouarin, J. Petitjean-Lecherbonnier, B. Pozzetto, C. Ginevra, and F. Freymuth. [Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses.] Journal of Virological Methods. (2005) 126: 53-63
14. Y. J. Lee, D. Y. Kim, K. H. Lee, and J. Y. Chun. [Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR.] Scientific Reports. (2014) 4: 1-6
15. Y. Jinno, K. Yoshiura, and N. Niikawa. [Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR.] Nucleic Acids Research. (1990) 18: 6739
16. Medimmune progresses development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type-3 vaccines.*Pharmaceutical News*, Oct 13, 2004
17. Respiratory syncytial virus. *Microbiology and Bacteriology*, Aug 6, 2000

СПИСОК СИМВОЛОВ

Список символов, используемых в руководстве и на этикетках

Символ	Пояснение
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии
REF	Номер по каталогу
	Срок годности
	Верхний предел температуры
PRIMER	Олигонуклеотидная смесь для амплификации и детекции
ENZYME	Ферментная смесь
BUFFER	Буфер
WATER	Вода, не содержащая РНК
CONTROL +	Положительный контроль (ПК)
CONTROL IC	Внутренний контроль (ВК)
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Производитель
	Дата изготовления
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Внимание
	Содержит достаточное количество <n> тестов
UDI	Уникальный идентификатор устройства
rxns	Штрих-код реакции для автоматизированной системы экстракции

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Продукт	Размер
Серия AllplexTM		
RP9702Y	**Allplex™ Respiratory Panel 1A**	50 rxns
RP9702X	**Allplex™ Respiratory Panel 1A**	**100 rxns**
RP10231Z	**Allplex™ Respiratory Panel 1A**	**25 rxns**
RP9801Y	**Allplex™ Respiratory Panel 1**	50 rxns
RP9801X	**Allplex™ Respiratory Panel 1**	100 rxns
RP10179Z	**Allplex™ Respiratory Panel 1**	25 rxns
RP9802Y	**Allplex™ Respiratory Panel 2**	50 rxns
RP9802X	**Allplex™ Respiratory Panel 2**	100 rxns
RP10180Z	**Allplex™ Respiratory Panel 2**	25 rxns
RP9601Y	**Allplex™ Respiratory Panel 3**	50 rxns
RP9601X	**Allplex™ Respiratory Panel 3**	100 rxns
RP10181Z	**Allplex™ Respiratory Panel 3**	25 rxns
RP9803Y	**Allplex™ Respiratory Panel 4**	50 rxns
RP9803X	**Allplex™ Respiratory Panel 4**	100 rxns
RP10182Z	**Allplex™ Respiratory Panel 4**	25 rxns
PB10175Y	**Allplex™** PneumoBacter Assay	50 rxns
PB10176X	**Allplex™** PneumoBacter Assay	100 rxns
PB10185Z	**Allplex™** PneumoBacter Assay	25 rxns
RV9750Y	**Allplex™** RV Essential Assay	50 rxns
RV9750X	**Allplex™** RV Essential Assay	100 rxns

Серия AnyplexTM

RV7G01Y	**Allplex™** II RV16 Detection (V1.1)	50 rxns
RV7G01X	**Allplex™** II RV16 Detection (V1.1)	100 rxns
RB7500Y	**Allplex™** II RB5 Detection	50 rxns
RB7500X	**Allplex™** II RB5 Detection	100 rxns
RV7201Y	**Allplex™** MERS-CoV (upE& orf1a) Детекция в режиме реального времени	50 rxns
RV7201X	**Allplex™** MERS-CoV (upE& orf1a) Детекция в режиме реального времени	100 rxns
RV7310X	**Allplex™** FluA/B Typing Real-time Detection (V1.1)	100 rxns

Дополнительный продукт

SG1701	Ribo_spin vRD (Набор для выделения вирусной РНК/ДНК)	50 заготовок

Автоматизированные системы извлечения

65415-02	Микролаборатория NIMBUS IVD	EA
173000-075	Микролаборатория STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
SG72100	AIOS	EA
744300.4.UC384	Универсальный комплект картриджей STARMag 96 X 4	384T / 1
EX00013C	Набор STARMag 96 X 4 вирусная ДНК/РНК 200 C	384T / 1
EX00031C	Набор STARMag™ N/S	384T / 1
SG71101	Seegene STARlet 96MPH (для 96-головки)	EA
EX00032P	Набор STARMag™ S96H	48T / 1
EX00033P	Набор STARMag™ S96H	480T / 1
EX00034P	Набор STARMag™ S96H	96T / 1
EX00035P	Набор STARMag™ S96H	960T / 1
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T / 1
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T / 1
EX00017P	STARMag 96 ProPrep C (Plate Type)	96T / 1

EX00017T	STARMag 96 ProPrep C (Tube Type)	96T / 1 коробка
EX00028P	Набор STARMag™ SP32 (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00028T	Набор STARMag™ SP32 (Tube Type)	96T / 1 коробка
M9600	MaelstromTM 9600	EA
EX00029P	Набор STARMag™ M96	96T / 1 коробка
EX00030P	Набор STARMag™ M96	960T / 1 коробка

Только для профессионального использования

Allplex™

HPV HR Detection

(Кат. № HP10370X/HP10376L, HP10371Z)

Allplex™ PCR System для выявления вируса папилломы человека - 14 типов ВПЧ высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) из образцов шейки матки и самостоятельно собранных вагинальных образцов.

Для использования с

1. **CFX96™ Система обнаружения ПЦР в реальном времени (программное обеспечение CFX Manager™-IVD v1.6)**
2. **Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)**

CE

IVD **Только для диагностики *in vitro***

REF **HP10370X** Σ 100 REF **HP10371Z** Σ 25

REF **HP10376L** Σ **100 x 8 kits**

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548

EC REP **Медицинские технологии Promedt Consulting GmbH Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Германия**

Не доступно в США.

СОДЕРЖАНИЕ

УВЕДОМЛЕНИЯ **3**

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР **6**

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ **7**

РЕАГЕНТЫ **8**

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА **10**

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ **10**

ПРОТОКОЛ **11**

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ **20**

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ **43**

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ **45**

ССЫЛКИ **53**

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ **54**

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА **55**

УВЕДОМЛЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Allplex™ HPV HR Detection должен выполнять квалифицированный, обученный персонал.
- Если этот продукт используется с **Microlab NIMBUS IVD**, **Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH**, он обеспечивает максимум 5 отдельных запусков.
- **Этот тест был валидирован для следующих типов образцов: образцы шейки матки и самостоятельно собранные вагинальные образцы**. Данный тест не был валидирован для других типов образцов.
- **Храните образцы ДНК при температуре -20℃ до использования, а во время работы - на льду.**
- Чувствительность анализа может снизиться, если образцы неоднократно замораживались/размораживались или хранились в течение длительного периода времени.
- Рабочий процесс в лаборатории должен быть однонаправленным.
- Надежность результатов зависит от правильности процедуры сбора, транспортировки, хранения и обработки образцов.
- Надевайте одноразовые перчатки и меняйте их перед входом в разные зоны. В случае загрязнения немедленно смените перчатки или обработайте их реагентом для обеззараживания ДНК.
- Принадлежности и оборудование должны быть закреплены за рабочими зонами и не должны перемещаться из одной зоны в другую.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих зонах лаборатории. При работе с образцами и реагентами надевайте одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты и средства защиты глаз. Мойте руки тщательно обрабатывайте образцы и реактивы для испытаний.
- Избегайте загрязнения реагентов при извлечении аликвот из пробирок с реагентами. Рекомендуется использовать стерильные одноразовые наконечники для пипеток.
- Не объединяйте реагенты из разных партий.
- Не используйте продукт после истечения годности.
- Не используйте все одноразовые предметы повторно.
- Используйте пробирки с завинчивающимися крышками и предотвращайте возможное разбрызгивание или перекрестное загрязнение образцов во время подготовки.
- Для предотвращения загрязнения реагентов рекомендуется использовать фильтрующие насадки.

  Кроме того, будьте осторожны, чтобы не загрязнить реактивы с выделенными нуклеиновыми кислотами, продуктами ПЦР и положительными контролями.
- Используйте отдельные рабочие зоны для каждого эксперимента.
- Во избежание загрязнения рабочих зон амплифицированными продуктами открывайте пробирки

или стрипы для ПЦР-реакции только в специально отведенных рабочих зонах после окончания амплификации.

- Храните положительные материалы отдельно от реагентов набора.
- При работе с образцами необходимо правила лабораторной безопасности (см. раздел «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях» и документы CLSI). Тщательно очистите и продезинфицируйте все рабочие поверхности с помощью 0,5% гипохлорита натрия (в деионизированной или дистиллированной воде). Компоненты продукта (остатки продукта, упаковка) могут рассматриваться как лабораторные отходы. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с действующими федеральными, государственными и местными нормами.
- Срок годности составляет 13 месяцев при температуре ≤ -20℃ с даты изготовления. Срок годности указан на последней этикетке.
- Seegene NIMBUS и Seegene STARlet - это то же самое оборудование, что и Microlab NIMBUS IVD и Microlab STARlet IVD, отличается только производитель. Поскольку аппаратные изменения в приборе отсутствуют, результаты тестирования одинаковы.
- Фирменное наименование «CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD» изменено на «CFX96 Система ™ Dx». Поскольку аппаратные изменения в системах отсутствуют, ожидается, что обе системы дадут одинаковые результаты.
- «CFX Manager TM Dx Software v3.1» является обновленной версией "CFX Manager TM Software IVD v1.6". Обновленное программное обеспечение включает улучшения в меню "Запуск". Эти улучшения не влияют на результаты анализа данных; следовательно, результаты из двух программного обеспечения идентичны..
- Этот набор предназначен для дифференциальной диагностики инфекций, вызванных патогенами-мишенями; человек папилломавирусы.
- Самостоятельный сбор должен проводиться в медицинском учреждении по указанию медицинского работника.
- **AIOS** сочетает в себе Seegene STARlet, продаваемый компанией Seegene, с оборудованием для ПЦР в реальном времени (CFX96 Dx, производитель: Bio-Rad) и герметизатор пластин (производитель: SAMICK THK) для формирования автоматизированной структуры связи между выделением нуклеиновых кислот и ПЦР.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Allplex™ HPV HR Detection — это качественный молекулярно-диагностический анализ *in vitro*, предназначенный для выявления вирусов папилломы человека в образцах шейки матки или самостоятельно собранных вагинальных образцах. Allplex™ HPV HR Detection выявляет HPV16, HPV18 и другие типы ВПЧ высокого риска (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68).

Обнаружение вируса папилломы человека Allplex™ HPV HR Detection показано:

a) Используется вместе с цитологией шейки матки для дополнительного скрининга на наличие или отсутствие ВПЧ16, ВПЧ18 и других 12 отдельных типов ВПЧ высокого риска (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68).

b) Используется в качестве первичного скринингового теста для выявления женщин с повышенным риском развития рака шейки матки или наличия заболевания высокой степени тяжести.

c) Используется в качестве первичного скринингового теста для оценки наличия или отсутствия ВПЧ16, ВПЧ18 и других 12 отдельных типов ВПЧ высокого риска (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68).

Результаты Allplex™ HPV HR Detection вместе с оценкой врачом цитологического анамнеза, других факторов риска и профессиональными рекомендациями могут быть использованы для ведения пациента.

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР

1. Принципы

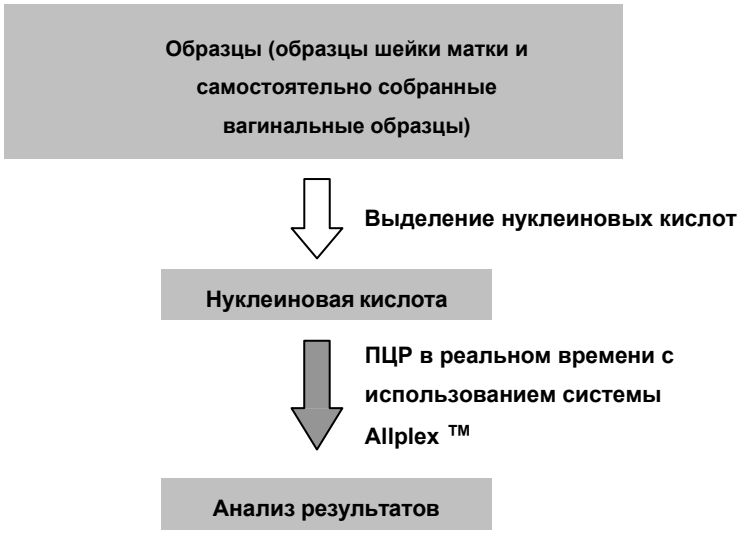
Allplex™ HPV HR Detection - это мультиплексный анализ ПЦР в реальном времени, позволяющий одновременно амплифицировать и обнаруживать целевые нуклеиновые кислоты 14 типов ВПЧ высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), а также внутренний контроль (ВК).

Для проведения мультиплексной амплификации и детекции мишеней в одной реакции в этом наборе используются инновационные запатентованные технологии DPO™, TOCE™, MuDT™ и 3 Ct компании Seegene. Технология 3 Ct позволяет получить значение Ct для трех целей в одном канале без ущерба для чувствительности и специфичности. Присутствие определенных генных последовательностей в реакции отображается в виде значения Ct с помощью аналитического программного обеспечения Seegene Viewer.

В ПЦР эффективность амплификации может быть снижена из-за ингибиторов, которые могут присутствовать в клинических образцах. Внутренний контроль (ВК) включается в продукт в качестве эндогенного контроля всего процесса для мониторинга выделения нуклеиновых кислот и проверки возможного ингибирования ПЦР. IC коамплифицируется с целевыми нуклеиновыми кислотами в клинических образцах. Allplex™ HPV HR Detection использует ген домашнего хозяйства человека в качестве эндогенного ИС, который может обеспечить выделение ДНК, проверку реакции ПЦР и уточнение адекватности клеток из каждого образца.

Для того чтобы продукт амплификации не выступал в качестве потенциального загрязнителя, в системе Allplex™ HPV HR Detection используется система Uracil-DNA glycosylase (UDG)-dUTP. Система UDG-dUTP обычно используется при проведении ПЦР для устранения переноса ампликонов с помощью UDG для удаления остатков урацила из ДНК путем расщепления N-гликозильной связи.

2. Обзор процедур



СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) связано с раком шейки матки. ВПЧ можно разделить на группы «высокого риска (ВР)» и «низкого риска (НР)» на основании их связи с поражением шейки матки. Поэтому очень важно знать, каким типом ВПЧ инфицирована пациентка, чтобы предотвратить развитие рака и передачу заболевания. В настоящее время основные коммерческие продукты для диагностики ВПЧ основаны на методе зондовой гибридизации для выявления и/или генотипирования ВПЧ. Однако основным недостатком методов, основанных на гибридизации зондов, является высокий процент ложноположительных результатов из-за перекрестной реактивности между зондами и различными видами вирусной ДНК или ПЦР-ампликонами, используемыми для гибридизации. Здесь мы представляем инновационную систему обнаружения/генотипирования ВПЧ, которая амплифицирует только специфические мишени без перекрестной реактивности и автоматизирована в обнаружении методом ПЦР в реальном времени. Продукт специфически выявляет только истинные ВПЧ и точно генотипирует их. Он также содержит эндогенный внутренний контроль (ЭВК) для проверки любого ингибирования, которое может произойти во время ПЦР-реакции.

Рак шейки матки, который прогрессирует от предраковой стадии до инвазивного рака, имеет 7-20 лет предраковой стадии; следовательно, ранняя диагностика возможна при подозрении на ВПЧ-инфекцию. Группа ВПЧ высокого риска может привести к развитию рака шейки матки; в частности, ВПЧ16 и 18 ассоциируются с 70% случаев рака шейки матки. С другой стороны, группа ВПЧ низкого риска, включая ВПЧ6 и 11, может вызывать генитальные бородавки. Allplex™ HPV HR Detection может выявляет 14 типов ВПЧ высокого риска, включая ВПЧ16 и 18.

РЕАГЕНТЫ

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 100 реакций.

Информация для заказа (REF HP10370X/HP10376L*).

* HP10376L - упаковка, содержащая 8 наборов HP10370X (100 реакций).

Allplex™ HPV HR Detection			
Символы	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	ВПЧ HR MOM	500 мкл	Олиго микс: - Реагенты для амплификации и детекции
ENZYME	EM4	500 мкл	- ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (UDG) - Буфер, содержащий dNTPs
BUFFER	Буфер EM4	500 мкл	Буфер для ПЦР в реальном времени - Буфер, содержащий BSA и глицерин
CONTROL +	Allplex HPV HR PC1	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV HR PC2	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV HR PC3	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для анализа
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 25 реакций.

Информация для заказа (REF HP10371Z).

Allplex™ HPV HR Detection			
Символы	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	ВПЧ HR MOM	125 мкл	Олиго микс: - Реагенты для амплификации и детекции
ENZYME	EM4	125 мкл	- ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (UDG) - Буфер, содержащий dNTPs
BUFFER	Буфер EM4	125 мкл	Буфер для ПЦР в реальном времени - Буфер, содержащий BSA и глицерин
CONTROL +	Allplex HPV HR PC1	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV HR PC2	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV HR PC3	50 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл	Сверхчистое качество, ПЦР-класс
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для анализа
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА

Все компоненты Allplex™ HPV HR Detection следует хранить ≤-20℃ . Все компоненты стабильны при рекомендуемых условиях хранения до истечения срока годности, указанного на этикетке.
На работоспособность компонентов набора не влияет 5-кратное замораживание и оттаивание. Если реагенты будут использоваться только периодически, их следует замораживать в аликвотах.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые неопудренные перчатки (латексные или нитриловые)
- Пипетки (регулируемые) и стерильные наконечники для пипеток
- Микроцентрифужная пробирка объемом 1,5 мл
- Набор для выделения нуклеиновых кислот (см. Выделение нуклеиновых кислот)
- Льдогенератор
- Настольная центрифуга
- Вихревой смеситель
- CFX96TM Система детекции ПЦР в реальном времени (Bio-Rad)
- CFX96TM Dx System (Bio-Rad)
- Оптические плоские полоски на 8 колпачков (кат. номер TCS0803, Bio-Rad)
- Низкопрофильные стрипы на 8 пробирок объемом 0,2 мл без крышек (белый цвет, кат. номер TLS0851, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые (кат. № HSP9655, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые, со штрих-кодом (кат. № HSP9955, Bio-Rad)
- Система управления крышкой флакона (кат. № 6600532-01, Hamilton)
- AIOS (кат. номер SG72100, Seegene)
- Прокалываемый колпачок (кат. № 922119, SPL) (только для использования в AIOS)
- Постоянная прозрачная термозапечатка (кат. № 1814035, Bio-Rad)*.
- Герметизатор для ПЦР-пластин PX1 (автоматический герметик, кат. № 181-4000, Bio-Rad)*.
- Чистое место

* Убедитесь, что вы используете термозапайку и запайщик пластин, перечисленные выше, вместе.

ПРОТОКОЛ

1. Сбор, хранение и транспортировка образцов

Примечание: Все образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы. Разрешается использовать только те образцы, при сборе, хранении и транспортировке которых строго соблюдаются следующие правила и инструкции:

Образец шейки матки
Самостоятельно собранный вагинальный образец

Примечание: Чтобы обеспечить высокое качество образцов, их следует транспортировать как быстрее. Образцы должны транспортироваться при указанных температурных условиях.

A. Сбор образцов

Образец шейки матки

- Образцы шейки матки можно собирать и транспортировать в следующих средах:
- - eNATTM (COPAN, Италия), ThinPrep® (HOLOGIC, США), SurePathTM (Becton-Dickinson, США) или CellPreserv (Kolplast, Бразилия)

Набор для сбора образцов из шейки матки	Производитель	Кат. №
eNAT PM 2ML L-ОБРАЗНЫЙ АППЛИКАТОР	COPAN	606CS01L

- Оставьте мазок в транспортирующей среде. Закройте и промаркируйте контейнер с образцом. Строго соблюдайте инструкции по хранению и транспортировке.
- Следуйте рекомендованному протоколу для сбора клеток столбчатого и сквамозного эпителия после удаления цервикальной слизи.

Самостоятельно собранный вагинальный образец

- Для сбора вагинального образца, собранного самостоятельно, пожалуйста, используйте следующий материал:
  - Rovers® Evalyn® Brush (Rovers Medical Devices B.V., Нидерланды)

Устройство для самостоятельного взятия проб	Производитель	Кат. №
Кисть Rovers® Evalyn®	Rovers Medical Devices B.V.	380500131

- Самостоятельно собранный вагинальный образец можно собрать и хранить в растворе ThinPrep® PreservCyt .®
- Следуйте инструкциям производителя устройства для взятия проб и транспортной среды для сбора и хранения образцов клеток влагалища.

B. Хранение и транспортировка

		Продолжительность хранения и транспортировки*	
		2~8 **℃	Комнатная температура**
Образец шейки матки	eNATTM	90 дней	90 дней
	ThinPrep®	90 дней	90 дней
	SurePathTM	90 дней	90 дней
	CellPreserv	90 дней	90 дней
Самостоятельно собранный вагинальный образец	ThinPrep®	90 дней	90 дней

* Продолжительность: Образец, собранный в период до испытания, включая хранение и транспортировку образца до испытания.

** Оптимальная температура для транспортировки составляет 2~25℃.

Примечание: Длительное хранение образцов может повлиять на производительность.

Примечание: Образцы также должны соответствовать местным и национальным инструкциям по транспортировке патогенного материала.

2. Выделение нуклеиновых кислот

Различные производители предлагают наборы для выделения нуклеиновых кислот. Используйте необходимое количество образца в соответствии с используемым протоколом. Следующие наборы для экстракции были одобрены для использования с данным набором.

[Методы экстракции в различных средах].

Примечание: пожалуйста, используйте автоматическую систему экстракции в соответствии со средой, указанной в следующей таблице.

Образец	Транспорт СМИ	Автоматизированная система извлечения			
		Microlab NIMBUS IVD /STARlet IVD Универсальный комплект картриджей	Seegene NIMBUS / STARlet Универсаль комплект картриджей	SEEPREP32 STARMag 96 ProPrep	STARlet 96MPH STARMag™ S96H Набор*
Образец шейки матки	eNAT	O	O	O	O
	ThinPrep®	O	O	O	O
	SurePath™	O	O	X	O
	CellPreserv	O	O	O	O
Самостоятельный сбор вагинальный образец	ThinPrep®	O	O	O	O

Дополнительно: Система управления крышками флаконов может использоваться с Microlab STARlet IVD и Seegene STARlet.

Дополнительно: AIOS можно использовать с Seegene STARlet.

Набор *STARMagT^{M} S96H N Kit разработан и валидирован для использования с конфигурацией Seegene STARlet с головкой для зонда CO-RE 96 и Seegene STARlet .

A. Предварительная обработка ThinPrep® и SurePath™

- Уравновесьте образцы до комнатной температуры (19~25℃).
- Центрифугируйте 1 мл образца в течение 15 минут при 15 000 x *g* (13 000 об/мин).
- Супернатант необходимо удалить. После этого рекомендованный объем (200~300 мкл, см. Рекомендуемый объем 2-C) следует ресуспендировать в лизирующем буфере или 1X PBS, тщательно перемешивая с помощью вортексера для повторного растворения.

Примечание: Выполните этап предварительной обработки с использованием 1X PBS, если образцы собраны в среде ThinPrep .®

Примечание: если образцы собраны в среде SurePathTM, выполните этап предварительной обработки с использованием лизирующего буфера из набора для экстракции.

Примечание: Среды ThinPrep® и SurePathTM можно обрабатывать без предварительной обработки при использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet или Seegene STARlet. 96 MPH

Примечание: CellPreserv и eNAT не требуют предварительной обработки.

B. Подготовка образцов

- Доведите образцы до комнатной температуры (19~25℃)
- Для образцов шейки матки и самостоятельно собранных вагинальных образцов, содержащих тампон/щеточку в транспортной среде, образцы следует перемешать путем встряхивания.
- Крышки с пробирок с образцами следует осторожно снимать, чтобы избежать загрязнения. Любую лишнюю слизь в образце следует удалить в это время, собрав ее на тампон/щеточку. Любую остаточную жидкость из слизи и тампона/щеточки затем следует выдавить, прижав тампон/щеточку к стенке пробирки. Наконец, тампон/щеточку и слизь следует удалить и выбросить.
- Образцы из раствора eNAT можно обрабатывать непосредственно из их первичного контейнера.

C. Автоматизированная система выделения нуклеиновых кислот

Примечание: пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. Для других объемов см. протокол производителя.

C-1. Microlab NIMBUS IVD

Примечание: См. руководство по эксплуатации Microlab NIMBUS IVD.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый том.
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
STARMag 96 X 4 Универсальный комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

C-2. Микролаборатория STARlet IVD

Опция: Система предварительного анализа (см. эксплуатации системы управления крышками флаконов)

Автоматизированная система предварительного анализа	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый том.
Система управления крышками флаконов	Hamilton	6600532-01*	-

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

ПРИМЕЧАНИЕ: Система управления крышками флаконов может использоваться с ThinPrep® и CellPreserv.

Примечание: См. руководство по эксплуатации **Microlab STARlet IVD.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый том.
Микролаборатория STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
STARMag 96 X 4 Универсальный комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

C-3. Seegene NIMBUS

Примечание: См. руководство по эксплуатации **Seegene NIMBUS.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Универсальный набор картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

C-4. Seegene STARlet

Опция: Система предварительного анализа (см. эксплуатации системы управления крышками флаконов)

Автоматизированная система предварительного анализа	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Система управления крышками флаконов	Hamilton	6600532-01*	-

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc.

ПРИМЕЧАНИЕ: Система управления крышками флаконов может использоваться с ThinPrep® и CellPreserv.

Опция: Автоматизированная структура связей (см. эксплуатации AIOS)

Автоматизированная структура связей	Производитель	Кат. №.
AIOS	Seegene	SG72100*

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

ПРИМЕЧАНИЕ: замените колпачок положительного контроля (PC) на колпачок с возможностью прокалывания. После завершения операции замените колпачок положительного контроля (PC) на оригинальный колпачок.

ПРИМЕЧАНИЕ: Прокалываемый колпачок является одноразовым изделием и подлежит утилизации после одного использования.

ПРИМЕЧАНИЕ: если этот продукт используется с AIOS, применяемым Seegene STARlet, он обеспечивает максимум 3 отдельных прогона.

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene STARlet.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый том.
Seegene	Seegene	67930-03	
Универсальный набор картриджей STARMag 96 X 4	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 Элюирование: 100 мкл
Комплект STARMag™ S96H N*	Seegene	EX00036P EX00037P	Образец: 300 Элюирование: 100

* Набор STARMag™ S96H N разработан и валидирован для использования с конфигурацией Seegene STARlet с головкой CO-RE 96 Probe Head и Seegene STARlet 96MPH.

C-5. SEEPREP32

Примечание: Продолжайте процесс извлечения, используя **« Протокол A «.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	Seegene	EX00009P	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	Seegene	EX00009T	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

C-6. Seegene STARlet 96MPH

Примечание: См. руководство по эксплуатации **Seegene STARlet 96MPH**.

Примечание: Seegene STARlet 96MPH применим только к HP10370X.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый.обьем.
Seegene STARlet 96MPH	Seegene	SG71101	-
Набор STARMagTM S96H N	Seegene	EX00036P EX00037P	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

3. Подготовка к ПЦР в реальном времени

Примечание: при использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH для выполнения этого шага обратитесь к руководству по эксплуатации каждого прибора.

Примечание: необходимо использовать правильные пробирки и колпачки (см. раздел МАТЕРИАЛЫ ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ).

Примечание: при подготовке образцов необходимо использовать аэрозолеустойчивые фильтрующие наконечники и плотные перчатки. Будьте предельно осторожны, чтобы исключить перекрестное загрязнение.

Примечание: полностью разморозьте реагенты на льду.

Примечание: прокрутите пробирки с реагентами, чтобы удалить капли с внутренней крышки.

Примечание: **Этапы A~D выполняются автоматически в приборах Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS, Seegene STARlet и Seegene STARlet 96MPH. Обратитесь к руководству по эксплуатации каждого прибора.**

A. Приготовьте мастер-микс для ПЦР.

5 мкл	ВПЧ HR MOM
5 мкл	EM4
5 мкл	Буфер EM4
15 мкл	Общий объем ПЦР-мастермикса

Примечание: Рассчитайте необходимое количество каждого реагента в зависимости от количества реакций (образцы + контроль).

B. Перемешайте 5 раз инвертированием или быстрым вихревым движением и ненадолго прокрутите пробирки.

C. Аликвотируйте 15 мкл ПЦР-мастермикса в пробирки для ПЦР.

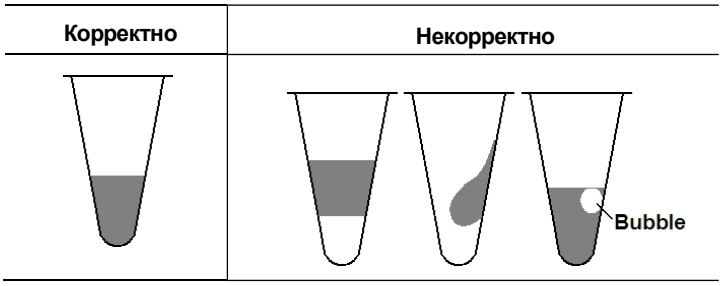
D. Добавьте 5 мкл нуклеиновых кислот каждого образца в пробирку с мастермиксом для ПЦР.

15 мкл	Мастермикс для ПЦР
5 мкл	Нуклеиновая кислота
образца 20 мкл реакции	Общий объем

E. Закройте и ненадолго прокрутите пробирки для ПЦР.

F. Убедитесь, что жидкость, содержащая все компоненты ПЦР, находится на дне каждой пробирки для ПЦР. Если это не так, повторите отжим при более высокой скорости вращения в течение более длительного времени.

Примечание: перед проведением ПЦР рекомендуется прокрутить пробирки, чтобы удалить пузырьки воздуха и собрать остатки жидкости на дне пробирок.



Bubble	Пузыри воздуха

Примечание: для каждого образца используйте новый стерильный наконечник пипетки.

Примечание: для **отрицательного контроля (ОК)** вместо нуклеиновой образца используйте 5 мкл «**воды, свободной от РНК»**.

Примечание: для **положительного контроля (ПК)** используйте 5 мкл «**Allplex HPV HR PC1»,** «**Allplex HPV HR PC2» и «Allplex HPV HR PC3»** вместо нуклеиновой кислоты образца.

Примечание: Будьте осторожны, чтобы не допустить перекрестного загрязнения мастер-миксов для реакций и образцов положительным контролем.

Примечание: не маркируйте реакционную пробирку на ее крышке. Флуоресценция обнаруживается в верхней части каждой реакционной пробирки.

- **Положительный контроль**

В набор входят 3 пробирки с положительным контролем: Allplex HPV HR PC1, PC2 и PC3. Каждый ПК включает клоны для 5 мишеней (14 типов высокого риска и ЭВК).

Примечание: чтобы провести реакцию положительного контроля, подготовьте 3 пробирки для ПЦР. (См. результаты ниже).

Положительный контроль

Наименование	FAM			HEX			CalRed 610			Quasar 670			Quasar 705			Автоматическая интерпретация
										IC						
P C 1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Положительный контроль (+)
P C 2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Положительный контроль (+)
P C 3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Положительный контроль (+)

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

1. CFX96™ Система детекции ПЦР в реальном времени (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) может быть разделена на 3 этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск эксперимента.

A. Настройка протокола

1) В главном меню выберите **File→ New →Protocol (Файл→ Новый →Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор протоколов)**.

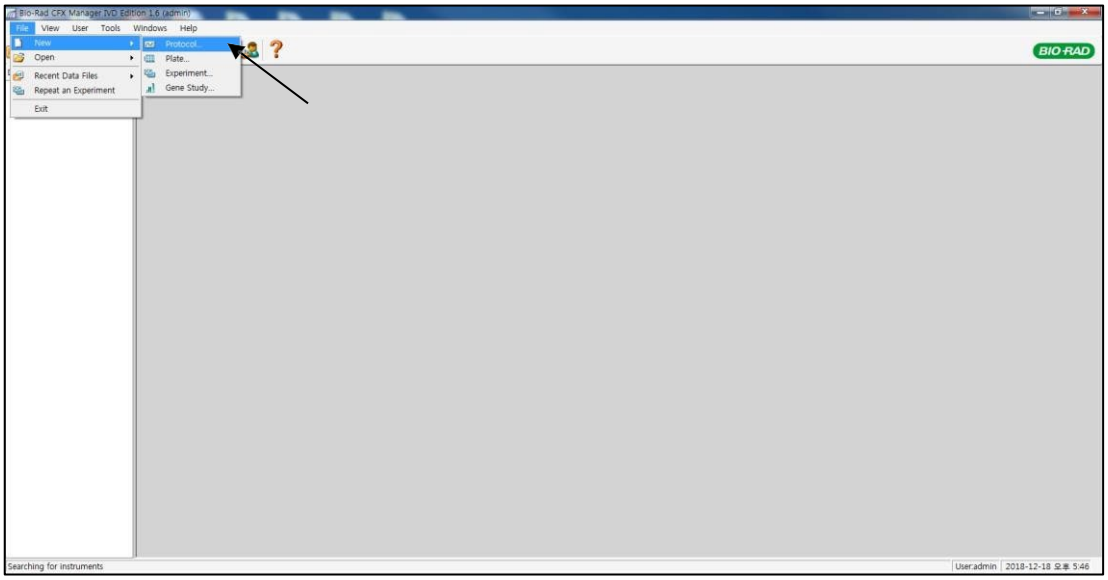


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **Protocol Editor (Редакторе протоколов)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	95 C°	15 мин
2	45	95 C°	3 сек
3*		60 C°	10 сек
4*		72 C°	10 сек
5*		83 C°	5 сек

Примечание*: Считывание планшета на шаге 3, 4 и 5. Флуоресценция определяется при 60°C, 72°C и 83°C.

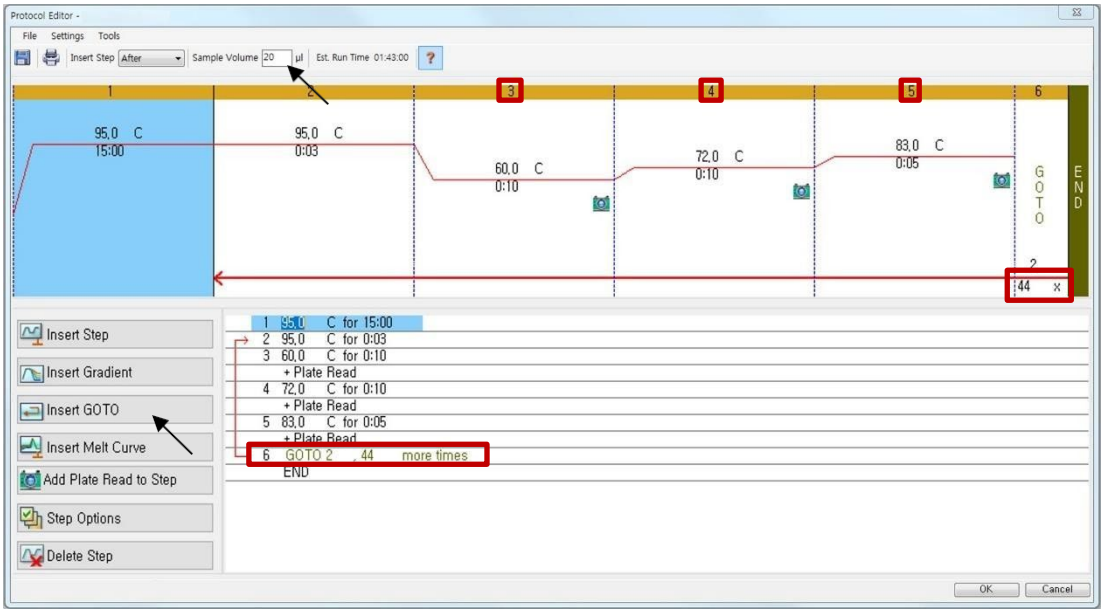


Рис. 2. **Редактор протоколов**

Примечание: Нажмите кнопку **«Insert GOTO» («Вставить GOTO»)** и введите «**GOTO 2, еще 44 раза**» на шаге 6.

3) Нажмите на поле рядом с **«Sample Volume» («Объем образца»)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл

4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **«Experiment Setup» («Настройка эксперимента»)**.

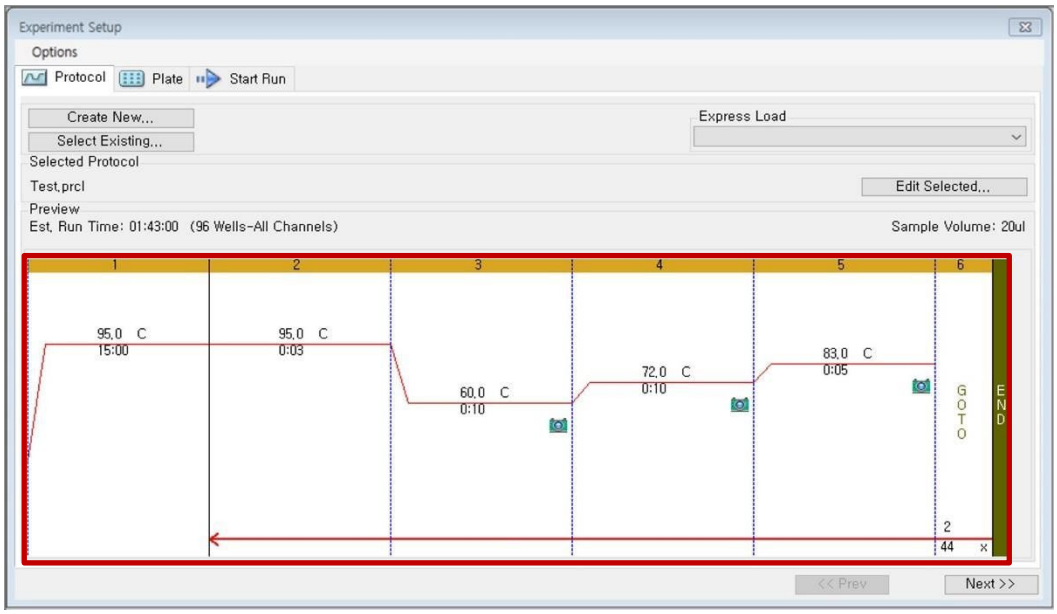


Рис. 3. **Настройка эксперимента: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **«Plate» («Планшет»)** в «Experiment Setup» («Настройка **эксперимента»)** нажмите «Create New» (**«Создать новый»**), чтобы открыть окно **«Plate Editor» (« Редактор планшета»).**

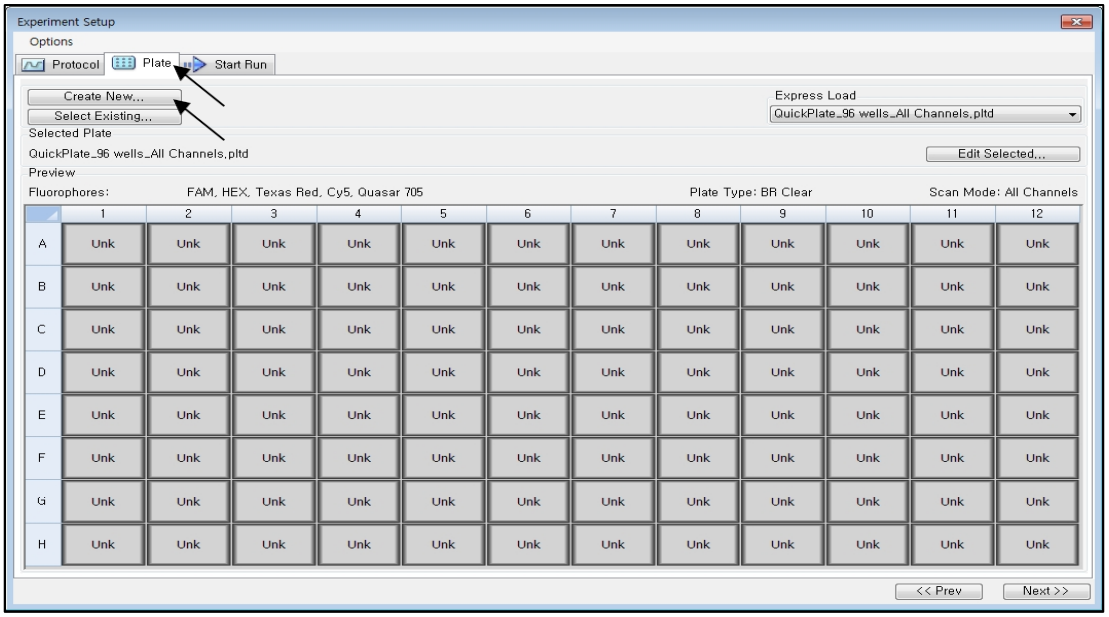


Рис. 4. **Редактор планшета**

2) Нажмите кнопку **«Select Fluorophores» («Выбрать флуорофоры»),** чтобы указать флуорофоры (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705**), которые будут использоваться, и нажмите «ОК».

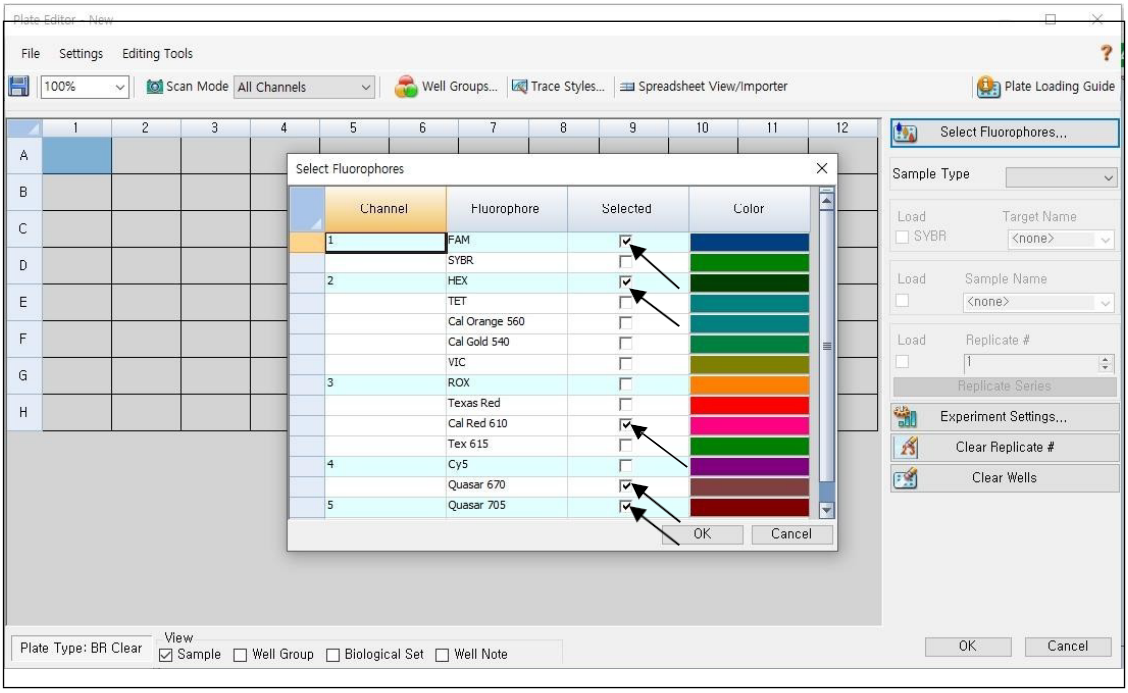


Рис. 5. **Выбор флуорофоров** ***(FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705)***

3) Выберите лунки, в которые будет помещена ПЦР-пробирка, и выберите тип образца из списка Раскрывающегося меню **«Sample Type» («Тип пробы»)**.

- ***Неизвестный***: Клинические образцы
- ***Отрицательный контроль***
- ***Положительный контроль***

4) Нажмите на соответствующие флажки (***FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705***). чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

5) Введите **«Sample Name» («Имя Образца»)** и **PC (PC1, PC2** и **PC3)**, а затем нажмите клавишу ввода.

6) В разделе «Settings» («**Настройки**») главного меню **«Plate Editor» («Редактора планшетов»)** выберите **«Plate Size (96 wells)» («Размер планшета» (96 лунок)** и **«Plate Type (BR White)» («Тип Планшета» (BR белый).**

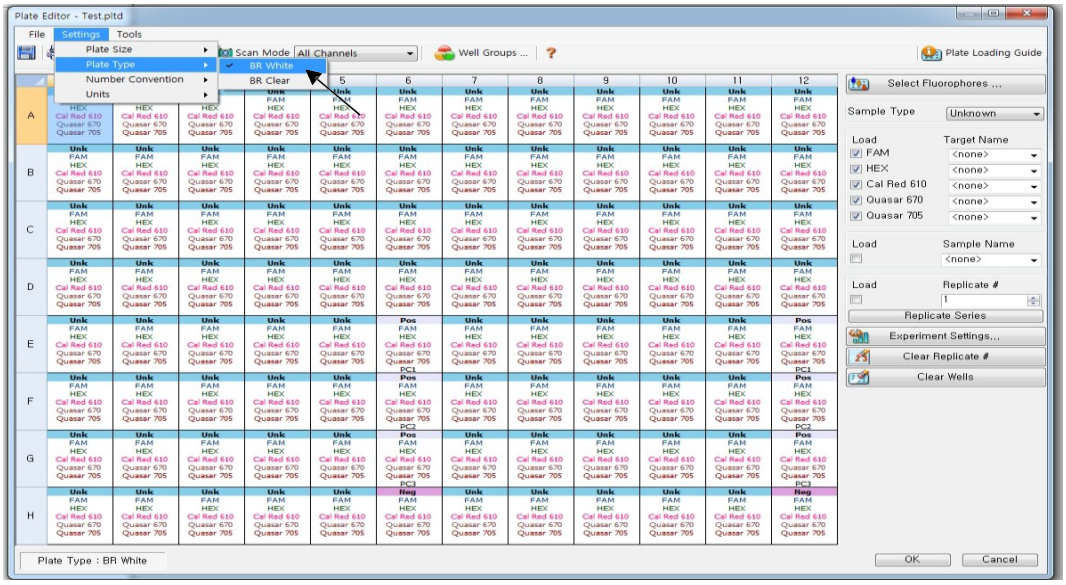


Рис. 6. **Установка планшета**

7) Нажмите **«OK»,** чтобы сохранить новый планшет.

8) Вы вернетесь в окно **«Experiment Setup» («Настройка эксперимента»).**

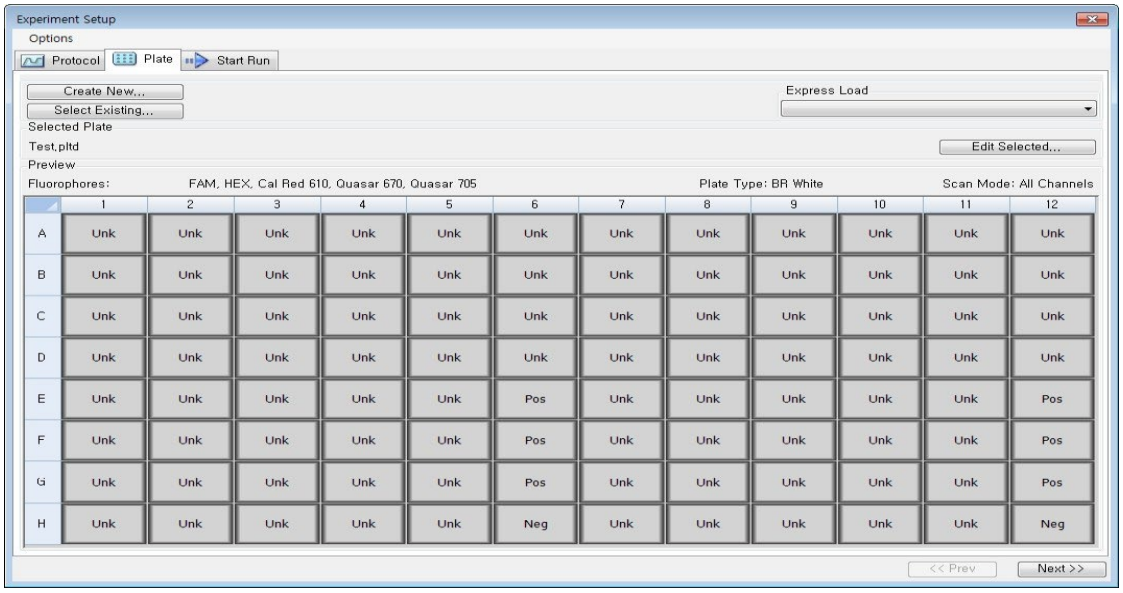


Рис. 7. **Настройка эксперимента: планшета**

9) Нажмите **«Next» («Далее»)**, чтобы начать запуск.

C. Начать запуск

1) На вкладке **«Start Run»** (**«Начать выполнение»)** в разделе **«Experiment Setup» («Настройка эксперимента»)** нажмите **«Close Lid» («Закройте крышку»)**, чтобы закрыть крышку прибора.

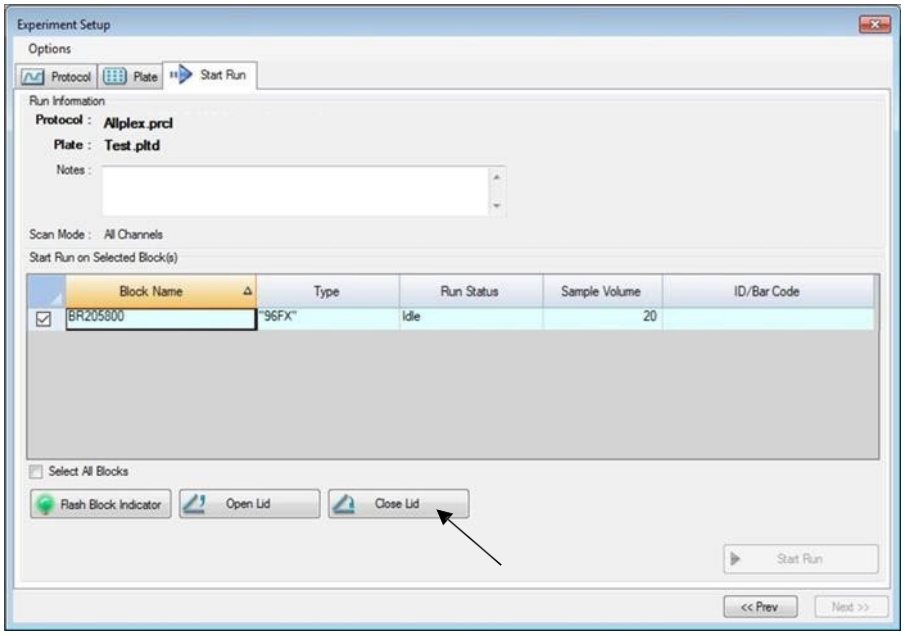


Рис. 8. **Закройте крышку**

2) Нажмите кнопку **«Start Run» («Начать выполнение»)**.

3) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **«SAVE» («Сохранить»)**, и запуск начнется.

1.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные всех этапов детекции кривых амплификации из файла результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть по желанию пользователя (Для функции 'Экспорт Seegene', папки «QuantStep3», «QuantStep4» и «QuantStep5» автоматически создаются для сохранения данных каждой кривой амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX96™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **«Quantitation» («Количественная оценка»)**, чтобы увидеть результаты кривой амплификации.

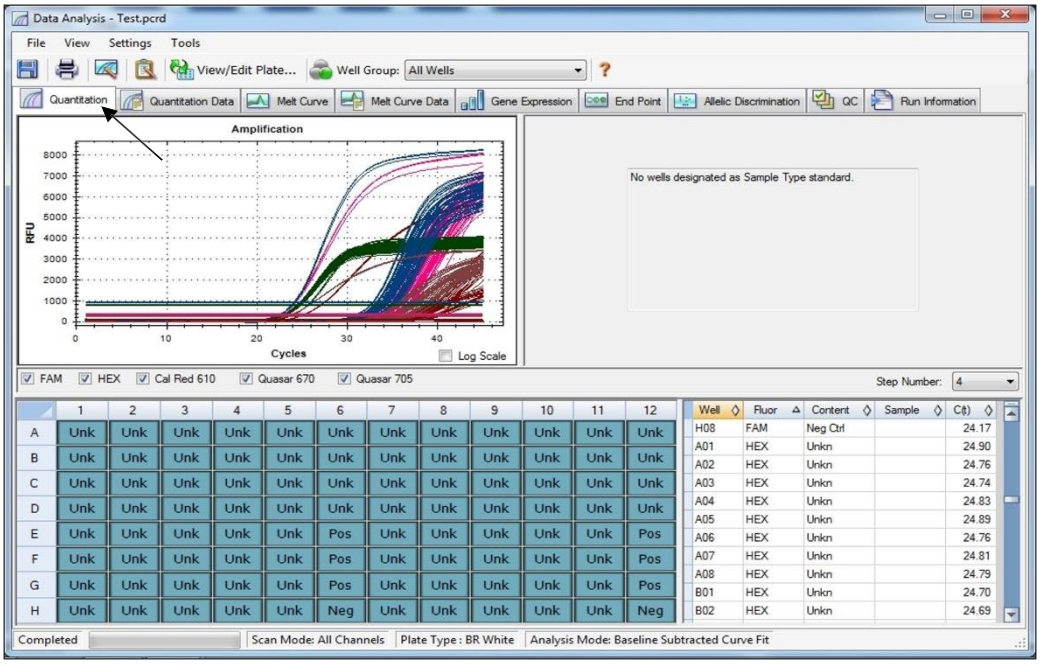


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

2) Выберите **«No Baseline Subtraction» (« Без вычитания базовой линии»)** в **Analysis Mode (Режим анализа)** меню **Settings (Настройки)**.

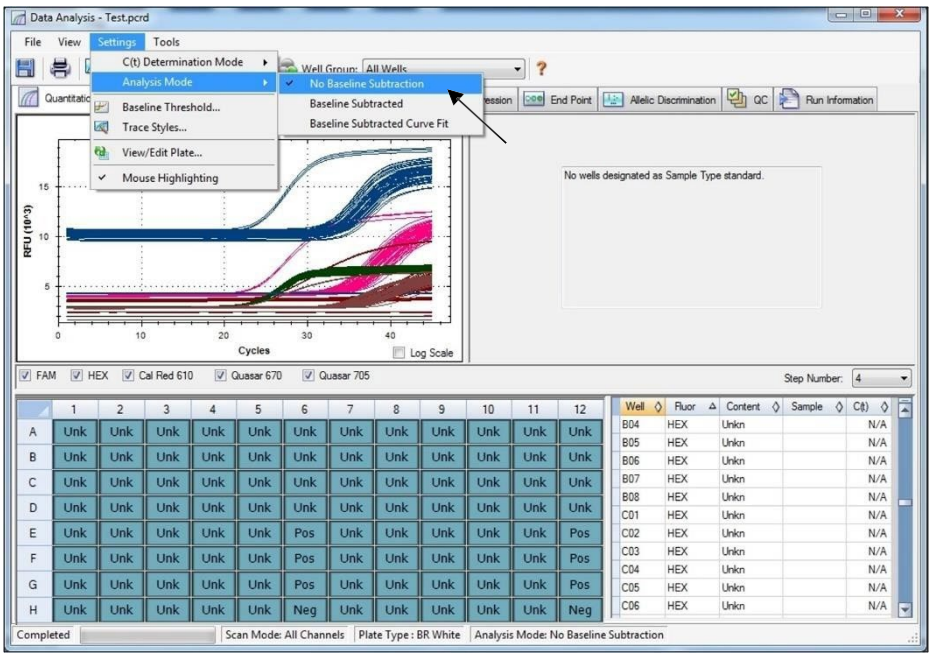


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите **«Seegene Export» («Экспорт Seegene»)** в меню Tools (Инструменты).

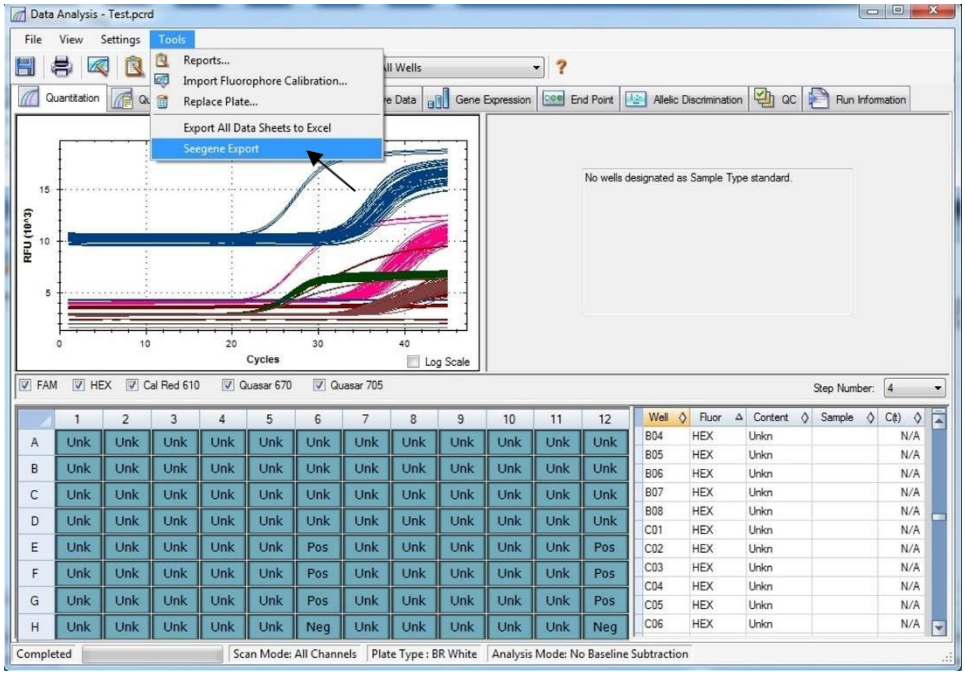


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

4) Выберите место для сохранения данных и нажмите **«ОК»**.

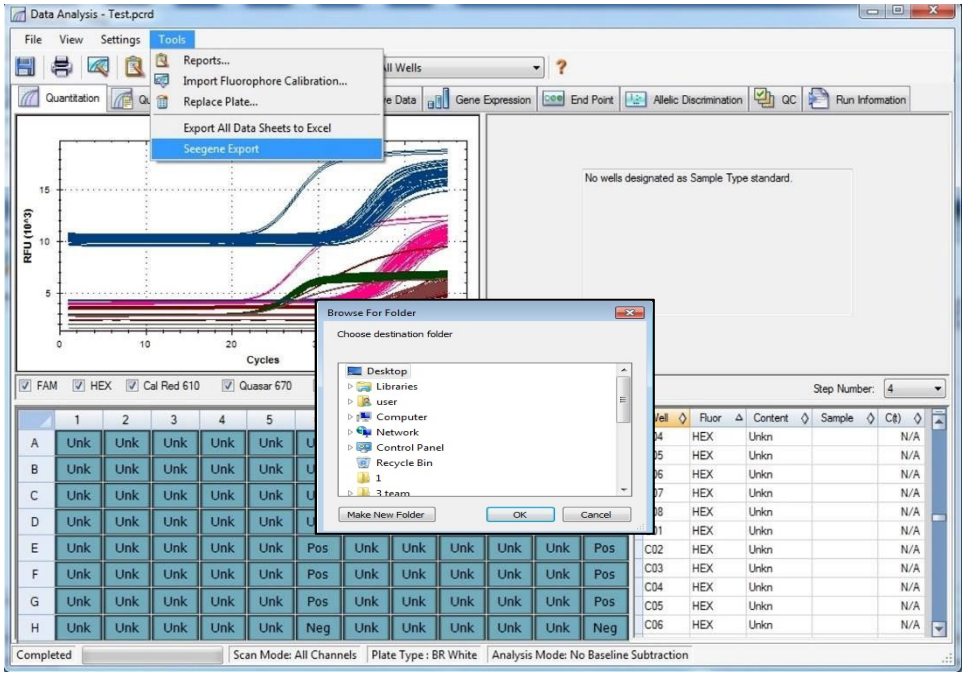


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **«Option» («Параметры»)**, чтобы выбрать ***CFX96* или *CFX96 Dx*** в

«Instrument» («Инструменты»).

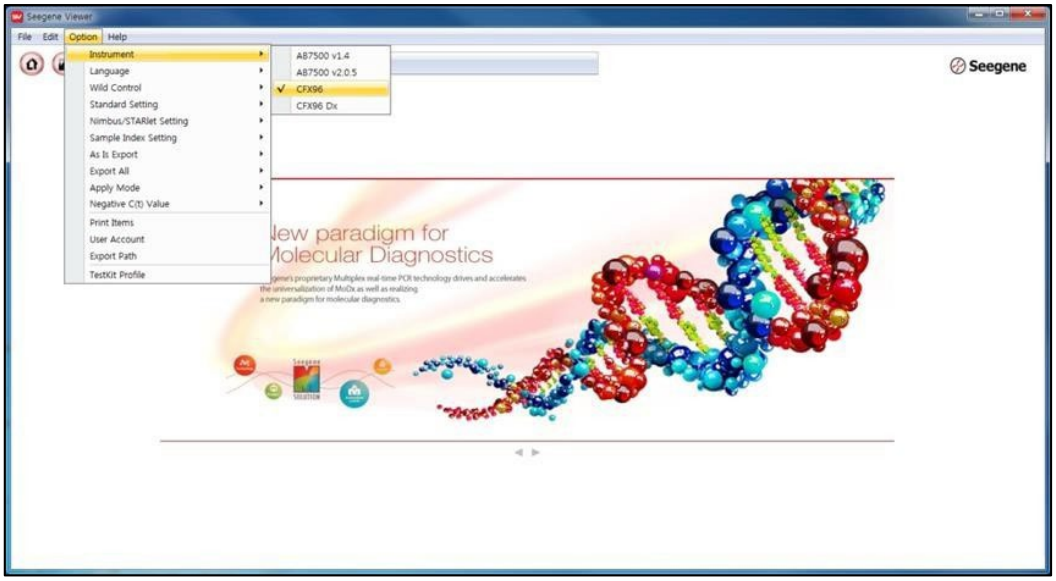


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите **«Open» (Открыть»)**, чтобы найти сохраненный файл в папке «QuantStep3», откройте файл результатов и выберите тестовый набор из меню **«PRODUCT» («ПРОДУКТ»).**

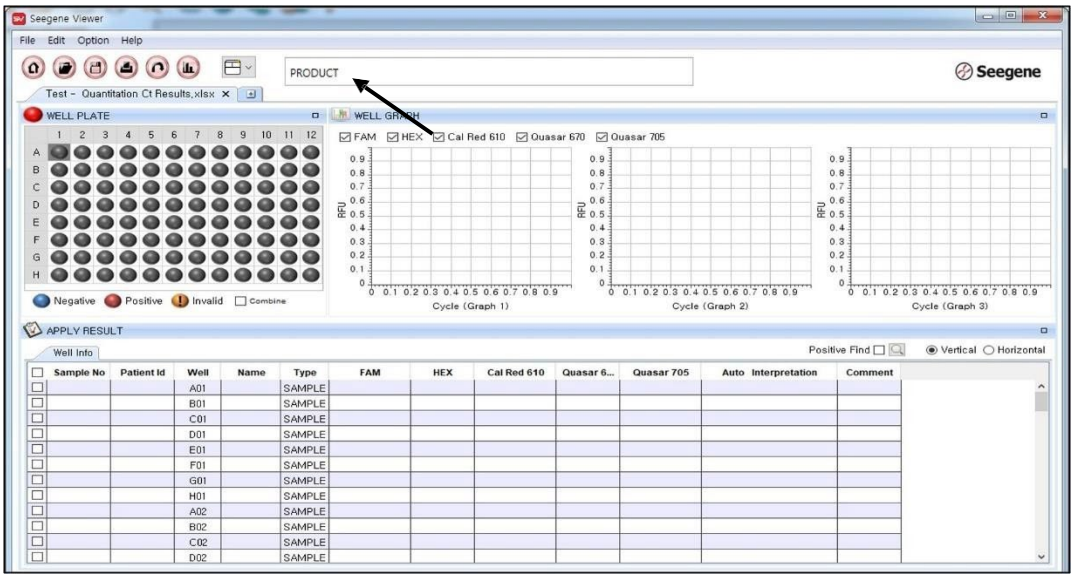


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

3) Проверьте результат для каждой лунки.

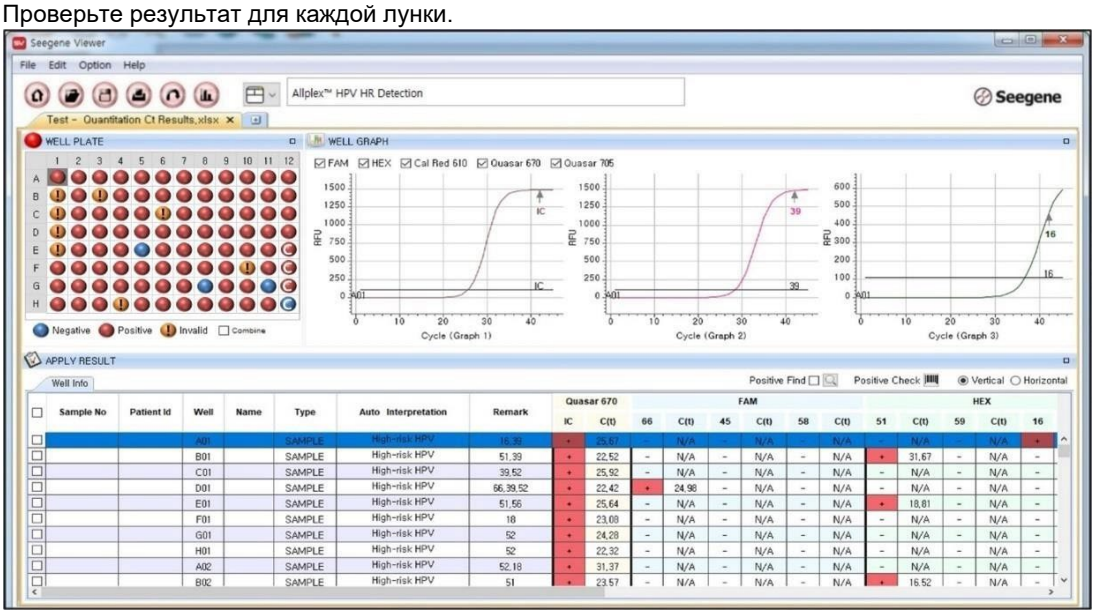


Рис. 15. **Результат тестирования в программе Seegene Viewer**

4) Критерии валидации результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для проверки валидности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и ОК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие условия критерии соблюдены:

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer															
	FAM (Ct)			HEX (Ct)			CalRed 610 (Ct)			Quasar 670 (Ct)			Quasar 705 (Ct)			Автоматическая интерпретация
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC	35	18	56	68	31	
Положительный контроль 1	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 2	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 3	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	Положительный контроль (+)
Отрицательный	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный Контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае неудачи с валидацией результаты не следует интерпретировать или сообщать о них. И ПЦР Реакция должна быть повторена.

2. Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)

2 .1 Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Dx System (Bio-Rad) может быть разделена на 3 тапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск эксперимента.

A
. Настройка протокола

1) В главном меню выберите **«File»→ «New»→ «Protocol»** (**«Файл»→ «Новый»→ «Протокол»)**, чтобы открыть **«Protocol Editor» («Редактор протокола»)**.

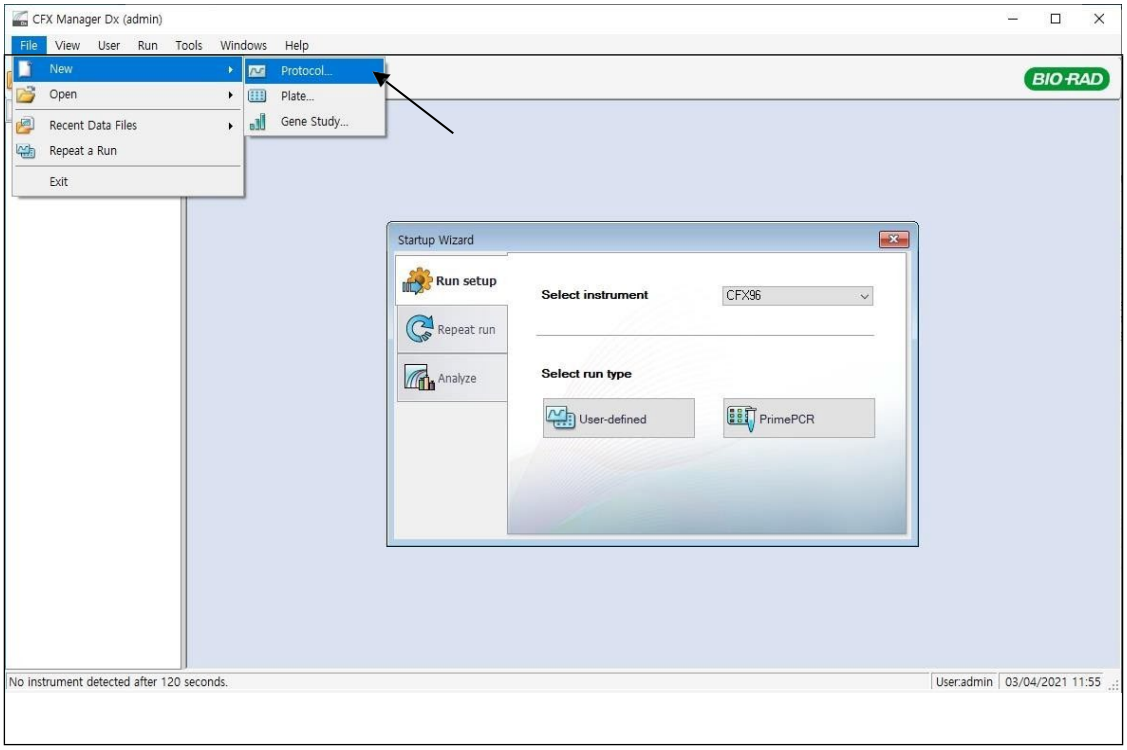


Рис. **. 1. Настройка протокола**

2) В **«Protocol Editor» («Редакторе протоколов»)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	95 C°	15 мин
2	45	95 C°	3 сек
3*		60 C°	10 сек
4*		72 C°	10 сек
5*		83 C°	5 сек

Примечание*: Считывание планшета на шаге 3, 4 и 5. Флуоресценция определяется при 60°C, 72°C и 83°C.

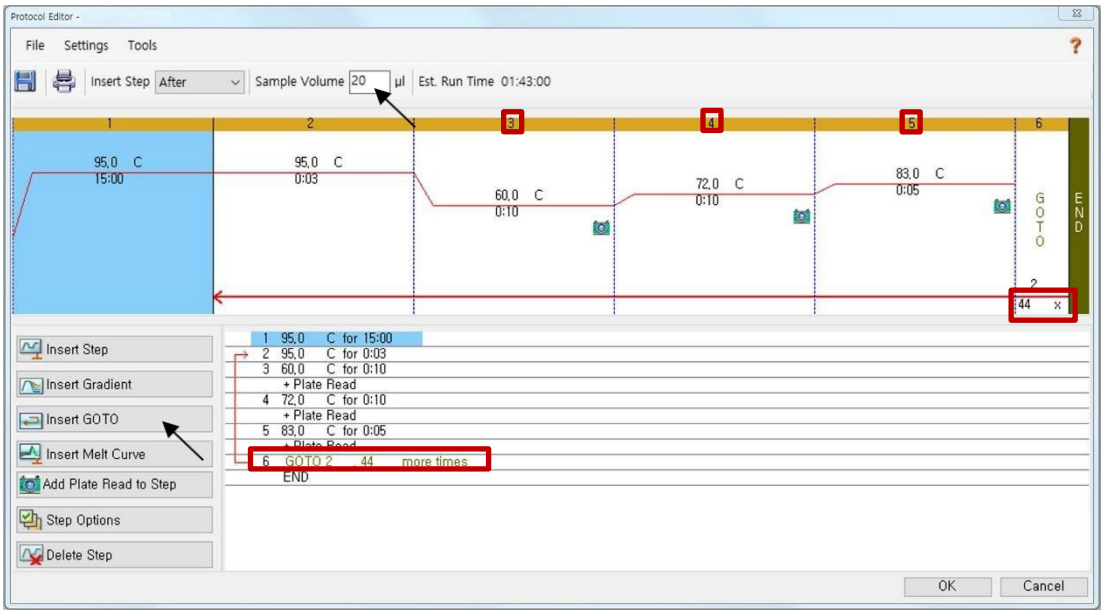


Рис. 2**. Редактор протоколов**

Примечание: Нажмите кнопку **«Insert GOTO» («Вставить GOTO»**) и введите «**GOTO 2, 44 more times**» («**GOTO 2, еще 44 раза**») на шаге 6.

3) Нажмите на поле рядом с **«Sample Volume»** (**«Объем образца»**), чтобы ввести непосредственно 20 мкл

4) Нажмите «ОК» и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Run Setup (Настройка запуска**).

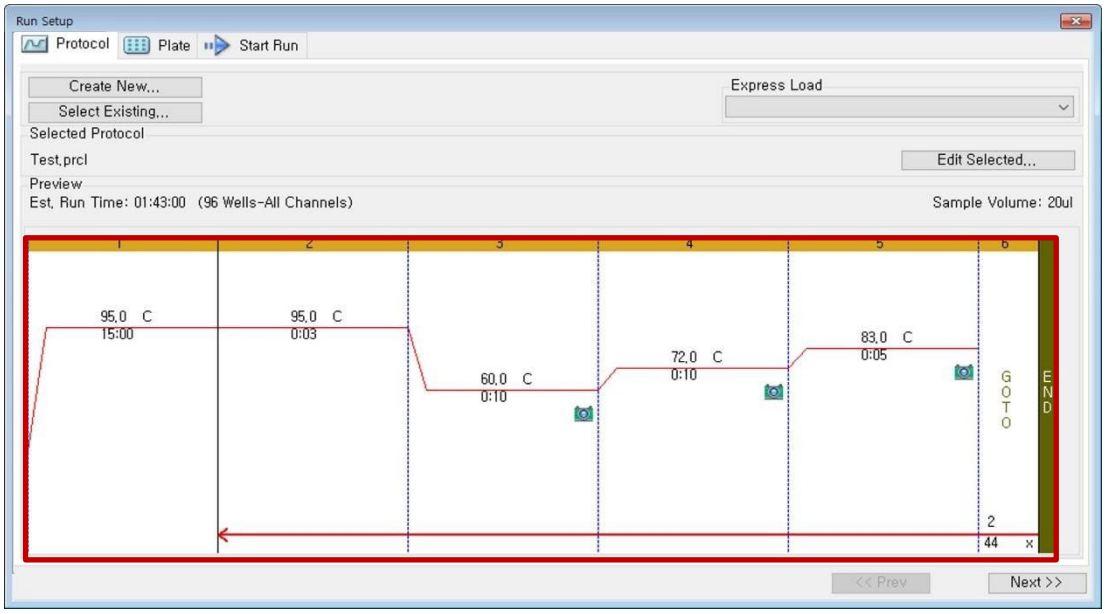


Рис. 3**. Настройка запуска: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **«Plate» («Планшет»)** в «**Run Setup» («Настройка запуска»)** нажмите **«Create New» («Создать новый»)**, чтобы открыть окно **«Plate Editor» («Редактор планшета»).**

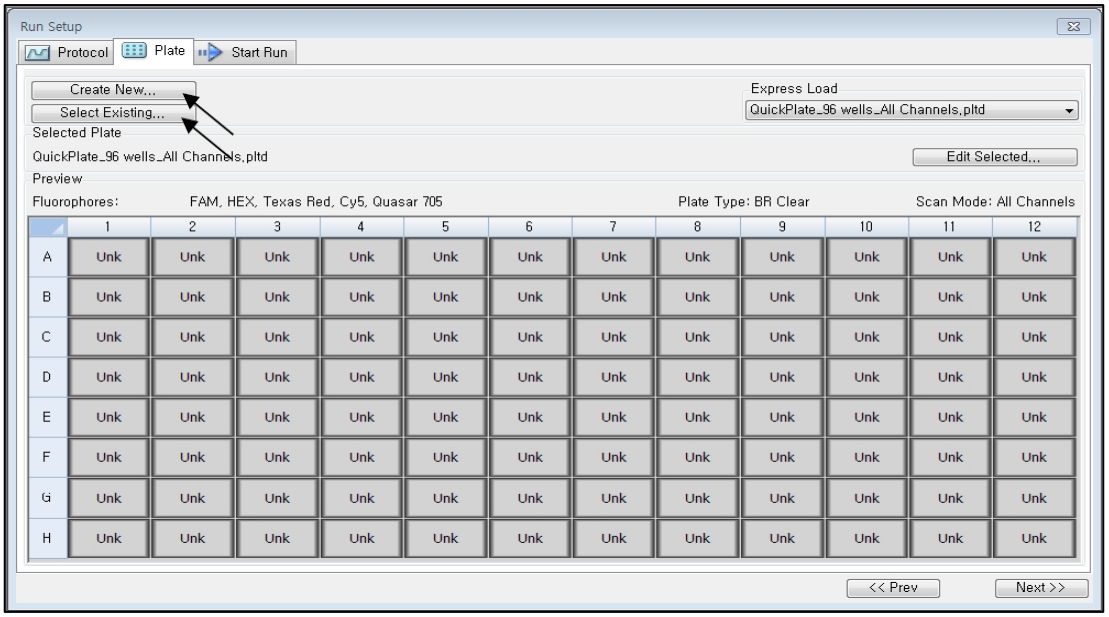


Рис. 4. **Редактор планшета**

1) Нажмите кнопку **«Select Fluorophores» («Выбрать флуорофоры»),** чтобы указать флуорофоры (***FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705***), которые будут использоваться, и нажмите «**OK».**

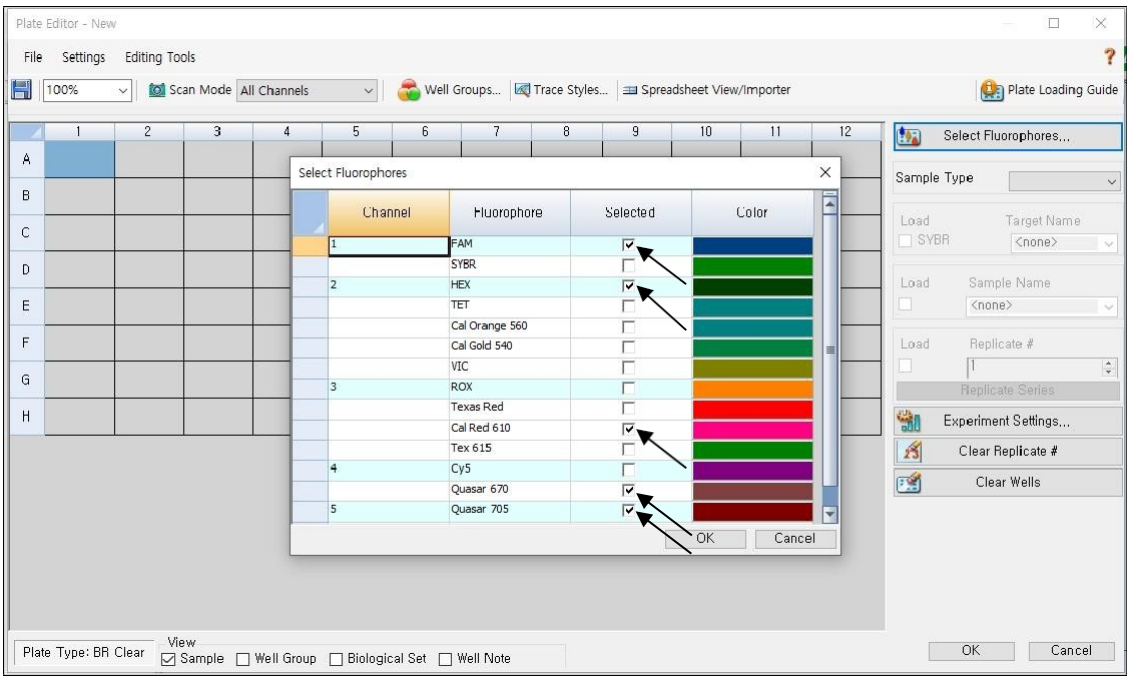


Рис. 5. **«Выбранные флуорофоры»** (***FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705***

2) Выберите лунки, в которые будет помещена ПЦР-пробирка, и выберите тип образца из списка раскрывающегося меню **«Sample Type» («Тип пробы»)**.

- ***Неизвестный***: Клинические образцы
- ***Отрицательный контроль***
- ***Положительный контроль***

3) Нажмите на соответствующие флажки (***FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705)***, чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

4) Введите **«Sample Name» («Имя Образца**») и **PC (PC1, PC2** и **PC3)**, а затем нажмите клавишу ввода.

5) В разделе **«Settings» («Настройки»)** главного меню **«Plate Editor» («Редактора планшетов»)** выберите **«Plate Size (96 wells)» («Размер планшета» (96 лунок**) и **«Plate Type (BR White)» («Тип пластины» (BR белый).**

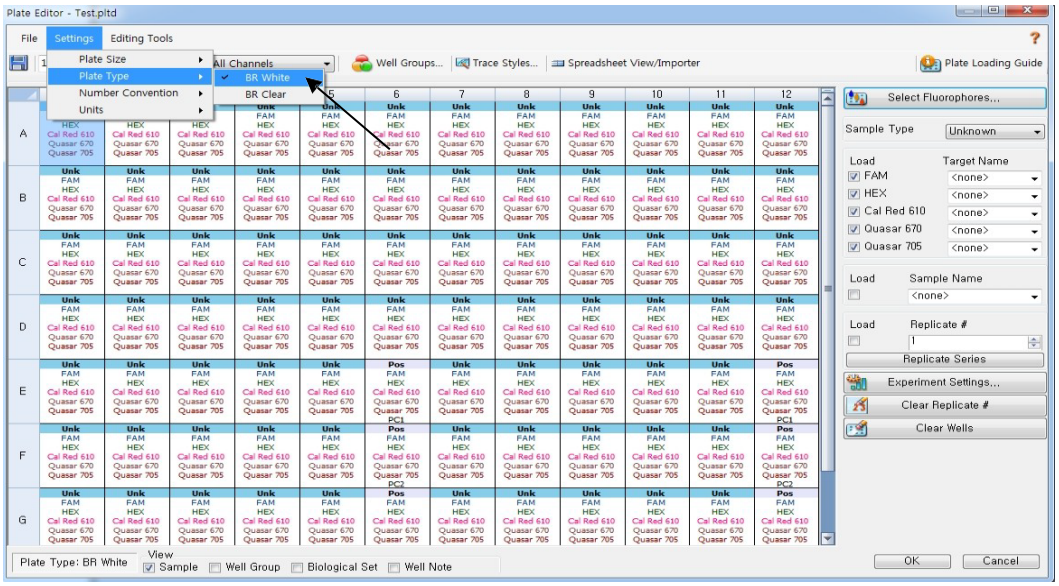


Рис. 6**. Установка планшета**

6) Нажмите **«OK»,** чтобы сохранить новый планшет.

7) Вы вернетесь в окно **«Run Setup» («Настройка запуска»)**.

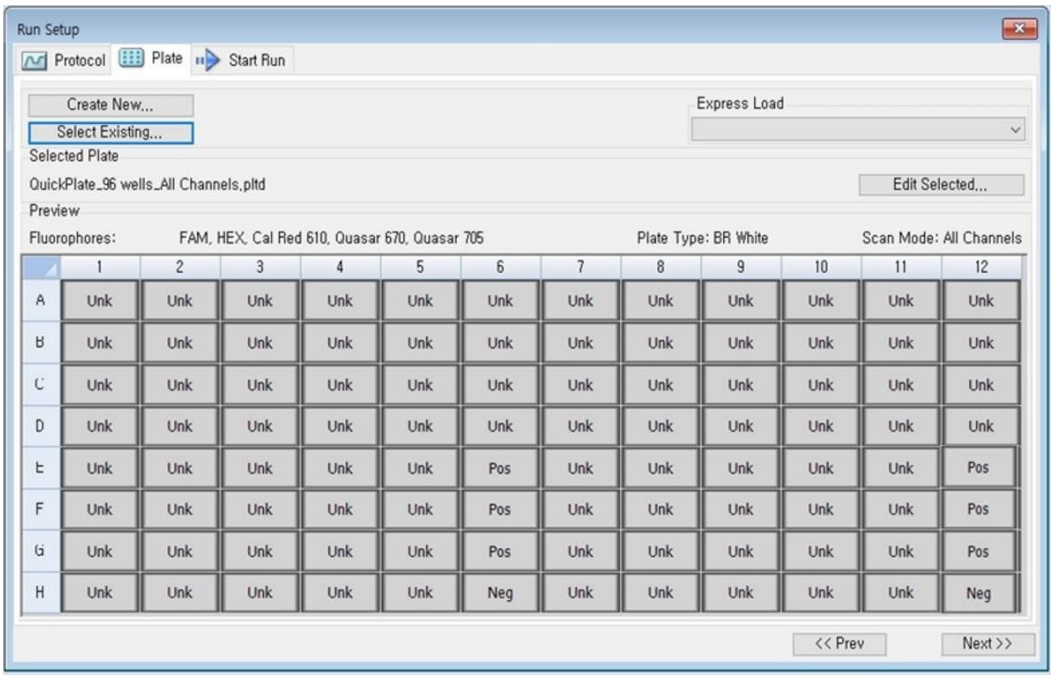


Рис. 7**. Настройка запуска: Планшет**

8) Нажмите **«Next» («Далее»)**, чтобы начать запуск.

C. Начать запуск

1) На вкладке **«Start Run» («Начать выполнение»)** в **«Run Setup» («Начать настройку»)** нажмите **«Close Lid» («Закрыть крышку»)**, чтобы закрыть крышку прибора.

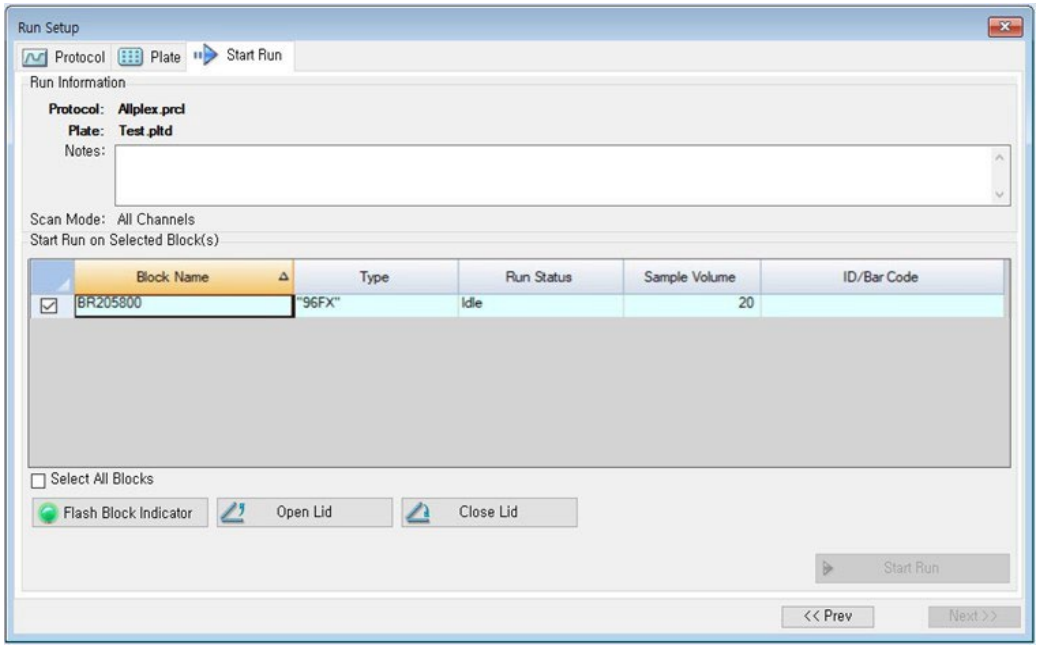


Рис. 8. **Закрыть крышку**

2) Нажмите кнопку **«Start Run» («Начать выполнение»)**.

3) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку **«SAVE» («СОХРАНИТЬ»)**, и запуск начнется.

2.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные всех этапов детекции кривых амплификации из файла результатов, создайте одну папку.

2)Название папки может быть по желанию пользователя (Для функции 'Экспорт Seegene' автоматически создаются папки «QuantStep3», «QuantStep4» и «QuantStep5» для сохранения данных каждой кривой амплификации. в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX96™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **«Quantification» («Количественное определение»)**, чтобы увидеть результаты кривой амплификации.

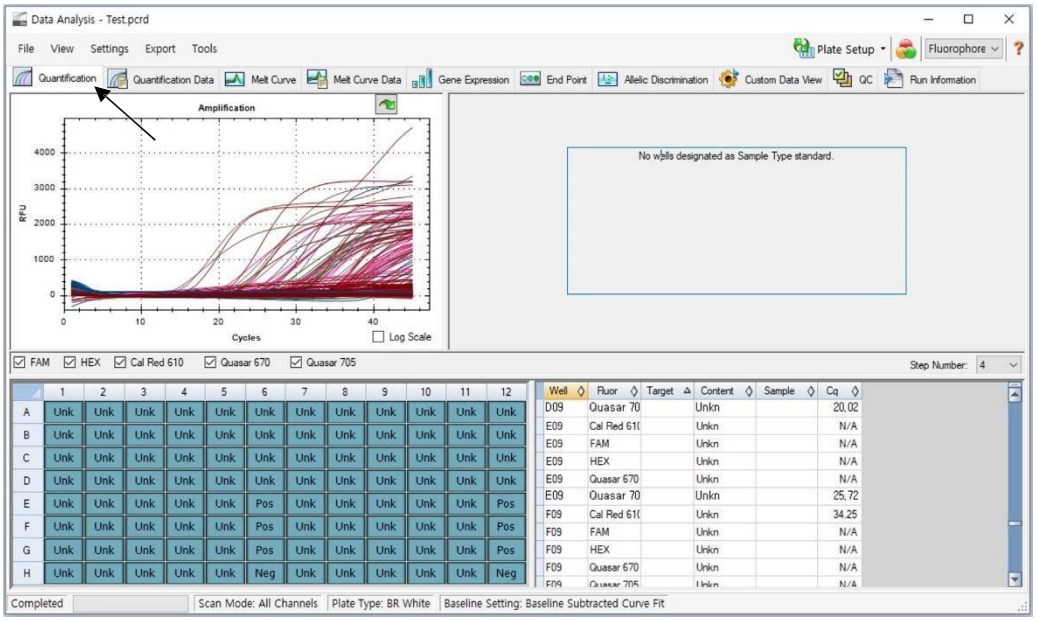


Рис. 9. **Результаты кривой усиления**

2) Выберите **«No Baseline Subtraction» («Без вычитания базовой линии»)** в пункте Daseline Setting (Настройка базовой линии) меню Settings (Настройки).

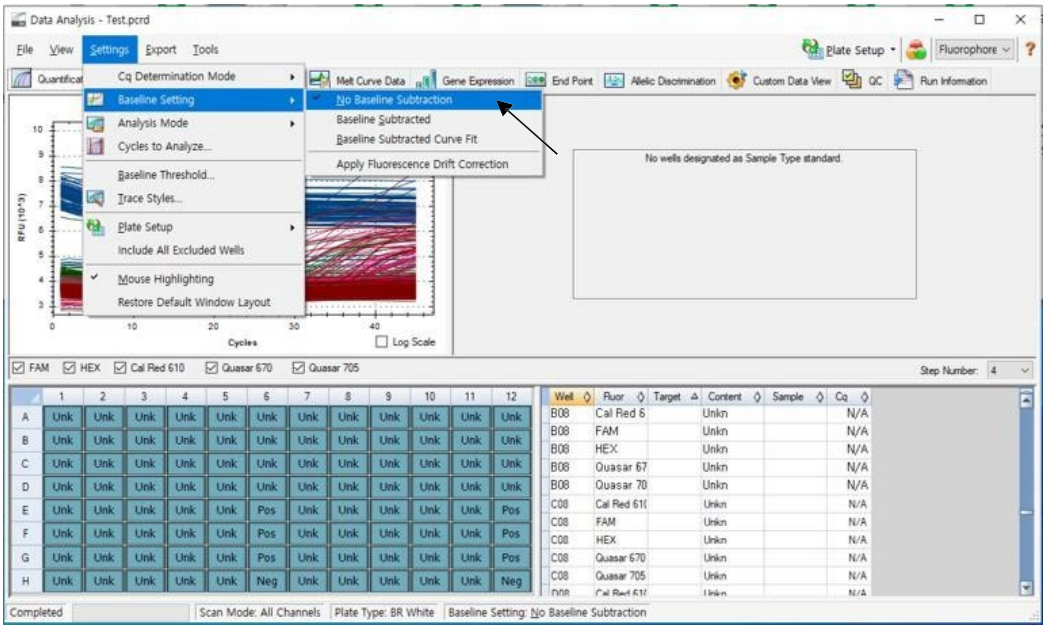


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

3) Выберите **«Seegene Export» («Экспорт Seegene»)** в меню Export (Экспорт).

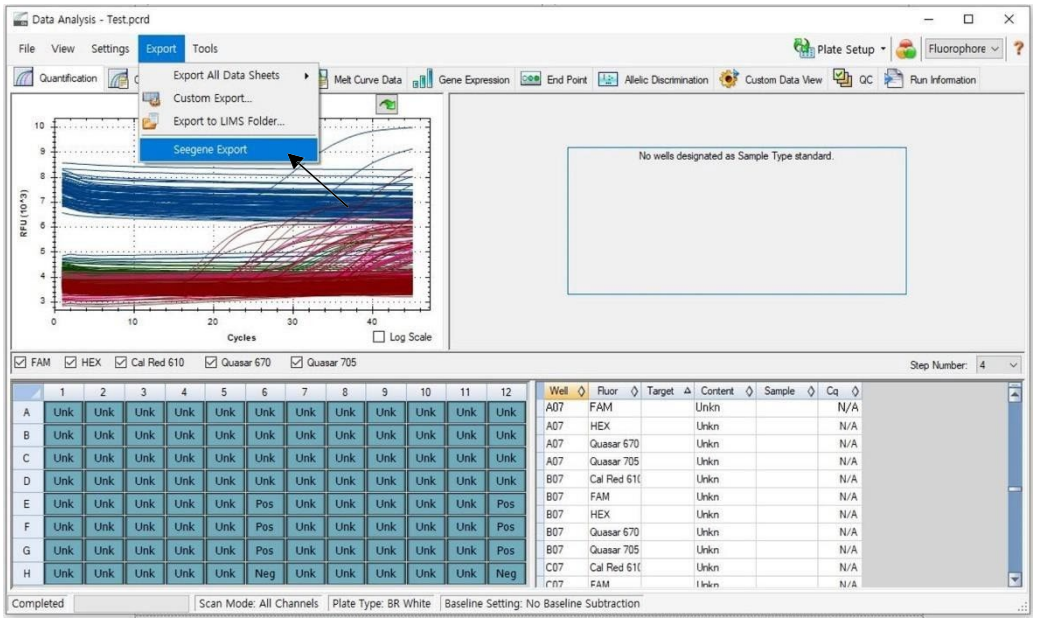


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

4) Выберите место для сохранения данных и нажмите **«ОК»**.

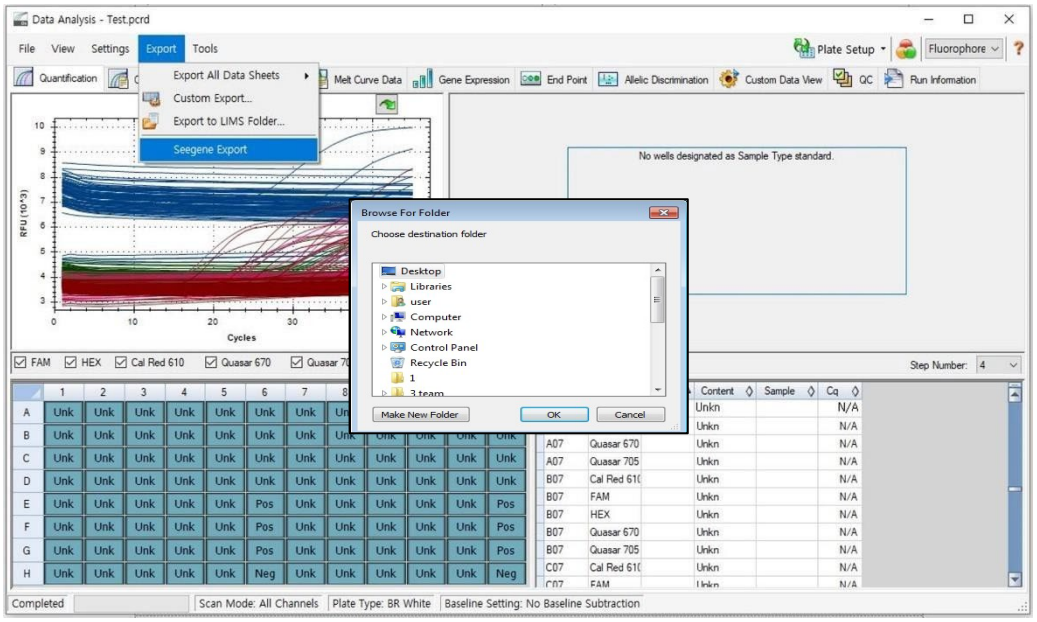


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу **Seegene Viewer** и нажмите **«Option» («Параметры»)**, чтобы выбрать ***CFX96* или *CFX96 Dx*** в **«Instrument» («Инструмент»)**.

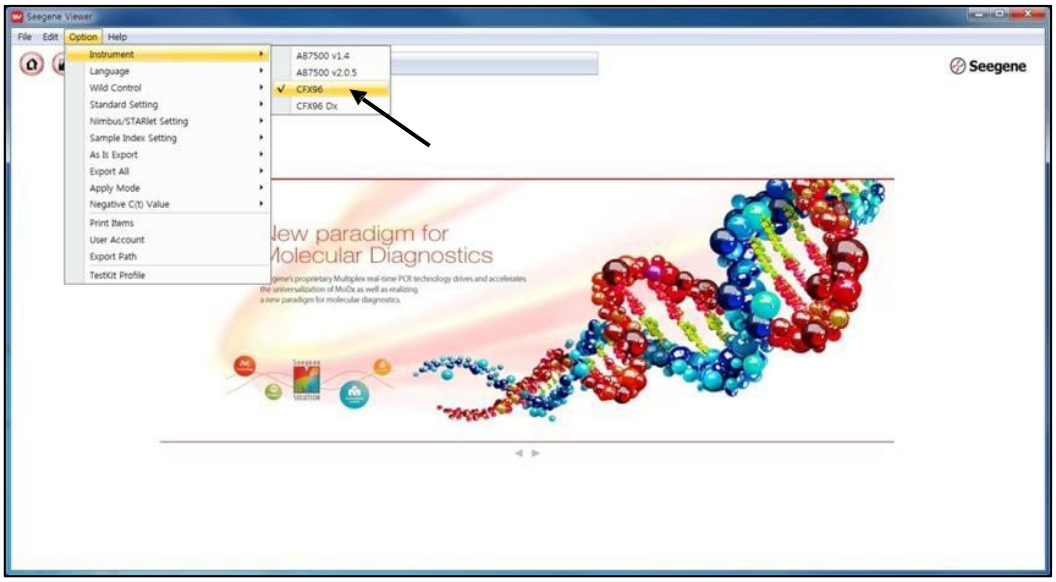


Рис. 13. **Программа просмотра Seegene**

2) Нажмите **«Open» («Открыть»)**, чтобы найти сохраненный файл в папке «QuantStep3», откройте файл результатов и выберите тестовый набор из меню **«PRODUCT» («ПРОДУКТ»).**

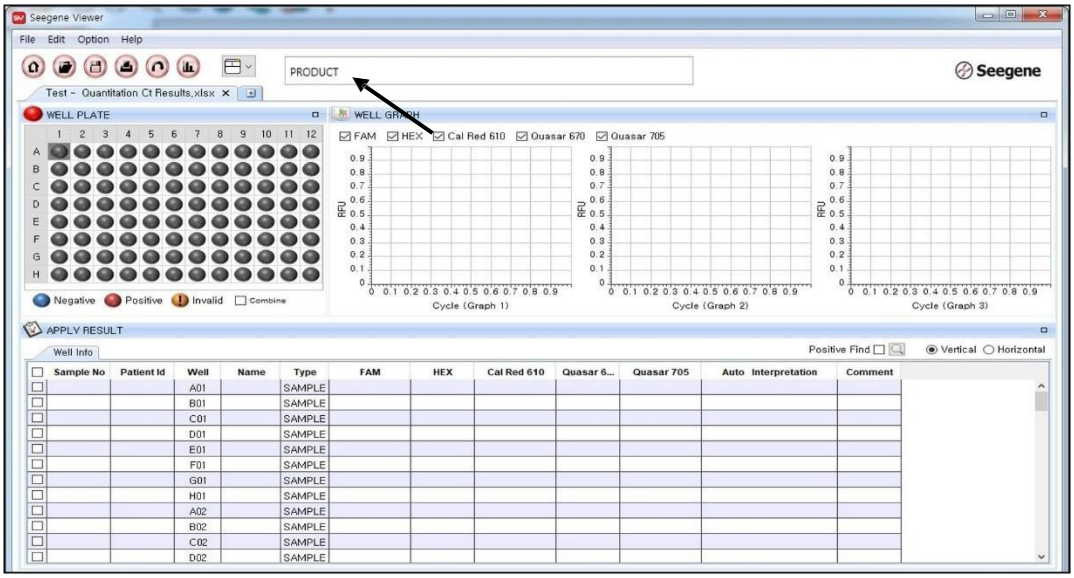


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

3) Проверьте результат для каждой лунки.

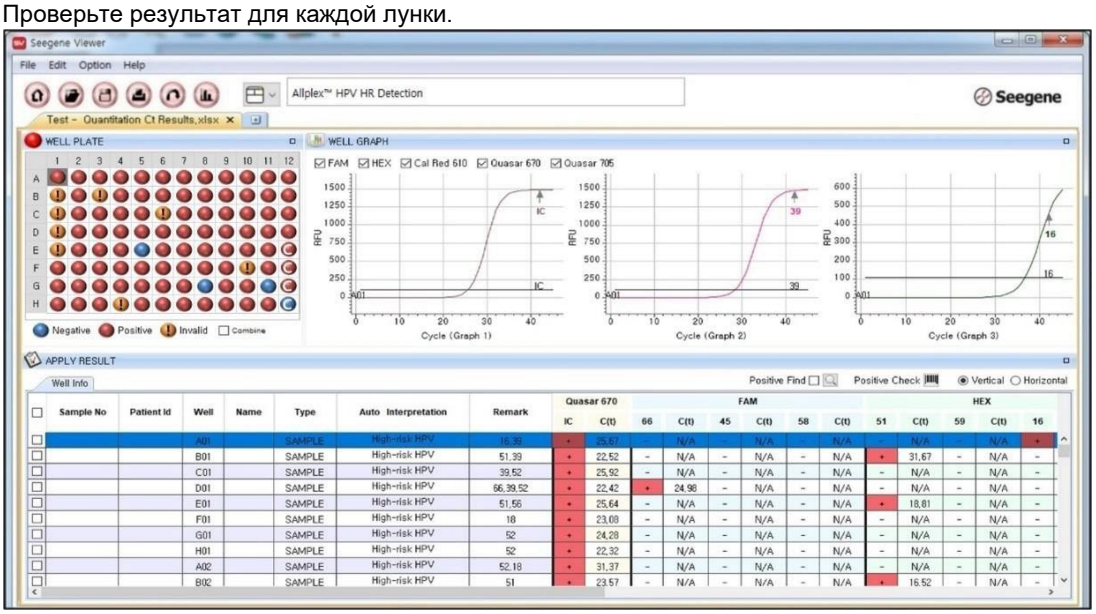


Рис. 15. **Результат тестирования в программе Seegene Viewer**

4) Критерии валидации результатов контроля

a. Действительный прогон анализа

Для проверки валидности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться PC (положительным контролем) и NC (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие условия критерии соблюдены:

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer															
	FAM (Ct)			HEX (Ct)			CalRed 610 (Ct)			Quasar 670 (Ct)			Quasar 705 (Ct)			Автоматическая интерпретация
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC	35	18	56	68	31	
Положительный контроль 1	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 2	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 3	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный Контроль (-)

b. Неверный прогон анализа

В случае неудачи валидации результаты не следует интерпретировать или сообщать, а ПЦР Реакция должна быть повторена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Информация об аналите

Флуорофоры	Аналиты		
	График 1	**График 2**	**График 3**
FAM	HPV66	HPV45	HPV58
HEX	HPV51	ВПЧ59	ВПЧ16
CalRed 610	HPV33	HPV39	HPV52
Quasar 670	IC	HPV35	HPV18
Quasar 705	HPV56	ВПЧ68	HPV31

2. Интерпретация результатов

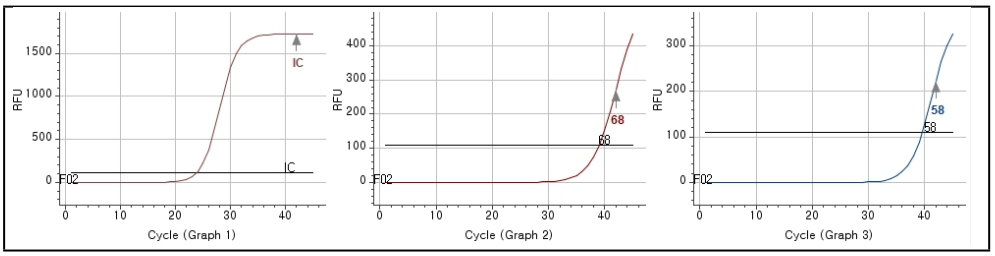
Аналиты	Значение Ct	Результат
Цели	≤ 43	Обнаружено (+)
	> 43 или N/A	Не обнаружено (-)
IC	≤ 43	Обнаружено (+)
	> 43 или N/A	Не обнаружено (-)

Целево й результ	IC Результат*	Общая интерпретация
+	+	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаруженная** - Идентификация целевого типа ВПЧ
+	-	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаружена**** - Идентификация целевого типа ВПЧ - Дополнительные генотипы ВПЧ, которые могли присутствовать, не были обнаружены.
-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, не обнаружена**
-	-	**Неверный** - Отрицательный сигнал IC свидетельствует о неадекватном сборе, обработке образца или наличии ингибиторов. - Повторите тест, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот используя другую аликвоту исходного образца.

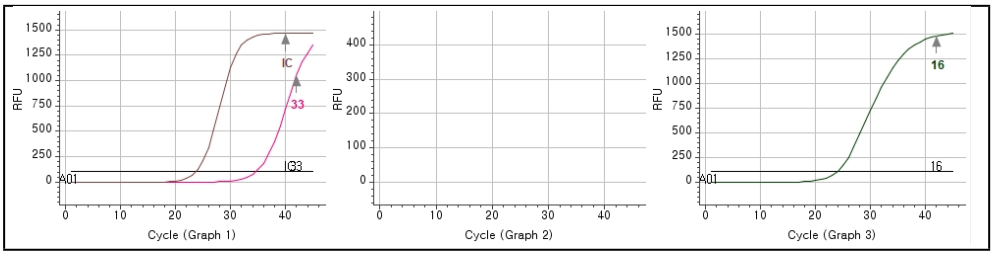
* Внутренний контроль или какие-либо другие сигналы не наблюдаются: см. раздел УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК.

** Сигнал внутреннего контроля может быть снижен или отсутствовать из-за высокого титра патогенов.

3. Применение к клиническим образцам Клиническая проба 1



Клиническая проба 2



Результат работы программы Seegene Viewer (Ct)																		
Образец	Автоматическая интерпретация	Замечание	Quasar 670	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670		Quasar 705		
1	ВПЧ высокого риска	58,68	**IC**	**66**	**45**	**58**	**51**	**59**	**16**	**33**	**39**	**52**	**35**	**18**	**56**	**68**	**31**
			23.7	Н/Д	Н/Д	39.58	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	39.05	Н/Д
2	ВПЧ высокого риска	16,33	**IC**	**66**	**45**	**58**	**51**	**59**	**16**	**33**	**39**	**52**	**35**	**18**	**56**	**68**	**31**
			23.79	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	24.04	34.78	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Allplex™ HPV HR Detection		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Нет сигнала	Флуорофоры для анализа данных не соответствуют с протоколом	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Неправильная настройка термоциклера реального времени	Пожалуйста, проверьте условия термоциклирования и повторите тест при правильных настройках.
	Неправильное хранение или истечение срока годности набора для тестирования	Пожалуйста, проверьте условия хранения (см. стр. 10) и срок годности (см. этикетку) набор для тестирования и при необходимости новый набор.
Нет сигнала внутреннего управления	Высокая нагрузка на нуклеиновую кислоту патогена	Если сигнал патогена-мишени наблюдается, но не IC, то IC-амплификация может быть подавлена высоким титром патогена-мишени. Если вы хотите наблюдать сигнал IC, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест. с этапа экстракции.
	Наличие ингибитора ПЦР	Пожалуйста, разбавьте выделенную нуклеиновую кислоту (1/2~1/5) в воде, не содержащей РНК, и повторите тест, начиная с этапа ПЦР. Если результат тот же, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Некорректный сбор образцов	Если и целевой, и сигнал IC не наблюдались,это означает, что образец был собран неправильно. Заберите образец.
Предполагаемый ложноположительный или целевой сигнал(ы), наблюдаемый в отрицательном контроле	Загрязнение	Обеззараживайте все поверхности и инструменты гипохлоритом натрия и этанолом. На протяжении всей процедуры используйте только фильтрующие насадки и меняйте их между пробирками. Повторите всю процедуру, начиная с выделения нуклеиновых кислот, используя новый набор реагентов.

Allplex™ HPV HR Detection		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Предполагаемый ложноотрицательный или сигнал не наблюдается в Положительный контроль	Перекрестное загрязнение между ПК1, 2 и 3	Перезапустите с этапа экстракции или перезапустите с этапа ПЦР в реальном времени.
	Ошибка при сборе образца	Пожалуйста, проверьте метод сбора образцов и повторно соберите образец.
	Неправильное хранение образца	Пожалуйста, повторно соберите образец и повторите процедуру всю процедуру. Убедитесь, что образец хранится в соответствии с рекомендациями.
	Ошибка при выделении нуклеиновых кислот	Пожалуйста, проверьте процедуру выделения нуклеиновых кислот, а также концентрацию нуклеиновых кислот, и повторно извлечь нуклеиновую кислоту.
	Ошибка при добавлении нуклеиновой кислоты в нужные пробирки для ПЦР	Проверьте количество образцов в пробирках с нуклеиновой кислотой и убедитесь, что добавили нуклеиновую кислоту в правильные пробирки для ПЦР, и тщательно повторите. При необходимости выполните тест.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Флуорофоры для анализа данных не соответствуютпротоколу	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Некорректное программирование	Повторите ПЦР с исправленными настройками.
	Неправильная смесь для ПЦР	Убедитесь, что все компоненты добавлены в реакционную смесь. Чувствительность снижается при использовании предварительно приготовленных смесей. Все реагенты должны перед использованием гомогенизировать и отжать.
	Длительное пребывание реагентов при комнатной температуре или неправильные условия хранения	Пожалуйста, проверьте условия хранения и срок годности (см. этикетку набора) реагентов и при необходимости используйте новый набор.
Скачки на всех циклах кривой амплификации	Пузырек воздуха в пробирке для ПЦР	Прокрутите пробирку для ПЦР перед запуском.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

1. Аналитическая специфичность

Высокая специфичность Allplex™ HPV HR Detection обеспечивается олигосом, разработанным специально для интересующих мишеней. Allplex™ HPV HR Detection был протестирован на перекрестную реактивность к 105 различным патогенам, и ПЦР-амплификация и детекция были выявлены только для указанных мишеней.

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
1	*Acinetobacter baumannii*	ZMC	0801597	Не обнаружено
2	*Acinetobacter lwoffii*	ZMC	0801909	Не обнаружено
3	Adenovirus Type 1	ZMC	0810050CF	Не обнаружено
4	Adenovirus type 18	KBPV	KBPV-VR-4D	Не обнаружено
5	Adenovirus type 23	KBPV	KBPV-VR-5D	Не обнаружено
6	Adenovirus Type 40	ZMC	0810084CF	Не обнаружено
7	*Bacteroides fragilis*	ZMC	0801583	Не обнаружено
8	*Bifidobacterium longum*	ZMC	0804047	Не обнаружено
9	*Candida albicans*	ZMC	0801504	Не обнаружено
10	*Chlamydia trachomatis*	ZMC	0801775	Не обнаружено
11	*Clostridium perfringens* тип A	ZMC	0801585	Не обнаружено
12	*Corynebacterium genitalium*	ZMC	0804108	Не обнаружено
13	*Cytomegalovirus (CMV) (Strain: AD-169)*	ZMC	0810003CF	Не обнаружено
14	*Enterobacter cloacae*	ZMC	0801597	Не обнаружено
15	*Enterococcus faecalis*	ZMC	0801637	Не обнаружено
16	*Escherichia coli*	ZMC	0801517	Не обнаружено
17	*Fusobacterium nucleatum*	ZMC	0801911	Не обнаружено
18	*Gardnerella vaginalis*	ZMC	0801894	Не обнаружено
19	*Haemophilus ducreyi*	ZMC	0801736	Не обнаружено
20	Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) (Strain: MacIntyre)	ZMC	0810005CF	Не обнаружено
21	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) (Strain: MS)	ZMC	0810006CF	Не обнаружено
22	Human Hepatitis B Virus (HBV)	ZMC	NATHBV-0006	Не обнаружено
23	Human immunodeficiency virus (HIV-1)	ATCC	VR-3245SD	Не обнаружено
24	*Klebsiella pneumoniae*	ZMC	0801506	Не обнаружено
25	*Lactobacillus acidophilus*	ZMC	0801540	Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
26	*Lactobacillus crispatus*	ZMC	0804143	Не обнаружено
27	*Lactobacillus gasseri*	ZMC	0804327	Не обнаружено
28	*Lactobacillus iners*	ZMC	0804261	Не обнаружено
29	*Lactobacillus jensenii*	ZMC	0804260	Не обнаружено
30	*Mobiluncus curtisii*	ZMC	0804141	Не обнаружено
31	*Mobiluncus mulieris*	ZMC	0804116	Не обнаружено
32	*Mycoplasma hominis*	ZMC	0804011	Не обнаружено
33	*Neisseria gonorrhoeae*	ZMC	0801482	Не обнаружено
34	*Neisseria lactamica*	ZMC	0801752	Не обнаружено
35	*Neisseria meningitidis* Serogroup A	ZMC	0801511	Не обнаружено
36	*Neisseria sicca*	ZMC	0801754	Не обнаружено
37	*Peptostreptococcus anaerobius*	ZMC	0804012	Не обнаружено
38	*Prevotella melaninogenica*	ZMC	0804292	Не обнаружено
39	*Proteus mirabilis*	ZMC	0804544	Не обнаружено
40	*Pseudomonas aeruginosa*	ZMC	0801519	Не обнаружено
41	*Pseudomonas fluorescens*	ZMC	0804248	Не обнаружено
42	*Serratia marcescens*	ZMC	0801723	Не обнаружено
43	Simian Virus 40 (SV40)	ATCC	VRMC-2	Не обнаружено
44	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	ZMC	0801638	Не обнаружено
45	Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE)	ZMC	0801651	Не обнаружено
46	*Streptococcus agalactiae*	ZMC	0801545	Не обнаружено
47	*Streptococcus mitis*	ZMC	0801695	Не обнаружено
48	*Streptococcus pyogenes*	ZMC	0801512	Не обнаружено
49	Syphilis (Treponema pallidum)	ZMC	KZMC002	Не обнаружено
50	*Trichomonas vaginalis*	ZMC	0801805	Не обнаружено
51	*Ureaplasma urealyticum*	НКТЦ	10177	Не обнаружено
52	HPV 1	Клонированная ДНК		Не обнаружено
53	HPV2	Клонированная ДНК		Не обнаружено
54	HPV3	Корейский изолят		Не обнаружено
55	HPV4	Клонированная ДНК		Не обнаружено
56	HPV5	Клонированная ДНК		Не обнаружено
57	HPV8	Клонированная ДНК		Не обнаружено
58	HPV10	Корейский изолят		Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
59	HPV13	Клонированная ДНК		Не обнаружено
60	HPV27	Корейский изолят		Не обнаружено
61	HPV30	Клонированная ДНК		Не обнаружено
62	HPV32	Корейский изолят		Не обнаружено
63	HPV34	Корейский изолят		Не обнаружено
64	HPV55	Корейский изолят		Не обнаружено
65	HPV57	Корейский изолят		Не обнаружено
66	HPV62	Корейский изолят		Не обнаружено
67	HPV67	Корейский изолят		Не обнаружено
68	HPV71	Корейский изолят		Не обнаружено
69	HPV72	Корейский изолят		Не обнаружено
70	HPV74	Корейский изолят		Не обнаружено
71	HPV81	Корейский изолят		Не обнаружено
72	HPV83	Клонированная ДНК		Не обнаружено
73	HPV84	Корейский изолят		Не обнаружено
74	HPV85	Клонированная ДНК		Не обнаружено
75	HPV102	Клонированная ДНК		Не обнаружено
76	SiHa (HPV16 positive)	ККЛБ	30035	Обнаружен ВПЧ16
77	HeLa (HPV18 positive)	ККЛБ	10002	Обнаружен ВПЧ18
78	HPV16	НИБСК	06/202	Обнаружен ВПЧ16
79	HPV18	НИБСК	06/206	Обнаружен ВПЧ18
80	HPV31	НИБСК	14/258	Обнаружен ВПЧ31
81	HPV33	НИБСК	14/260	Обнаружен ВПЧ33
82	HPV35	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ35
83	HPV39	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ39
84	HPV45	НИБСК	14/104	Обнаружен ВПЧ45
85	HPV51	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ51
86	HPV52	НИБСК	14/262	Обнаружен ВПЧ52
87	HPV56	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ56
88	HPV58	НИБСК	14/264	Обнаружен ВПЧ58
89	HPV 59	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ59
90	HPV 66	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ66
91	HPV68	Корейский изолят		Обнаружен ВПЧ68
92	HPV6	НИБСК	14/256	Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
93	HPV11	НИБСК	14/100	Не обнаружено
94	HPV26	Корейский изолят		Не обнаружено
95	HPV40	Корейский изолят		Не обнаружено
96	HPV42	Корейский изолят		Не обнаружено
97	HPV43	Корейский изолят		Не обнаружено
98	HPV44	Корейский изолят		Не обнаружено
99	HPV53	Корейский изолят		Не обнаружено
100	HPV54	Корейский изолят		Не обнаружено
101	HPV61	Корейский изолят		Не обнаружено
102	HPV69	Корейский изолят		Не обнаружено
103	HPV70	Корейский изолят		Не обнаружено
104	HPV73	Корейский изолят		Не обнаружено
105	HPV82	Корейский изолят		Не обнаружено

† Тесты на специфичность повторяли 3 раза.

※ ATCC: Американская коллекция типовых культур
KBPV: Корейский банк патогенных вирусов
ZMC: ZeptoMetrix Corporation
NCTC: Национальная коллекция типовых культур
NIBSC: Национальный институт биологических стандартов и контроля

2. Аналитическая чувствительность

Для определения предела обнаружения (LoD) теста Allplex™ HPV HR Detection, пДНК для целевых типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 и 2 типов клеточных линий для целевых типов 16 и 18 были серийно разведены в смешанных образцах шейки матки, отрицательных на HPV, собранных в растворе ThinPrep. Нуклеиновые кислоты были экстрагированы с использованием Microlab NIMBUS IVD (STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit). Предел обнаружения для каждой цели был оценен с помощью пробит-анализа с использованием программного обеспечения (MedCalc V20.015).

2-1. Пределы обнаружения: Линии клеток ВПЧ

Цель	Предел обнаружения (клеток/мл)
SiHa (ВПЧ16)	88.9
HeLa (ВПЧ18)	45.2

2-2. Предел обнаружения: рДНК ВПЧ

Цель	Предел обнаружения (копий/мл)
ВПЧ35	3556
ВПЧ39	2515
ВПЧ51	3142
ВПЧ56	3623
ВПЧ59	3660
ВПЧ66	3941
ВПЧ68	3586

Цель	Предел обнаружения (МЕ/мл)
ВПЧ16	4134
ВПЧ18	1217
ВПЧ31	3680
ВПЧ33	1616
ВПЧ45	5643
ВПЧ52	2967
ВПЧ58	2263

3. Воспроизводимость

Тест на воспроизводимость был подготовлен, включая образцы с умеренно положительным результатом (3X LoD) и с низким положительным результатом (1X LoD). На каждом тестовом участке набор тестировался в течение 5 дней, 2 запуска в день двумя разными экспериментаторами и в тройных образцах для каждой цели. Положительные показатели были зафиксированы для каждой цели в исследовании воспроизводимости: 100,0% для образцов с умеренно положительным результатом, ≥95% для образцов с низким положительным результатом. Воспроизводимость теста Allplex™ HPV HR Detection была оценена между пробами, участками и партиями продукта. Положительные показатели для всех концентраций соответствовали критериям, а значения CV (коэффициент вариации) были менее 10 (<10). Результаты удовлетворяли установленным выше критериям, что подтверждает воспроизводимость тестов Allplex™ HPV HR Detection.

4. Мешающие вещества

Не было никаких эффектов на результаты при добавлении вещества: неспецифические обнаружения или ингибирования на целевую амплификацию. На основании результатов, 7 различных типов мешающих веществ не оказали никакого эффекта на результаты обнаружения ВПЧ Allplex™ HR.

№.	Мешающие вещества	Источник	Тестовая концентрация
1	Кровь	Human	5% об./об.
2	Лейкоциты, обработанные ультразвуком	Lee Biosolutions (Кат. № 342-10-1)	1X106 клеток/мл
3	Муцин (муцин из желудка свиньи)	Sigma-Aldrich (Кат. № M1778-10G)	10% об./об.
4	Спермицид (ноноксинол-9)	Abcam	10% м./об.
5	Дрожжевое средство Gard Advanced®	(Кат. № ab143673)	10% м./об.
6	Смазка	Lake Consumer	10% м./об.
7	Противозачаточные таблетки (Mercilon®)	Products, Inc.	10% м./об.

5. Клинические показатели

[Сравнение производительности с компаратором, одобренным CE-IVDD].

Allplex™ HPV HR Detection показал эквивалентную клиническую эффективность в качестве первичного скринингового теста на рак шейки матки по сравнению с референтным анализом при стратификации риска для CIN 2+ на основе центрального обзора патологии диагнозов рака шейки матки. Согласно диагностике цервикальных интраэпителиальных неоплазм (CIN), относительная чувствительность и относительная специфичность между тестом и компаратором теста на ДНК ВПЧ должны быть выше 90% и 98% соответственно, которые устанавливаются на основе критериев эквивалентности (Arbyn et al., 2015). Allplex™ HPV HR Detection соответствовал обозначенным критериям и показал свою клиническую обоснованность.

		Гистология		
		CIN2+	<CIN2	Всего
Allplex™ HPV HR Detection	Положит	314	276	590
	Отрицат	99	127	226
	Всего	413	403	816

		Гистология		
		CIN2+	<CIN2	Всего
Сравнительный анализ с одобрением CE- IVDD	Положит	318	274	592
	Отрицат	95	129	224
	Всего	413	403	816

Относительная чувствительность (Allplex™ против компаратора)	98.74%
Относительная специфичность (Allplex™ против компаратора)	98.45%

[Клиническая эквивалентность Allplex™ HPV HR Detection между цервикальным и самозабором вагинальные образцы]

Allplex™ HPV HR Detection продемонстрировал эквивалентную клиническую валидность при самостоятельном сборе вагинальных образцов. В клиническую характеристику были включены парные образцы 143 образцов шейки матки и 143 самостоятельно собранных вагинальных образцов. Allplex™ HPV HR Detection показал общее процентное согласие (OPA) более 95%, и согласие было эквивалентным между парными образцами шейки матки и самостоятельно собранными вагинальными образцами, что предполагает эквивалентную клиническую эффективность между парными образцами.

	Цервикальные образцы (Allplex™ HPV HR по сравнению с одобренным CE-IVDD сравнительным препаратом)				Самостоятельно собранные вагинальные образцы (Allplex™ HPV HR против одобренного CE-IVDD компаратора) CE-IVDD)			
	OPA (%)	95% ДИ	Kappa	95% ДИ	OPA (%)	95% ДИ	Kappa	95% ДИ
ВПЧ16	98.60 (141/143)	95.04 - 99.83	0.868	0,687 - 1,000	97.90 (140/143)	93.99 - 99.57	0.812	0,605 - 1,000
HPV18	100 (143/143)	97.45 - 100.00	1.000	1.000 - 1.000	100 (143/143)	97.45 - 100.00	1.000	1.000 - 1.000
ВПЧ16 или HPV18	99.30 (142/143)	96.17 - 99.83	0.937	0,816 - 1,000	98.60 (141/143)	95.04 - 99.83	0.881	0,719 - 1,000
Другие ВПЧ	95.10 (136/143)	90.17 - 98.01	0.876	0,786 - 0,965	95.10 (136/143)	90.17 - 98.01	0.876	0,787 - 0,965
HR-HPV Положит	96.50 (138/143)	92.03 - 98.86	0.916	0,845 - 0,988	95.80 (137/143)	91.09 - 98.44	0.889	0,820 - 0,978

ССЫЛКИ

1. Burd EM. [Human papillomavirus and cervical cancer.] Clin Microbiol Rev. (2003) 16(1): 1-17
2. Castle PE. [The potential utility of HPV genotyping in screening and clinical management.] J Natl Compr Canc Netw. (2008) 6(1): 83-95
3. Chris JM, Peter JS, Philip EC. [Clinical utility of HPV genotyping.] Gynecol Oncol. (2006) 103: 12-17
4. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Res. (2007) 35(6): e40
5. Chun JY. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin (2012) 1: 1-4
6. Giorgi Rossi P, Bisanzi S, Paganini I, Di Iasi A, Angeloni C, Scalisi A, Macis R, Pini MT, Chini F, Carozzi FM. [HPV
   Prevalence Italian Working Group Prevalence of HPV high and low risk types in cervical samples from the Italian
   general population: a population based study.] BMC Infect Dis. (2010) 20(10): 214
7. Hwang IT. [Cyclic-CMTA: An Innovative Concept in Multiplex Quantification.] Seegene Bulletin (2012) 1: 11-15
8. Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. [Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases.] Cancer. (2001) 93(1): 8-15
9. Lee DH. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin (2012) 1: 5-10
10. Li J, Mei J, Wang X, Hu L, Lin Y, Yang P. [Human papillomavirus type-specific prevalence in women with cervical intraepithelial neoplasm in Western China.] J Clin Microbiol. (2012) 50(3): 1079-1081
11. Novaes LC, Novaes MR, Simes-Barbosa A. [Diagnosis of human papillomatosis by polymerase chain reaction in cases of divergence between results of hybrid capture and papanicolaou cytology.] Braz J infect Dis. (2006) 10(3):169-172
12. Son S, Noh HT, An S. [Human papillomavirus status in cervical scrapes and biopsy specimens using the HPV genotyping DNA microarray.] Int J Gynaecol Obstet. (2006) 93(3): 258-259
13. Sun ZR, Ji YH, Zhou WQ, Zhang SL, Jiang WG, Ruan Q. [Characteristics of HPV prevalence among women in Liaoning province, China.] Int J Gynaecol Obstet. (2010) 109(2): 105-109
14. Wallace J, Woda BA, Pihan G. [Facile, Comprehensive High-Throughput Genotyping of Human Genital Papillomaviruses Using Spectrally Addressable Liquid Bead Microarrays.] J Mol Diagn. (2005) 7(1): 72-80
15. Ursu RG, Onofriescu M, Nemescu D, Iancu LS. [HPV prevalence and type distribution in women with or without cervical lesions in the Northeast region of Romania.] Virol J. (2011) 22(8): 558
16. Arbyn M, Snijders PJF, Meijer CJLM, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, Poljak M. [Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?] Clin Microbiol Infect. (2015) 21(9):817-826.

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ

Ключ к символам, используемым в руководстве и на этикетках.

Символ	Пояснение
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии
REF	Номер по каталогу
	Срок годности
	Верхний предел температуры
PRIMER	Олигонуклеотидная смесь для амплификации и детекции
ENZYME	Ферментная смесь
BUFFER	Буфер
WATER	Вода, не содержащая РНКаз
CONTROL +	Положительный контроль (ПК)
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Производитель
	Дата изготовления
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Внимание
	Содержит достаточное количество <n> тестов
UDI	Уникальный идентификатор устройства
rxns	Штрих-код реакции для автоматизированной системы экстракции

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

№ Кат.	Продукт	Размер
Серия Allplex™ HPV		
HP10371Z	**Allplex™ HPV HR Detection**	**25 ркcн**
HP10370X	**Allplex™ HPV HR Detection**	**100 ркcн**
HP10376L	**Allplex™ HPV HR Detection**	**100 ркcн x 8 наборов**
HP10373Z	Allplex™ HPV28 Detection	25 ркcн
HP10372X	Allplex™ HPV28 Detection	100 ркcн

Автоматизированные системы извлечения

65415-02	Микролаборатория NIMBUS IVD	EA
173000-075	Микролаборатория STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
SG71101	Seegene STARlet 96MPH	EA
SG72100	AIOS	EA
744300.4.UC384	Универсальный комплект картриджей STARMag 96 X 4	384T / 1 коробка
EX00036P EX00037P	Набор STARMag™ S96H N	480T / 1 коробка 960T / 1 коробка
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T / 1 коробка

Только для профессионального использования

Allplex™

HPV28 Detection

(Кат. № HP10372X, HP10373Z)

ПЦР-система Allplex™ для выявления вируса папилломы человека - 19 типов HPV высокого риска (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) и 9 типов низкого риска Типы HPV (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) из образцов шейки матки и самостоятельно собранных вагинальных образцов.

Для использования с

1. **CFX96™ Система обнаружения ПЦР в реальном времени (программное обеспечение CFX Manager™-IVD v1.6)**
2. **Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)**

CE

IVD **Только для диагностики *in vitro***

REF **HP10372X** Σ **100** REF Σ **25**

Seegene Inc.

Taewon Bldg., 91 Ogeum-ro, Songpa-gu, Seoul, Republic of Korea 05548

EC REP **Медицинские технологии Promedt Consulting GmbH Altenhofstrasse 80, D-66386 St.Ingbert, Германия**

Не доступно в США.

СОДЕРЖАНИЕ

УВЕДОМЛЕНИЯ **3**

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ ..... Ошибка! Закладка не определена.

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР **6**

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ **7**

РЕАГЕНТЫ **8**

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА **10**

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ **10**

ПРОТОКОЛ **11**

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ **20**

РЕЗУЛЬТАТЫ **42**

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ **45**

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ **47**

ССЫЛКИ **55**

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ **56**

УВЕДОМЛЕНИЯ

- Только для диагностики *in vitro*.
- Allplex™ HPV28 Detection должен выполнять квалифицированный, обученный персонал.
- Если этот продукт используется с **Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS и Seegene STARlet**, он обеспечивает максимум 5 отдельных прогонов.
- **Этот тест был валидирован для следующих типов образцов: образцы шейки матки и самостоятельно собранные вагинальные образцы**. Данный тест не был валидирован для других типов образцов.
- **Храните образцы ДНК при температуре -20℃ до использования, а во время работы - на льду.**
- Чувствительность анализа может снизиться, если образцы неоднократно замораживались/размораживались или хранились в течение длительного периода времени.
- Рабочий процесс в лаборатории должен быть однонаправленным.
- Надежность результатов зависит от правильности процедуры сбора, транспортировки, хранения и обработки образцов.
- Надевайте одноразовые перчатки и меняйте их перед входом в разные зоны. В случае загрязнения немедленно смените перчатки или обработайте их реагентом для обеззараживания ДНК.
- Принадлежности и оборудование должны быть закреплены за рабочими зонами и не должны перемещаться из одной зоны в другую.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих зонах лаборатории. При работе с образцами и реактивами надевайте одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты и средства защиты глаз. Мойте руки тщательно обрабатывайте образцы и реактивы для испытаний.
- Избегайте загрязнения реагентов при извлечении аликвот из пробирок с реагентами. Рекомендуется использовать стерильные одноразовые наконечники для пипеток.
- Не объединяйте реагенты из разных партий.
- Не используйте продукт после истечения годности.
- Не используйте все одноразовые предметы повторно.
- Используйте пробирки с завинчивающимися крышками и предотвращайте возможное разбрызгивание или перекрестное загрязнение образцов во время подготовки.
- Для предотвращения загрязнения реагентов рекомендуется использовать фильтрующие наконечники. Также будьте осторожны, чтобы не загрязнить реагенты извлеченными нуклеиновыми кислотами, продуктами ПЦР и положительными контролями. Используйте отдельные рабочие зоны для каждого эксперимента.
- Во избежание загрязнения рабочих зон амплифицированными продуктами открывайте пробирки или стрипы для ПЦР-реакции только в специально отведенных рабочих зонах после окончания амплификации.

- Храните положительные материалы отдельно от реагентов набора.
- При работе с образцами необходимо соблюдать правила лабораторной безопасности (см. раздел «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях» и документы CLSI). Тщательно очистить и продезинфицировать все рабочие поверхности с помощью 0,5% гипохлорита натрия (в деионизированной или дистиллированной воде). Компоненты продукта (остатки продукта, упаковка) могут рассматриваться как лабораторные отходы. Утилизируйте неиспользованные реагенты и отходы в соответствии с действующими федеральными, государственными и местными нормами.
- Срок годности составляет 13 месяцев при температуре ≤ -20℃ с даты изготовления. Срок годности указан на этикетке.
- Seegene NIMBUS и Seegene STARlet — это то же самое оборудование, что и микролаборатория NIMBUS IVD и Microlab STARlet IVD, отличается только производитель. Поскольку аппаратные изменения в приборе отсутствуют, результаты тестирования одинаковы.
- Фирменное наименование «CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD» изменено на «CFX96 Система ™ Dx». Поскольку аппаратные изменения в системах отсутствуют, ожидается, что обе системы дадут одинаковые результаты.
- «CFX Manager ™ Dx Software v3.1» — это обновленная версия «CFX Manager ™ Software-. IVD v1.6». Обновленное программное обеспечение включает улучшения в меню "Run" Эти усовершенствования не влияют на результаты анализа данных, поэтому результаты, полученные с помощью двух программ, одинаковы.
- Этот набор предназначен для помощи в дифференциальной диагностике инфекций, вызванных целевыми патогенами: вирусами папилломы человека.
- Самостоятельный сбор должен проводиться в медицинском учреждении по указанию медицинского работника.
- **AIOS** сочетает в себе Seegene STARlet, продаваемый компанией Seegene, с оборудованием для ПЦР в реальном времени (CFX96 Dx, производитель: Bio-Rad) и герметизатором планшетов (производитель: SAMICK THK), образуя автоматизированную структуру соединения выделения нуклеиновых кислот с ПЦР.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Allplex™ HPV28 Detection - медицинский прибор для диагностики *in vitro*, предназначенный для качественного выявления вирусов папилломы человека в образцах шейки матки или самостоятельно собранных вагинальных образцах.

Allplex™ HPV28 Detection состоит из двух реакций ПЦР (A и B MOM).

A MOM — это мультиплексный анализ, позволяющий одновременно амплифицировать целевую ДНК 14 высокорисковых вирусов папилломы человека.

B MOM — это мультиплексный анализ, позволяющий одновременно амплифицировать целевую ДНК 5 высокорисковых и 9 низкорисковых вирусов папилломы человека.

Категория	Типы
A MOM	**14 типов HPV высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)**
B MOM	**5 типов HPV высокого риска (26, 53, 69, 73, 82)** **9 типов HPV низкого риска (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70)**

ОБЗОР ПРИНЦИПОВ И ПРОЦЕДУР

1. Принципы

Allplex™ HPV28 Detection — это мультиплексный анализ ПЦР в реальном времени, позволяющий одновременно амплифицировать и обнаруживать целевые нуклеиновые кислоты 19 типов HPV высокого риска (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) и 9 типов HPV низкого риска (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70), а также внутренний контроль (ВК).

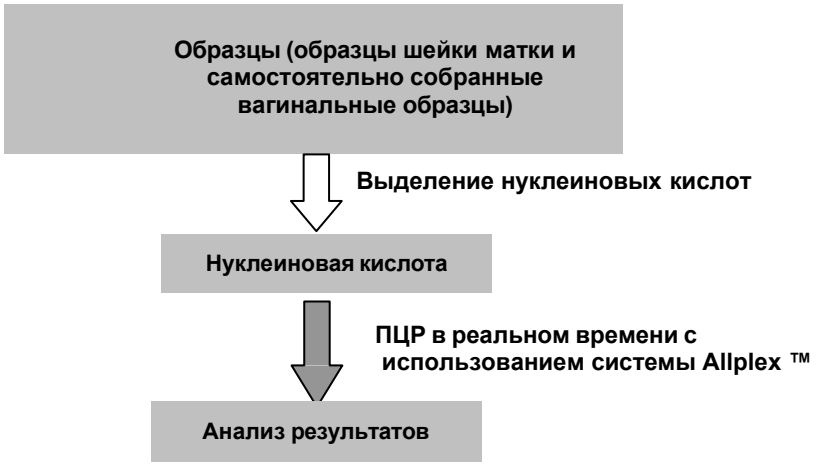
Для проведения мультиплексной амплификации и детекции мишеней в одной реакции в этом наборе используются инновационные запатентованные технологии DPO™, TOCE™, MuDT™ и 3 Ct компании Seegene. Технология 3 Ct позволяет получить значение Ct для трех целей в одном канале без ущерба для чувствительности и специфичности. Присутствие определенных генных последовательностей в реакции отображается в виде значения Ct с помощью аналитического программного обеспечения Seegene Viewer.

В ПЦР эффективность амплификации может снижаться из-за ингибиторов, которые могут присутствовать в клинических образцах. В продукт включен внутренний контроль (ВК) в качестве эндогенного контроля всего процесса, чтобы отслеживать изоляцию нуклеиновых кислот и проверять возможное ингибирование ПЦР. Внутренний контроль совместно амплифицируется с целевыми нуклеиновыми кислотами в клинических образцах.

Allplex™ HPV28 Detection использует ген домашнего хозяйства человека в качестве эндогенного внутреннего контроля, который может обеспечить экстракцию ДНК, верификацию реакции ПЦР и оценку адекватности клеток из каждого образца.

Для предотвращения попадания продукта амплификации в качестве потенциального загрязняющего вещества, в Allplex™ HPV28 Detection используется система Uracil-DNA гликозилазы (UDG)-dUTP. Система UDG-dUTP обычно применяется при проведении ПЦР для устранения переноса ампликонов, используя UDG для эксцизии остатков урацила из ДНК путем разрыва N-гликозидной связи.

2. Обзор процедур



СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Инфицирование вирусом папилломы человека (HPV) связано с раком шейки матки. HPV можно разделить на группы «высокого риска (ВР)» и «низкого риска (НР)» на основании их связи с поражением шейки матки. Поэтому очень важно знать, каким типом HPV инфицирована пациентка, чтобы предотвратить развитие рака и передачу заболевания. В настоящее время основные коммерческие продукты для диагностики HPV основаны на методе зондовой гибридизации для выявления и/или генотипирования HPV. Однако основным недостатком методов, основанных на гибридизации зондов, является высокий процент ложноположительных результатов из-за перекрестной реактивности между зондами и различными видами вирусной ДНК или ПЦР-ампликонами, используемыми для гибридизации. Здесь мы представляем инновационную систему обнаружения/генотипирования HPV, которая амплифицирует только специфические мишени без перекрестной реактивности и автоматизирована в обнаружении методом ПЦР в реальном времени. Продукт специфически выявляет только истинные HPV и точно генотипирует их. Он также содержит эндогенный внутренний контроль (ВК) для проверки любого ингибирования, которое может произойти во время ПЦР-реакции.

Рак шейки матки, который прогрессирует от предраковой стадии до инвазивного рака, имеет 7-20 лет предраковой стадии; следовательно, ранняя диагностика возможна при подозрении на HPV-инфекцию. Группа HPV высокого риска может привести к развитию рака шейки матки; в частности, HPV16 и 18 ассоциируются с 70% случаев рака шейки матки. С другой стороны, группа HPV низкого риска, включая HPV6 и 11, может вызывать генитальные бородавки. Allplex™ HPV28 Detection позволяет выявить 19 типов HPV высокого риска, включая HPV16 и 18, а также обнаружить 9 HPV низкого риска. типы, такие как HPV6 и 11, одновременно.

РЕАГЕНТЫ

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 100 реакций.

Информация для заказа (REF HP10372X).

Allplex™ HPV28 Detection			
Символы	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	HPV28 A MOM	500 мкл	Олиго микс: - Реагенты для амплификации и детекции
PRIMER	HPV28 B MOM	500 мкл	Олиго микс: - Реагенты для амплификации и детекции
ENZYME	EM4	500 мкл X 2	- ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (УДГ) - Буфер, содержащий dNTPs
BUFFER	Буфер EM4	500 мкл X 2	Буфер для ПЦР в реальном времени - Буфер, содержащий BSA и глицерин
CONTROL +	Allplex HPV28 PC1	100 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV28 PC2	100 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV28 PC3	100 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл X 2	ультрачистое качество, подходящее для ПЦР»
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для анализа
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

Реагентов, содержащихся в одном наборе, достаточно для 25 реакций.

Информация для заказа (REF HP10373Z).

Allplex™ HPV28 Detection			
Символы	**Содержание**	**Объем**	**Описание**
PRIMER	HPV28 A MOM	125 мкл	Олиго микс: - Реагенты для амплификации и детекции
PRIMER	HPV28 B MOM	125 мкл	Олиго микс: - Реагенты для амплификации и детекции
ENZYME	EM4	125 мкл X 2	- ДНК-полимераза - Урацил-ДНК гликозилаза (UDG) - Буфер, содержащий dNTPs
BUFFER	Буфер EM4	125 мкл X 2	Буфер для ПЦР в реальном времени - Буфер, содержащий BSA и глицерин
CONTROL +	Allplex HPV28 PC1	100 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV28 PC2	100 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
CONTROL +	Allplex HPV28 PC3	100 мкл	Положительный контроль (ПК): - Смесь клонов патогенов
WATER	Вода, не содержащая РНКаз	1,000 мкл X 2	ультрачистое качество, подходящее для ПЦР»
	Руководство пользователя		

Дополнительный продукт - программное обеспечение для анализа
Seegene Viewer*

* Программное обеспечение для анализа предоставляется компанией Seegene Inc. или региональным менеджером. Пожалуйста, используйте Seegene Viewer beyond V3.

ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА

Все компоненты Allplex™ HPV28 Detection следует хранить ≤-20℃. Все компоненты стабильны при рекомендуемых условиях хранения до истечения срока годности, указанного на этикетке.

На работоспособность компонентов набора не влияет 5-кратное замораживание и оттаивание. Если реагенты будут использоваться только периодически, их следует замораживать в аликвотах.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Одноразовые неопудренные перчатки (латексные или нитриловые)
- Пипетки (регулируемые) и стерильные наконечники для пипеток
- Микроцентрифужная пробирка объемом 1,5 мл
- Набор для выделения нуклеиновых кислот (см. Выделение нуклеиновых кислот)
- Льдогенератор
- Настольная центрифуга
- Вихревой смеситель
- CFX96™ Система детекции ПЦР в реальном времени (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- Оптические плоские полоски на 8 колпачков (кат. номер TCS0803, Bio-Rad)
- Низкопрофильные стрипы на 8 пробирок объемом 0,2 мл без крышек (цвет белый, кат. номер TLS0851, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые (кат. № HSP9655, Bio-Rad)
- Hard-Shell® 96-луночные планшеты для ПЦР, низкопрофильные, тонкостенные, с бортиком, белые/белые, со штрих-кодом (кат. № HSP9955, Bio-Rad)
- Система управления крышкой флакона (кат. № 6600532-01, Hamilton)
- AIOS (кат. номер SG72100, Seegene)
- Прокалываемый колпачок (кат. № 922119, SPL) (только для использования в AIOS)
- Постоянная прозрачная термозапечатка (кат. № 1814035, Bio-Rad)*.
- Герметизатор для ПЦР-планшетов PX1 (автоматический герметик, кат. № 181-4000, Bio-Rad)*.
- Чистая скамейка

* Убедитесь, что вы используете термозапайку и запайщик планшетов, перечисленные выше, вместе.

ПРОТОКОЛ

1. Сбор, хранение и транспортировка образцов

Примечание: Все образцы должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы. Разрешается использовать только те образцы, при сборе, хранении и транспортировке которых строго соблюдаются следующие правила и инструкции:

Образец шейки матки

Самостоятельно собранный вагинальный образец

Примечание: чтобы обеспечить высокое качество образцов, их следует транспортировать как можно быстрее. Образцы должны транспортироваться при указанных температурных условиях.

A. Сбор образцов

Образец шейки матки

Для взятия образца шейки матки, пожалуйста, используйте следующие материалы:

- Образцы шейки матки можно собирать и транспортировать в следующих средах: - eNATTM (COPAN, Италия), ThinPrep® (HOLOGIC, США), SurePathTM (Becton-Dickinson, США) или CellPreserv (Kolplast, Бразилия)

Набор для сбора образцов из шейки матки	Производитель	Кат.№
eNAT PM 2ML L-ОБРАЗНЫЙ АППЛИКАТОР	COPAN	606CS01L

- Оставьте мазок в транспортной среде. Закройте и промаркируйте контейнер с образцом. Строго соблюдайте инструкции по хранению и транспортировке.
- Следуйте рекомендованному протоколу для сбора клеток столбчатого и сквамозного эпителия после удаления цервикальной слизи.

Самостоятельно собранный вагинальный образец

- Для сбора вагинального образца, собранного самостоятельно, пожалуйста, используйте следующий материал:

- Rovers® Evalyn® Brush (Rovers Medical Devices B.V., Нидерланды

Устройство для самостоятельного взятия проб			Производитель	Кат.№
	Rovers® Evalyn® Brush		Rovers Medical Devices B.V.	380500131

- Самостоятельно собранный вагинальный образец можно собрать и хранить в растворе ThinPrep® PreservCyt .®
- Следуйте инструкциям производителя устройства для взятия проб и транспортной среды для сбора и хранения образцов клеток влагалища.

B. Хранение и транспортировка

Образец	СМИ	Продолжительность хранения и транспортировки*	
		2~8℃**	Комнатная температура**
Образец шейки матки	eNATTM	90 дней	90 дней
	ThinPrep®	90 дней	90 дней
	SurePathTM	90 дней	90 дней
	CellPreserv	90 дней	90 дней
Самостоятельно собранный вагинальный образец	ThinPrep®	90 дней	90 дней

* Продолжительность: Образец, собранный в период до испытания, включая хранение и транспортировку образца до испытания.

** Оптимальная температура для транспортировки составляет 2~25℃.

Примечание: Длительное хранение образцов может повлиять на эффективность.

Примечание: Образцы также должны соответствовать местным и национальным инструкциям по транспортировке патогенного материала.

.

2. Выделение нуклеиновых кислот

Различные производители предлагают наборы для выделения нуклеиновых кислот. Используйте необходимое количество образца в соответствии с используемым протоколом. Следующие наборы для экстракции были одобрены для использования с данным набором.

[Методы экстракции в различных средах].

Примечание: пожалуйста, используйте автоматическую систему экстракции в соответствии со средой, указанной в следующей таблице.

		Автоматизированная система извлечения		
Образец	**транспортная среда**	**Microlab NIMBUS IVD / STARlet IVD**	**Seegene NIMBUS / STARlet**	SEEPREP32
		Универсальный комплект картриджей	**Универсальный комплект картриджей**	**STARMag 96 ProPrep**
Образец шейки матки	eNAT	O	O	O
	ThinPrep®	O	O	O
	SurePath™	O	O	X
	CellPreserv	O	O	O
Самостоятельно собранный вагинальный образец	ThinPrep®	O	O	O

Дополнительно: Система управления крышками флаконов может использоваться с Microlab STARlet IVD и Seegene STARlet.

Дополнительно: AIOS можно использовать с Seegene STARlet.

A. Предварительная обработка ThinPrep® и SurePath™

- Доведите образцы до комнатной температуры (19~25℃).
- Центрифугируйте 1 мл образца в течение 15 минут при 15 000 x *g* (13 000 об/мин).
- Супернатант необходимо удалить. После этого рекомендованный объем (200~300 μЛ, см. Рекомендуемый объем 2-C) следует ресуспендировать в лизирующем буфере или 1X PBS, тщательно перемешивая, чтобы полностью растворить.»

Примечание: выполните этап предварительной обработки с использованием 1X PBS, если образцы собраны в среде ThinPrep .®

Примечание: если образцы собраны в среде SurePathTM, выполните этап предварительной обработки с использованием лизирующего буфера из набора для экстракции.

Примечание: носители ThinPrep® и SurePathTM можно обрабатывать без предварительной обработки при использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS или Seegene STARlet

Примечание: CellPreserv и eNAT не требуют предварительной обработки.

B. Подготовка образцов

- Доведите образцы до комнатной температуры (19~25℃).
- Для образцов шейки матки и самостоятельно собранных вагинальных образцов, содержащих мазок/щетку в транспортном носителе, образцы следует тщательно перемешать.
- Крышки с пробирок для образцов необходимо снимать осторожно, чтобы избежать загрязнения. Любые излишки слизь в образце следует удалить, собрав ее на тампон/кисточку. Оставшуюся жидкость со слизи и тампона/кисточки следует выжать, прижав тампон/кисточку к стенке пробирки. Наконец, тампон/кисточку и слизь следует удалить и выбросить.
- Образцы из раствора eNAT можно обрабатывать непосредственно из их первичного контейнера.

C. Автоматизированная система выделения нуклеиновых кислот

Примечание: пожалуйста, используйте рекомендуемые объемы образца и элюирования, указанные ниже. Для других объемов см. протокол производителя.

C-1. Microlab NIMBUS IVD

Примечание: см. руководство по эксплуатации Microlab NIMBUS IVD.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Microlab NIMBUS IVD	Hamilton	65415-02*	-
STARMag 96 X 4 Универсальный комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc.

C-2. Microlab STARlet IVD

Опция: Система предварительного анализа (см. эксплуатации системы управления крышками флаконов)

Автоматизированная система предварительного анализа	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Система управления крышками флаконов	Hamilton	6600532-01*	-

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

ПРИМЕЧАНИЕ: система управления крышками флаконов может использоваться с ThinPrep® и CellPreserv.

Примечание: см. руководство по эксплуатации **Microlab STARlet IVD.**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Microlab STARlet IVD	Hamilton	173000-075*	-
STARMag 96 X 4 Универсальный комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

C-3. Seegene NIMBUS

Примечание: См. руководство по эксплуатации Seegene NIMBUS.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем.
Seegene NIMBUS	Seegene	65415-03	-
STARMag 96 X 4 Универсальный комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

C-4. Seegene STARlet

Опция: Система предварительного анализа (см. эксплуатации системы управления крышками флаконов)

Автоматизированная система предварительного анализа	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Система управления крышками флаконов	Hamilton	6600532-01*	-

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот номер каталога.

ПРИМЕЧАНИЕ: Система управления крышками флаконов может использоваться с ThinPrep® и CellPreserv.

Опция: Автоматизированная структура соединения (см. Руководство по эксплуатации AIOS)

Автоматизированная структура связей	Производитель	Кат. №.
AIOS	Seegene	SG72100*

* Если вы хотите приобрести вышеуказанные продукты у компании Seegene Inc, пожалуйста, используйте этот каталожный номер.

ПРИМЕЧАНИЕ: замените колпачок положительного контроля (ПК) на колпачок с возможностью прокалывания. После завершения операции замените крышку положительного контроля (ПК) оригинальной крышкой.

ПРИМЕЧАНИЕ: Прокалываемый колпачок является одноразовым изделием и подлежит утилизации после одного использования.

ПРИМЕЧАНИЕ: если этот продукт используется с AIOS, применяемым Seegene STARlet, он обеспечивает максимум 3 отдельных запуска.

Примечание: См. руководство по эксплуатации **Seegene STARlet**.

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
Seegene STARlet	Seegene	67930-03	-
STARMag 96 X 4 Универсальный комплект картриджей	Seegene	744300.4. UC384	Образец: 300 мкл Элюирование: 100 мкл

C-5. SEEPREP32

Примечание: Продолжайте процесс извлечения, используя **«Протокол A».**

Автоматизированная система извлечения	Производитель	Кат. №.	Рекомендуемый обьем
SEEPREP32	Seegene	SG71100	-
STARMag 96 ProPrep (тип планшета)	Seegene	EX00009P	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл
STARMag 96 ProPrep (тип пробирки)	Seegene	EX00009T	Образец: 200 мкл Элюирование: 100 мкл

3. Подготовка к ПЦР в реальном времени

Примечание: при использовании Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS и Seegene STARlet для выполнения этого шага обратитесь к руководству по эксплуатации каждого прибора.

Примечание: необходимо использовать правильные пробирки и колпачки (см. раздел МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМЫ, НО ПРЕДОСТАВЛЕНЫ

Примечание: при подготовке образцов необходимо использовать аэрозолеустойчивые фильтрующие наконечники и плотные перчатки. Будьте предельно осторожны, чтобы исключить перекрестное загрязнение.

Примечание: полностью разморозьте реагенты на льду.

Примечание: кратко прокрутите пробирки с реагентами, чтобы удалить капли с внутренней крышки.

Примечание: **Этапы A~D выполняются автоматически на приборах Microlab NIMBUS IVD, Microlab STARlet IVD, Seegene NIMBUS и Seegene STARlet. Обратитесь к руководству по эксплуатации каждого прибора.**

A. Приготовьте мастер-микс для ПЦР.

5 мкл	HPV28 A MOM или B MOM
5 мкл	EM4
5 мкл	Буфер EM4
15 мкл	Общий объем ПЦР-мастермикса

Примечание: Рассчитайте необходимое количество каждого реагента в зависимости от количества реакций (образцы + контроль).

B. Перемешайте, переворачивая пробирки 5 раз или быстро перемешивая в вихревой мешалке, и быстро перемешайте содержимое пробирок.

C. Аликвотируйте 15 мкл ПЦР-мастермикса в пробирки для ПЦР.

D. Добавьте 5 мкл нуклеиновых кислот каждого образца в пробирку с мастермиксом для ПЦР.

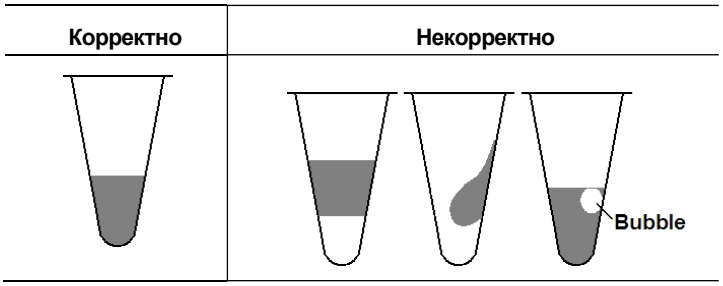
реакции

15 мкл	Мастермикс для ПЦР
5 мкл	Нуклеиновая кислота
20 мкл	Общий объем образца

E. Закройте и ненадолго прокрутите пробирки для ПЦР.

F. Убедитесь, что жидкость, содержащая все компоненты ПЦР, находится на дне каждой пробирки ПЦР. Если нет, снова центрифугируйте на более высоких оборотах в течение более длительного времени

Примечание: перед проведением ПЦР рекомендуется прокрутить пробирки, чтобы удалить пузырьки воздуха и собрать остатки жидкости на дне пробирок.



Bubble	Пузыри воздуха

Примечание: для каждого образца используйте новый стерильный наконечник пипетки.

Примечание: для **отрицательного контроля (ОК)** используйте 5 мкл «**RNase-free Water»** вместо нуклеиновой кислоты образца.

Примечание: для **положительного контроля (ПК)** используйте 5 мкл «**Allplex HPV28 PC1», «Allplex HPV28 PC2» и «Allplex HPV28 PC3»** вместо нуклеиновой кислоты образца.

Примечание: Будьте осторожны, чтобы не допустить перекрестного загрязнения мастер-миксов для реакций и образцов положительным контролем.

Примечание: не маркируйте реакционную пробирку на ее крышке. Флуоресценция обнаруживается в верхней части каждой реакционной пробирки.

- **Положительный контроль**

В набор входят 3 пробирки с положительным контролем: Allplex HPV28 ПК 1, ПК 2 и ПК 3.

Каждый ПК включает клоны для 5 мишеней в A MOM (14 типов высокого риска и ВК) и 5 мишеней в B MOM (5 типов высокого риска, 9 типов низкого риска и ВК).

Примечание: для проведения реакции положительного контроля подготовьте 3 ПЦР-пробирки для каждого набора, всего 6 ПЦР-пробирок;

для A MOM первая пробирка с ПК1, вторая пробирка с ПК2 и третья пробирка с ПК 3.

Для B MOM первая пробирка с ПК1, вторая пробирка с ПК 2 и третья пробирка с ПК 3

(см. результаты ниже).

Положительный контроль A MOM

Наименование	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670			Quasar 705			Автоматическая интерпретация
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	ВК	35	18	56	68	31	
ПК 1	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	Положительный контроль (+
ПК 2	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	Положительный контроль (+
ПК 3	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	+	Положительный контроль (+

Положительный контроль B MOM

Наименование	FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670			Quasar 705			Автоматическая интерпретация
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	ВК	35	18	56	68	31	
ПК 1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Положительный контроль (+
ПК 2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	Положительный контроль (+
ПК 3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Положительный контроль (+

НАСТРОЙКА И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

1. CFX96™ Система детекции ПЦР в реальном времени (CFX Manager™ Software-IVD v1.6)

1.1. Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad) может быть разделена на 3 этапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск эксперимента

A. Настройка протокола

1) В главном меню выберите **File→ New→ Protocol** (**Файл→ Новый→ Протокол)**, чтобы открыть **Protocol Editor (Редактор протоколов)**.

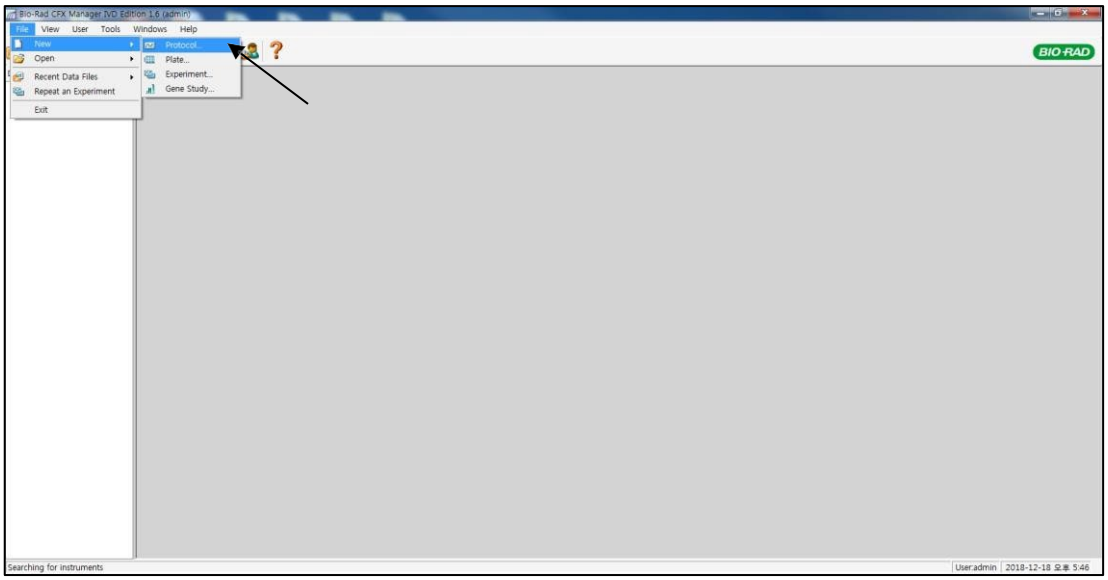


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **«Protocol Editor» («Редакторе протоколов»)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	95 C°	15 мин
2	45	95 C°	3 сек
3*		60 C°	10 сек
4*		72 C°	10 сек
5*		83 C°	5 сек

Примечание*: Считывание планшета на шаге 3, 4 и 5. Флуоресценция определяется при 60°C, 72°C и 83°C.

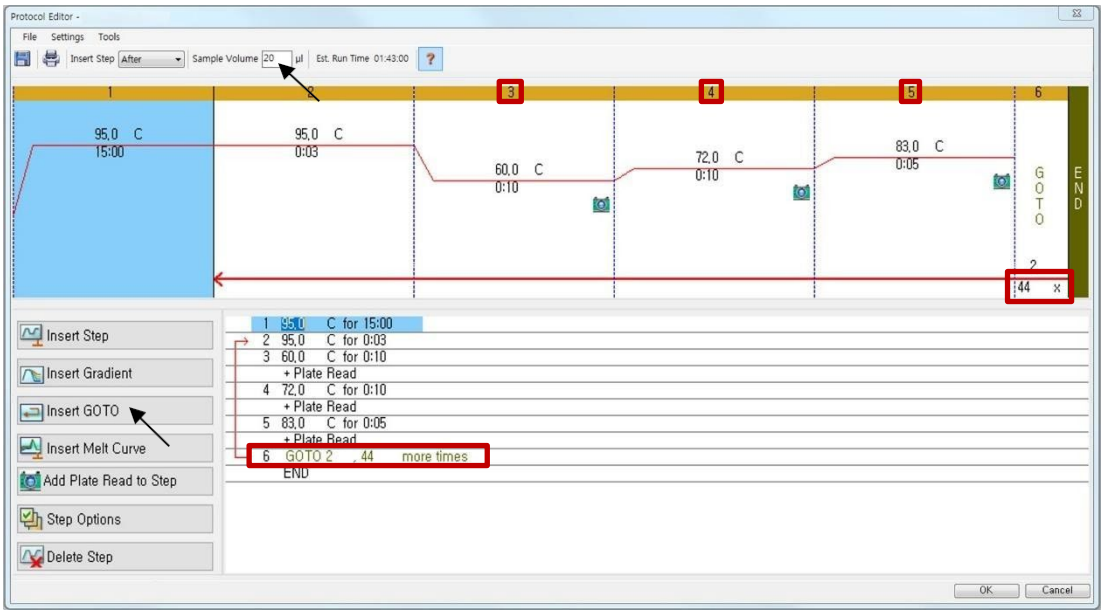


Рис. 2. **Редактор протоколов**

Примечание: Нажмите на кнопку «**Insert GOTO**» **«Вставить GOTO»** и введите **«GOTO 2, 44 more times»** («**GOTO 2, еще 44 раза**») на шаге 6.

3) Нажмите на поле рядом с **«Sample Volume» («Объем образца»)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл

4) Нажмите **OK** и сохраните протокол, чтобы открыть окно **«Experiment Setup» («Настройка эксперимента»)**.

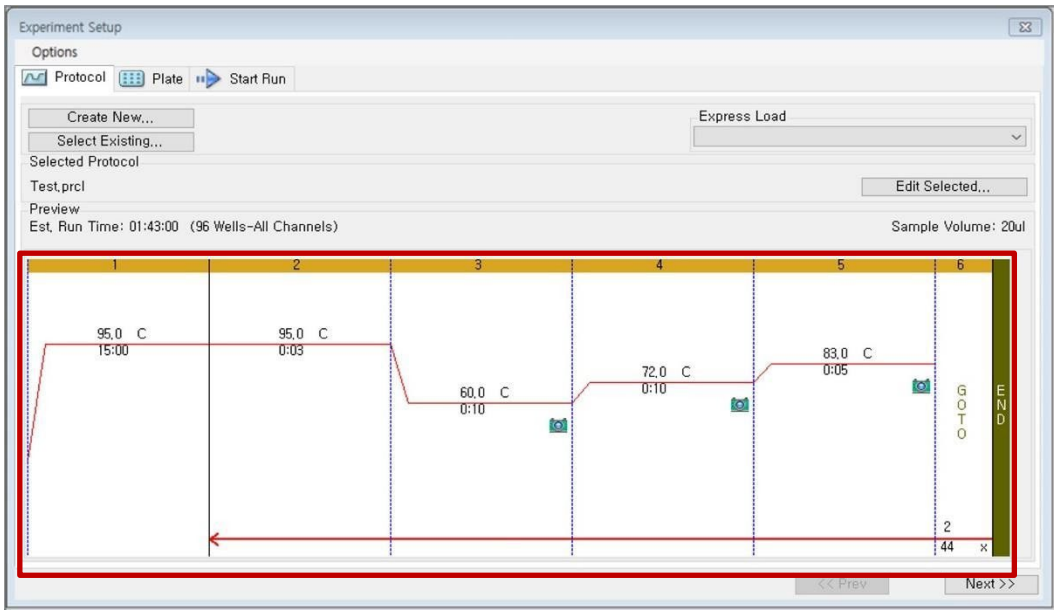


Рис. 3. **Настройка эксперимента: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **«Plate» («Планшет»)** в **«Experiment Setup» («Настройка эксперимента»)** нажмите **«Create New» («Создать новый»)**, чтобы открыть окно **«Plate Editor» («Редактор планшета»).**

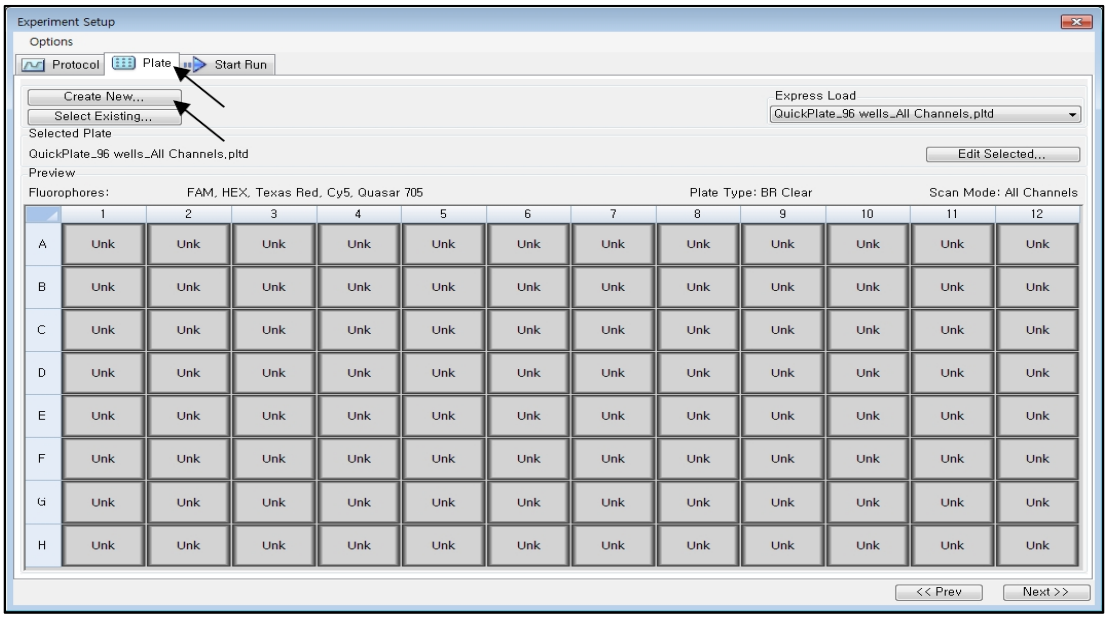


Рис. 4. **Редактор планшета**

1) Нажмите кнопку **«Select Fluorophores» («Выбрать флуорофоры»),** чтобы указать флуорофоры (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610, Quasar 670 и Quasar 705),*** которые будут использоваться, и нажмите **«OK».**

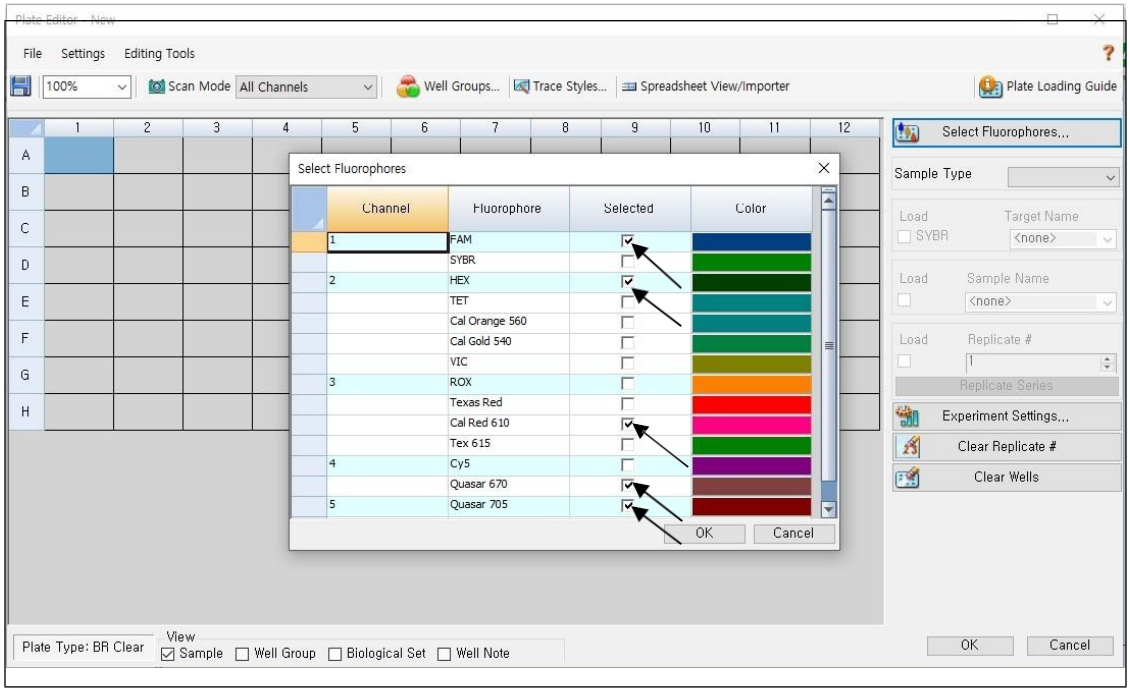


Рис. 5. **Выбор флуорофоров** (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610, Quasar 670*** и ***Quasar 705***)

2)Выберите лунки, в которые будет помещена ПЦР-пробирка, и выберите тип образца из списка раскрывающегося меню **«Sample Type» («Тип пробы»)**.

- ***Неизвестный***: Клинические образцы
- ***Отрицательный контроль***
- ***Положительный контроль***)

3) Нажмите на соответствующие флажки (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610, Quasar 670*** и ***Quasar 705***) чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

4) Введите **«Sample Name» («Имя Образца» и PC (PC1, PC2** и **PC3)**, а затем нажмите клавишу ввода.

5) В разделе «Settings» («**Настройки**») главного меню «Plate Editor» («**Редактора планшетов**») выберите **«Plate Size (96 wells)» («Размер планшета» (96 лунок)** и **«Plate Type» (BR WHITE) («Тип Планшета» (BR белый).**

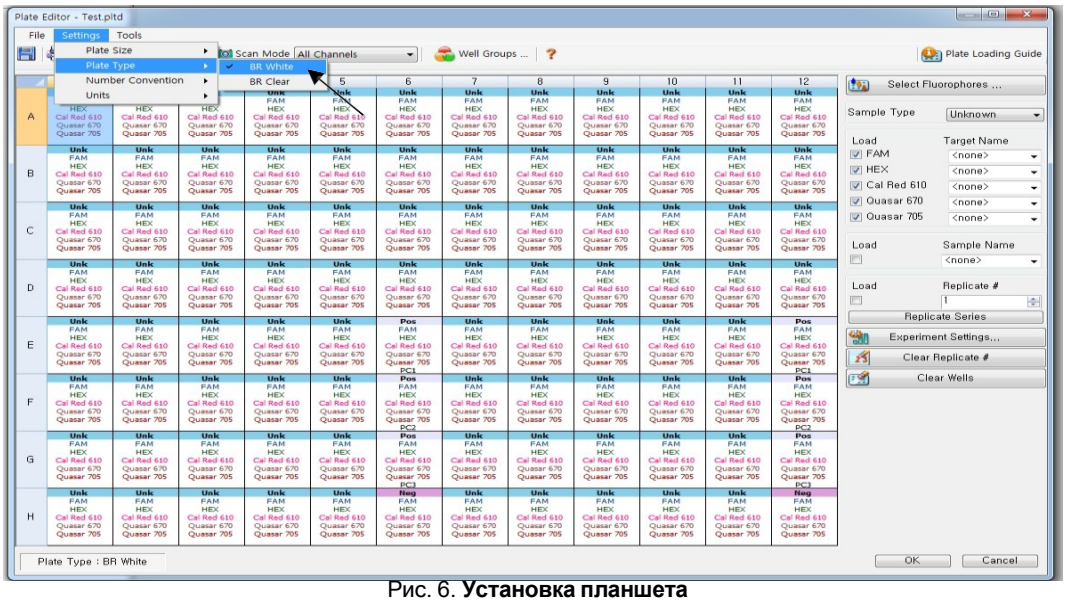


Рис. 6. **Установка планшета**

6) Нажмите **«OK»,** чтобы сохранить новый планшет.

7) Вы вернетесь в окно **«Experiment Setup» («Настройка эксперимента»).**

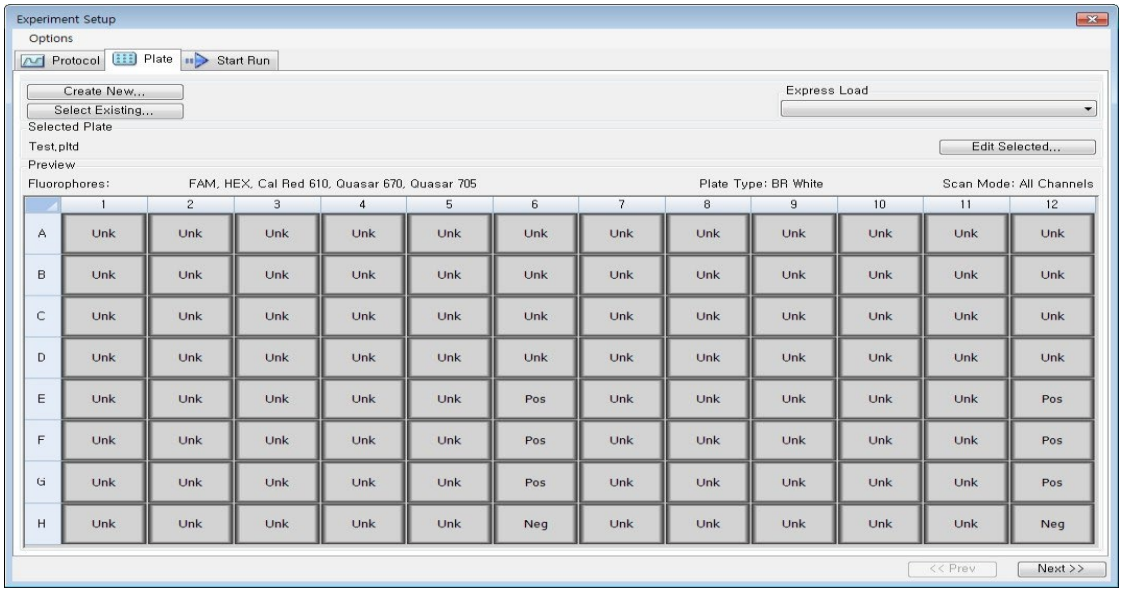


Рис. 7. **Настройка эксперимента: Планшет**

8) Нажмите **«Next» («Далее»)**, чтобы начать запуск.

C. Начать запуск

2) На вкладке **«Start Run» («Начать выполнение»)** в разделе **«Experiment Setup» («Настройка Эксперимента»)** нажмите **«Close Lid» («Закрыть крышку»)**, чтобы закрыть крышку прибора.

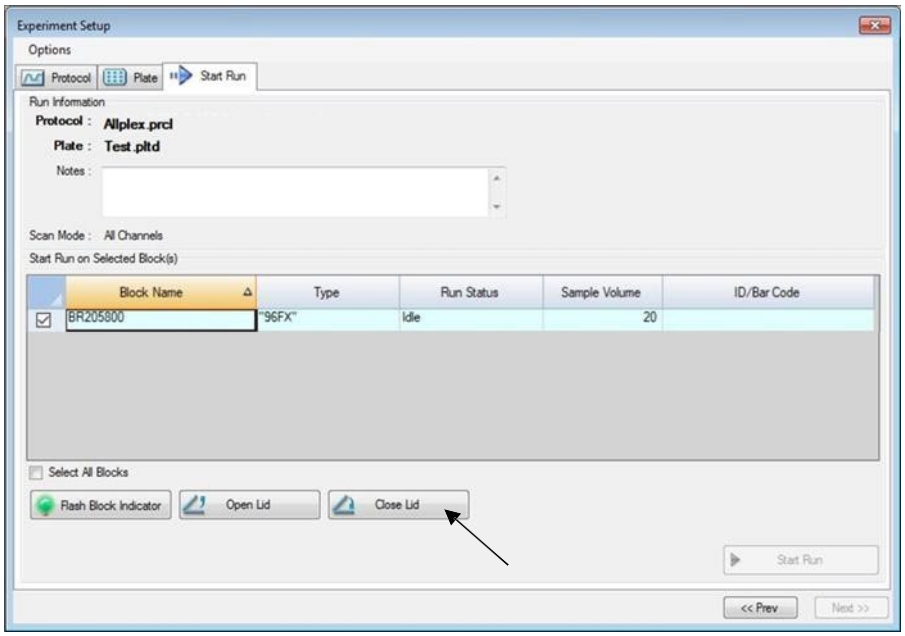


Рис. 8. **Закрыть крышку**

1) Нажмите кнопку **«Start Run» («Начать выполнение»)**.

2) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку «**SAVE» («Сохранить»)**, и запуск начнется.

1.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные всех этапов детекции кривых амплификации из файла результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть по желанию пользователя (Для функции 'Экспорт Seegene ', папки «QuantStep3», «QuantStep4» и «QuantStep5» автоматически создаются для сохранения данных каждой кривой амплификации в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX96™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **«Quantitation» («Количественная оценка»)**, чтобы увидеть результаты кривой амплификации.

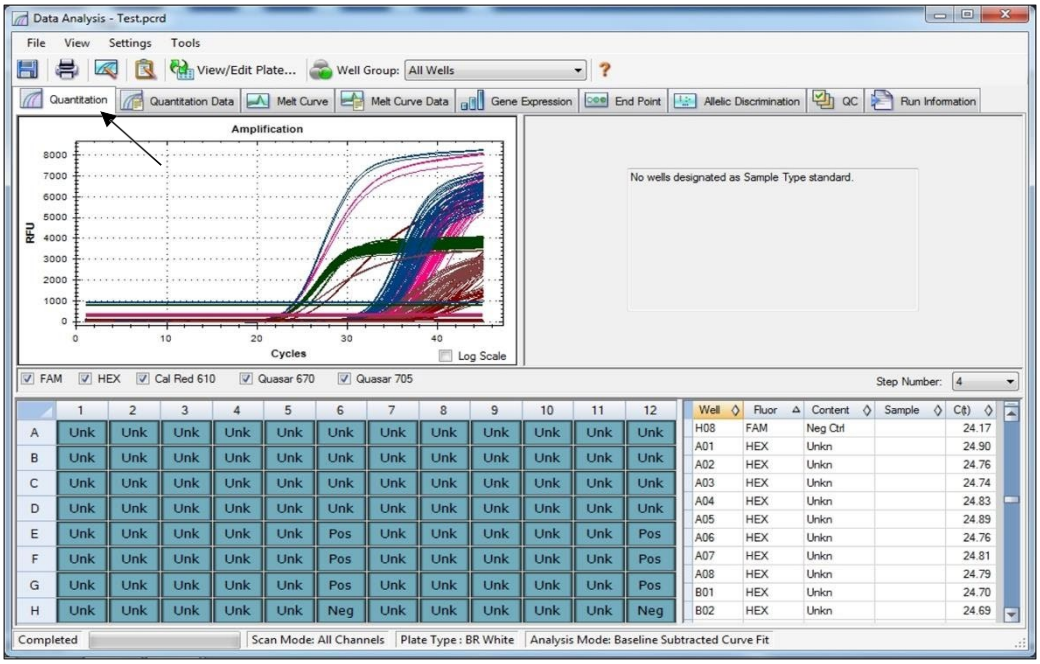


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

1) Выберите **«No Baseline Subtraction» («Без вычитания базовой линии»)** в пункте Analysis Mode (Режим анализа) меню Settings (Настройки).

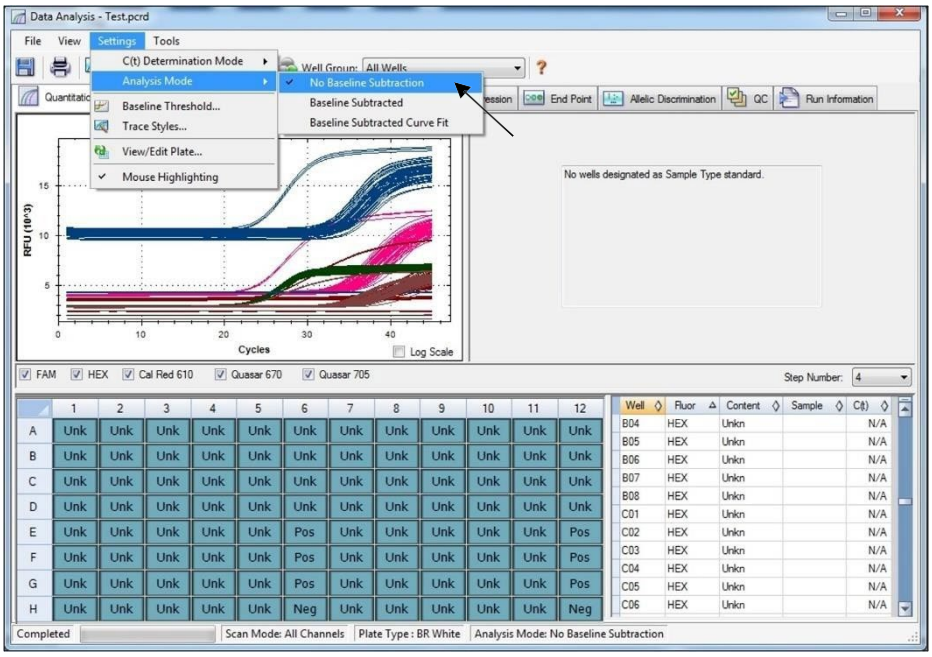


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

1) Выберите **«Seegene Export» («Экспорт Seegene»)** в меню Tools (Инструменты).

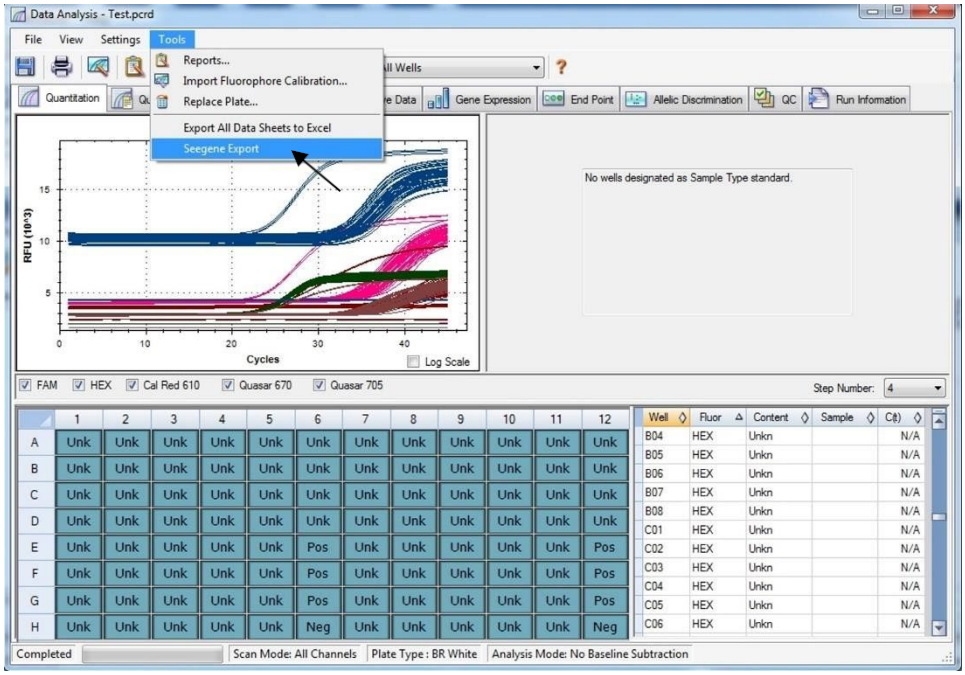


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

2) Выберите место для сохранения данных и нажмите **«ОК»**.

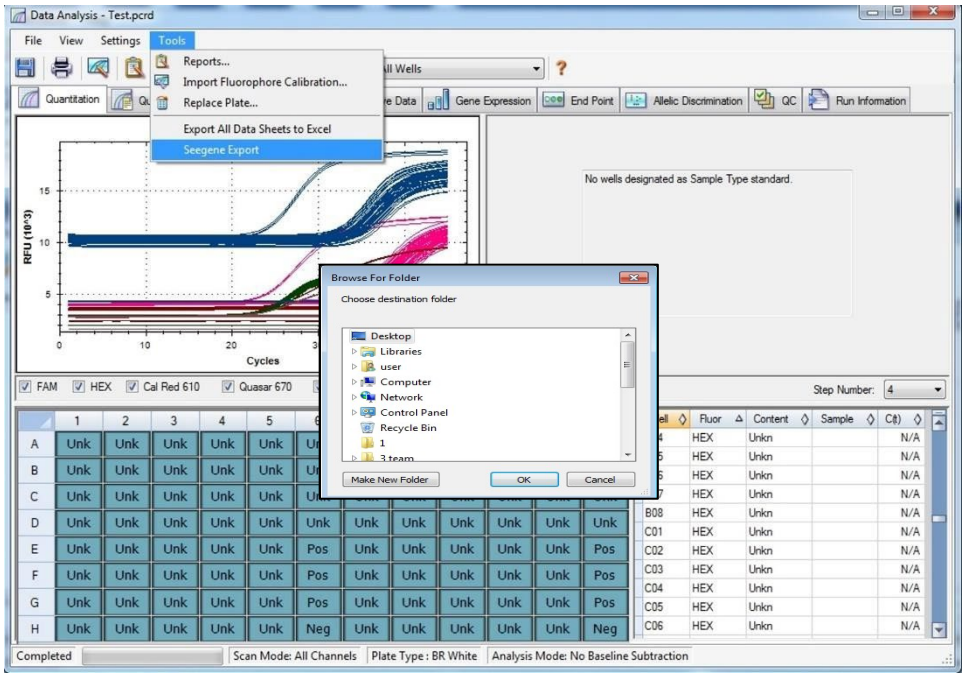


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

2) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **«Option» («Параметры»)**, чтобы выбрать ***CFX96* или *CFX96 Dx*** в **«Instrument» («Инструмент»).**

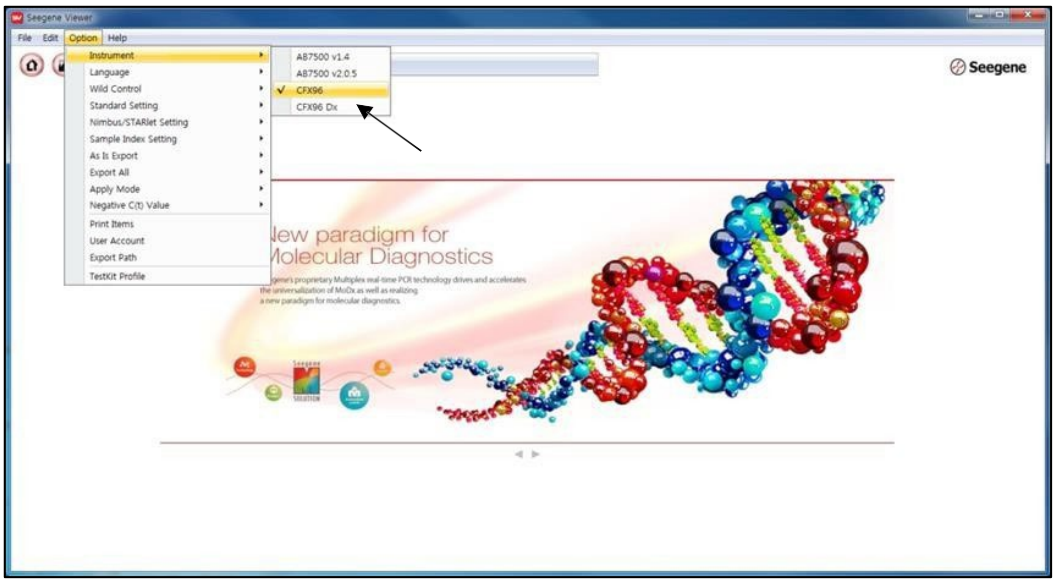


Рис. 13. **Seegene Viewer**

1) Нажмите **«Open» («Открыть»)**, чтобы найти сохраненный файл в папке «QuantStep3», откройте файл результатов и выберите тестовый набор из меню **«PRODUCT» («ПРОДУКТ»).**

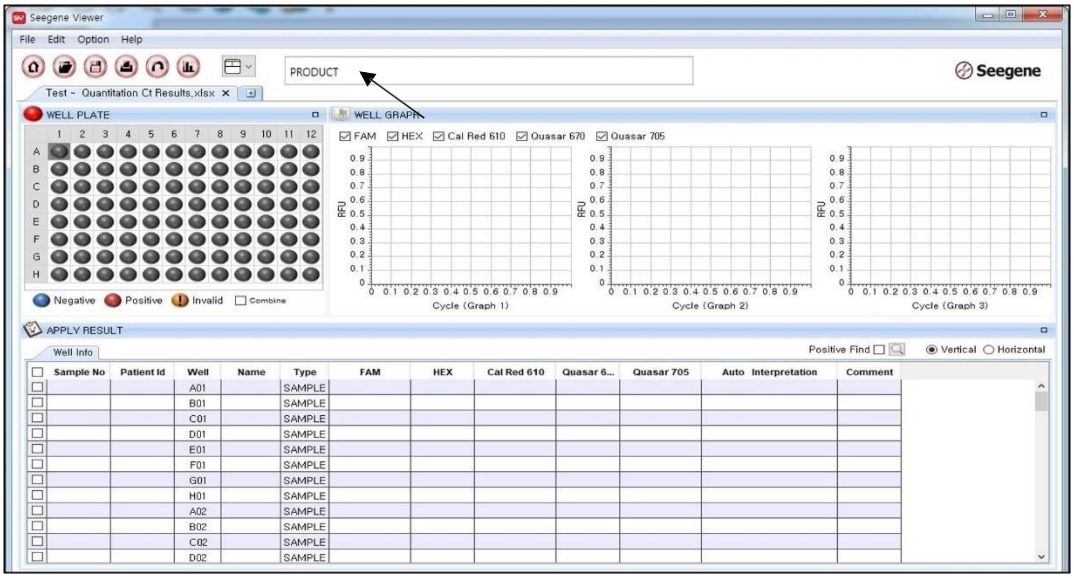


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

2) Проверьте результат для каждой лунки.

Рис. 15. **Результат тестирования в Seegene Viewer**

3) Критерии валидации результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для проверки валидности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и НК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие условия критерии соблюдены:

<A MOM>

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer															
	FAM (Ct)			HEX (Ct)			Cal Red 610 (Ct)			Quasar 670 (Ct)			Quasar 705 (Ct)			Автоматическая интерпретация
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC	35	18	56	68	31	
Положительный контроль 1	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 2	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 3	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный Контроль (-)

<B MOM>

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer															
	FAM (Ct)			HEX (Ct)			Cal Red 610 (Ct)			Quasar 670 (Ct)			Quasar 705 (Ct)			Автоматическая интерпретация
	26	69	73	42	82	53	43	54	70	IC	61	6	44	40	11	
Положительный контроль 1	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	Положительный контрол(+)ь
Положительный контроль 2	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 3	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	Положительный контроль (+))
Отрицательный контроль e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный Контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае неудачи с валидацией результаты не следует интерпретировать или сообщать о них. И ПЦР Реакция должна быть повторена

2. Система CFX96™ Dx (программное обеспечение CFX Manager™ Dx v3.1)

2.1 Настройка прибора для ПЦР в реальном времени

Примечание: Настройка эксперимента CFX96™ Dx System (Bio-Rad) может быть разделена на 3 тапа: Настройка протокола, настройка планшета и запуск эксперимента.

A. Настройка протокола

1)) В главном меню выберите **"File→ "New"→ "Protocol" ("Файл→ "Новый→ "Протокол")**, чтобы открыть **"Protocol Editor" ("Редактор протокола")**.

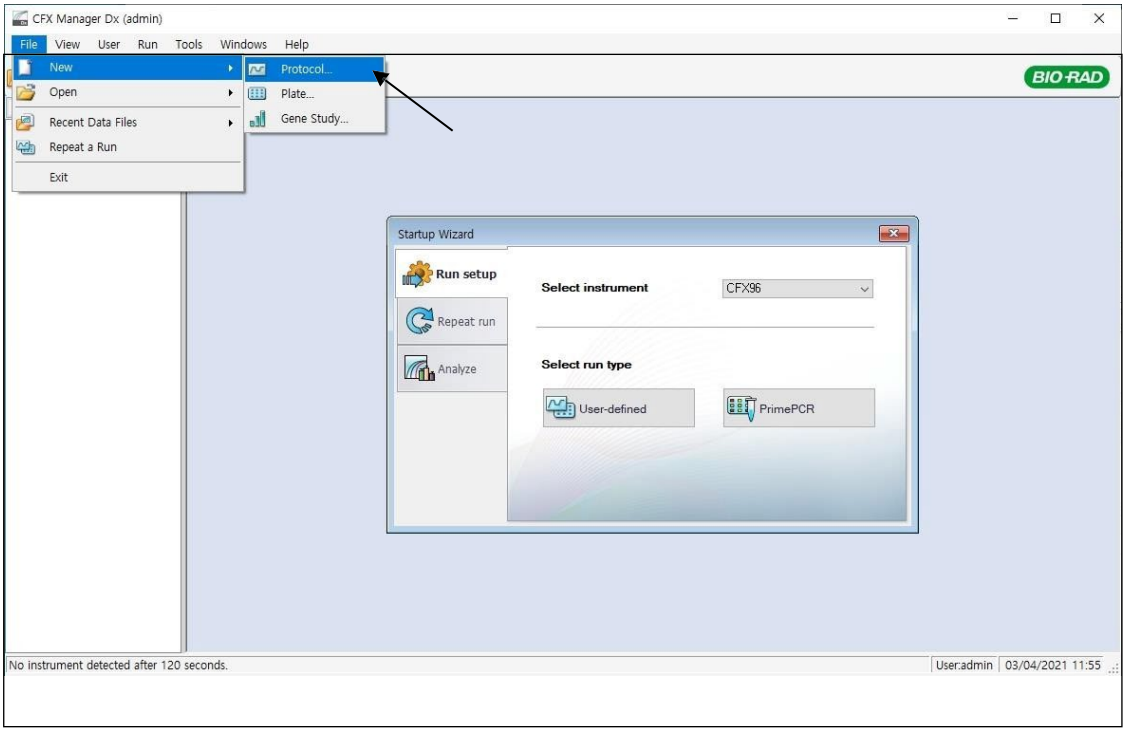


Рис. 1. **Настройка протокола**

2) В **«Protocol Editor» («Редакторе протоколов»)** задайте тепловой профиль следующим образом:

Шаг	Количество циклов	Температура	Продолжительность
1	1	95 C°	15 мин
2	45	95 C°	3 сек
3*		60 C°	10 сек
4*		72 C°	10 сек
5*		83 C°	5 сек

Примечание*: Считывание планшета на шаге 3, 4 и 5. Флуоресценция определяется при 60°C, 72°C и 83°C.

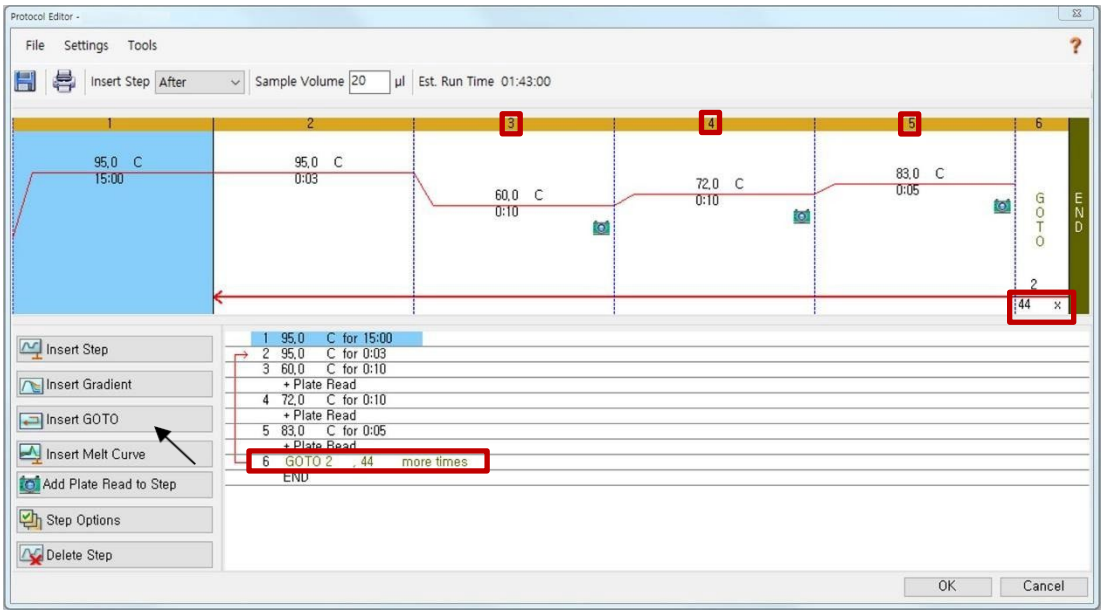


Рис. 2**. Редактор протоколов**

Примечание: Нажмите на кнопку **«Insert GOTO» («Вставить GOTO»)** и введите **«GOTO 2, 44 more times» («GOTO 2, еще 44 раза»)** на шаге 6.

3) Нажмите на поле рядом с **«Sample Volume» («Объем образца»)**, чтобы ввести непосредственно 20 мкл

4) Нажмите OK и сохраните протокол, чтобы открыть окно **Run Setup (Настройка запуска)**.

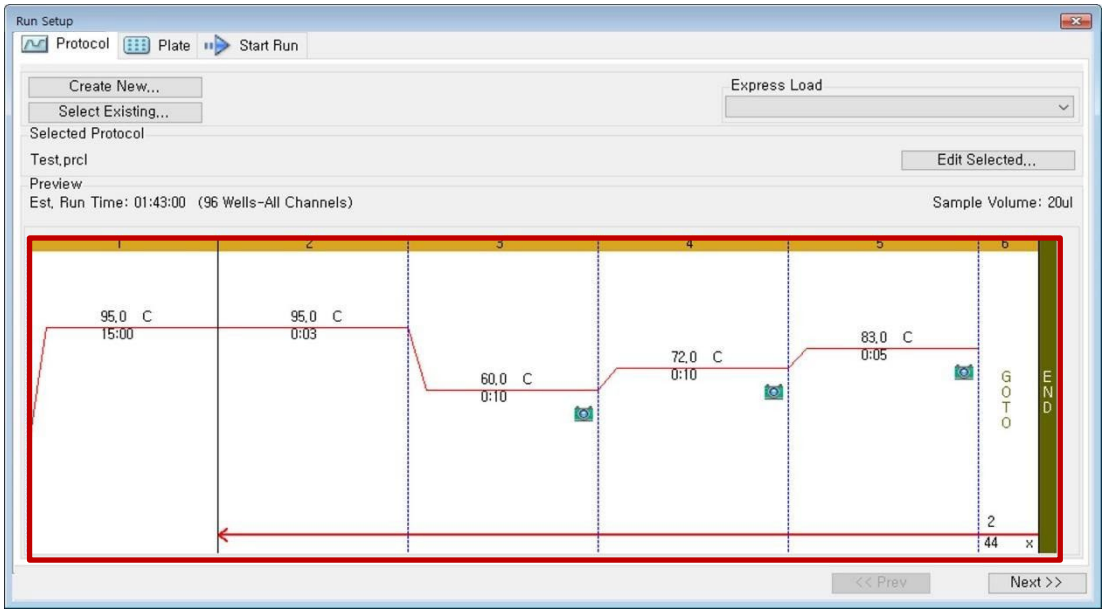


Рис. 3**. Настройка запуска: Протокол**

B. Установка планшета

1) На вкладке **«Plate» («Планшет»)** в **«Run Setup» («Настройка запуска»)** нажмите **«Create New» («Создать новый»)**, чтобы открыть окно **«Plate Editor» («Редактор планшета»).**

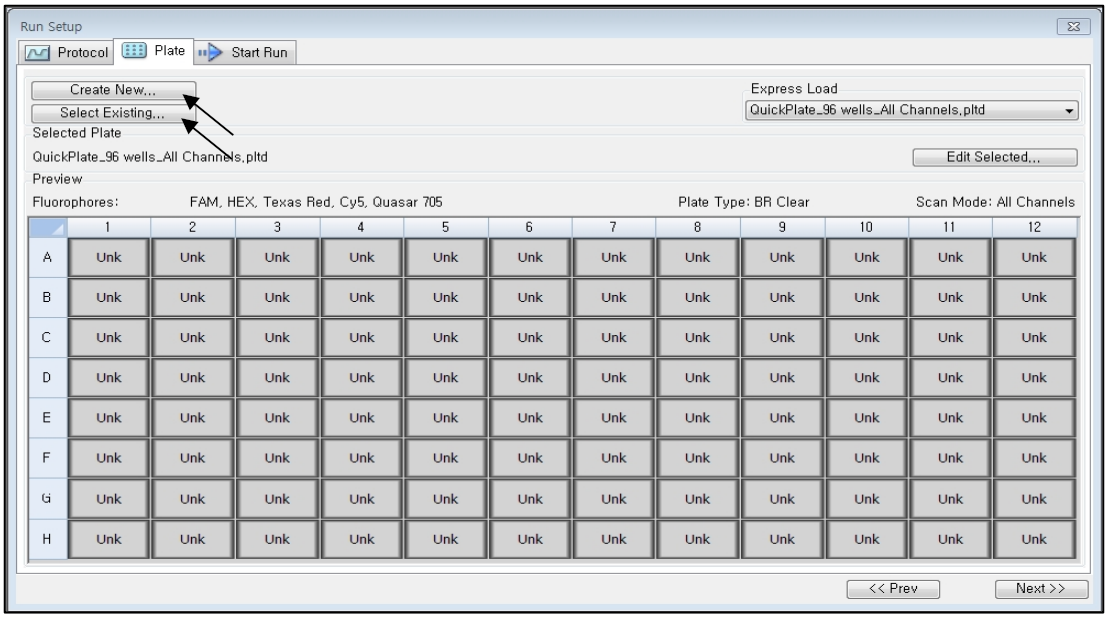


Рис. 4. **Редактор планшета**

1) Нажмите кнопку **«Select Fluorophores» («Выбрать флуорофоры»),** чтобы указать флуорофоры (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610***, ***Quasar 670, Quasar 705***), которые будут использоваться, и нажмите **«OK».**

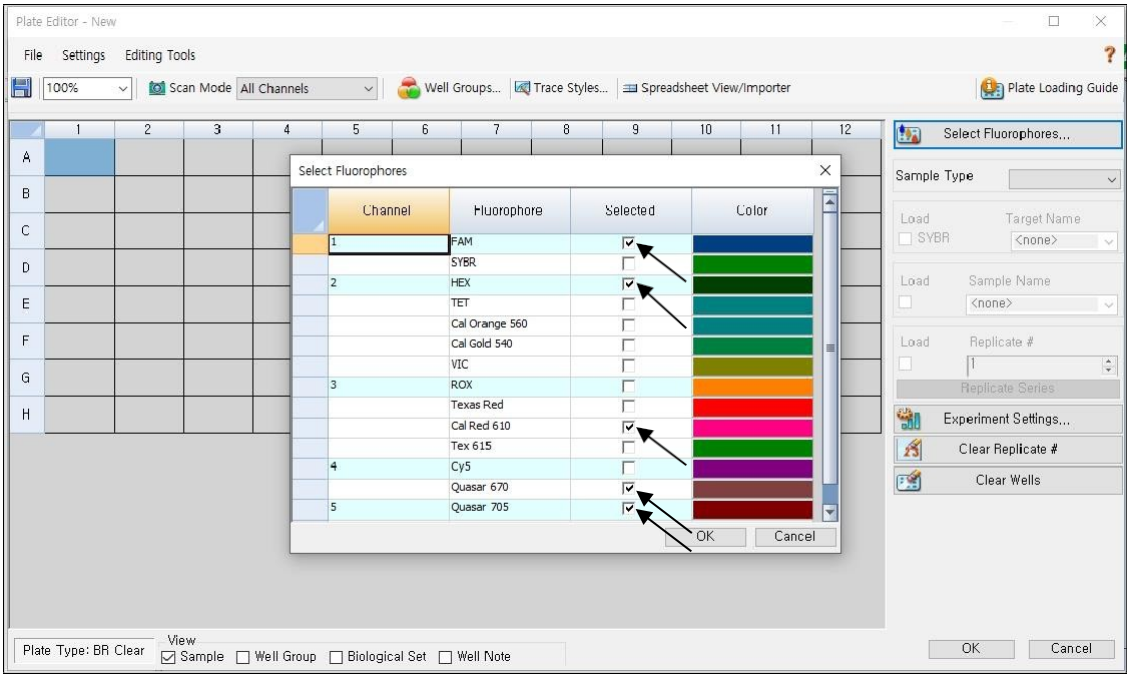


Рис. 5. **«Выбранные флуорофоры»** (***FAM***, ***HEX***, ***Cal Red 610***, ***Quasar 670*** и ***Quasar 705***)

2) Выберите лунки, в которые будет помещена ПЦР-пробирка, и выберите тип образца из списка Раскрывающееся меню **«Sample Type» («Тип пробы»)**.

- ***Неизвестный***: Клинические образцы
- ***Отрицательный контроль***
- ***Положительный контроль***

3) Нажмите на соответствующие флажки (***FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670 and Quasar 705)***, чтобы указать флуорофоры, которые будут обнаружены в выбранных лунках.

4) Введите **«Sample name» («Образец имени**») и **PC (PC1, PC2** и **PC3)**, а затем нажмите клавишу ввода.

2) В разделе **«Settings» («Настройки»)** главного меню **«Plate Editor» («Редактора планшетов»)** выберите **«Plate Size» (96 wells) («Размер планшета» (96 лунок)** и **«Plate Type» (BR White) («Тип планшета» (BR белый).**

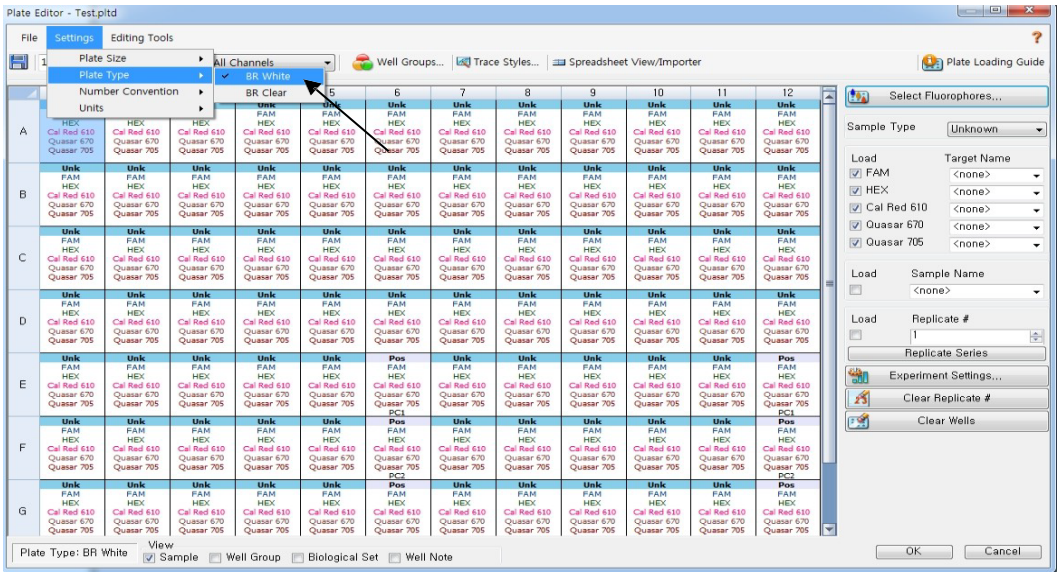


Рис. 6**. Установка планшета**

3) Нажмите **«OK»,** чтобы сохранить новый планшет.

4) Вы вернетесь в окно **«Run Setup» («Настройка запуска»)**.

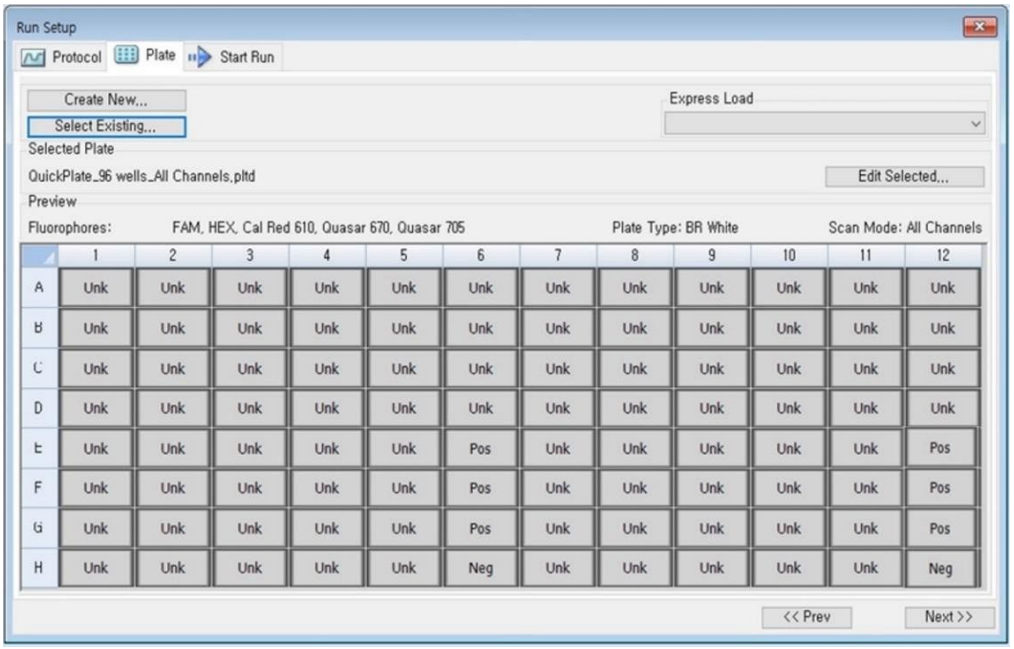


Рис. 7**. Настройка запуска: Планшет**

5) Нажмите **«Next» («Далее»)**, чтобы начать запуск.

C. Начать выполнение

1) На вкладке **«Start Run» («Начать выполнение»)** в **«Run Setup» («Начать настройку»)** нажмите **«Close Lid» («Закрыть крышку»)**, чтобы закрыть крышку прибора.

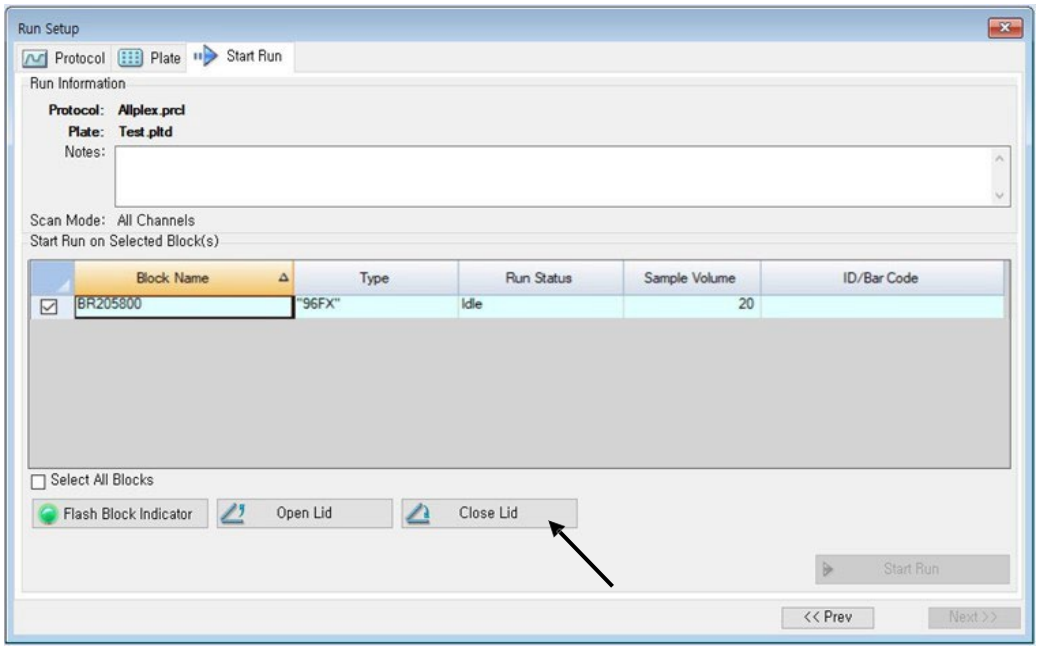


Рис. 8. **Закройте крышку**

1) Нажмите кнопку **«Start Run» («Начать выполнение»)**.

2) Сохраните файл запуска в папке My Documents (Мои документы) или в указанной папке. Введите имя файла, нажмите кнопку

Нажмите «SAVE» («СОХРАНИТЬ»), и запуск начнется.

2.2. Анализ данных

A. Создание папок для экспорта данных

1) Чтобы сохранить данные всех этапов детекции кривых амплификации из файла результатов, создайте одну папку.

2) Название папки может быть по желанию пользователя (Для функции Экспорт Seegene автоматически создаются папки «QuantStep3», «QuantStep4» и «QuantStep5» для сохранения данных каждой кривой амплификации. в папке, созданной пользователем).

B. Предварительные настройки для анализа данных в CFX96™

1) После проведения теста перейдите на вкладку **«Quantification» («Количественное определение»)**, чтобы увидеть результаты кривой амплификации.

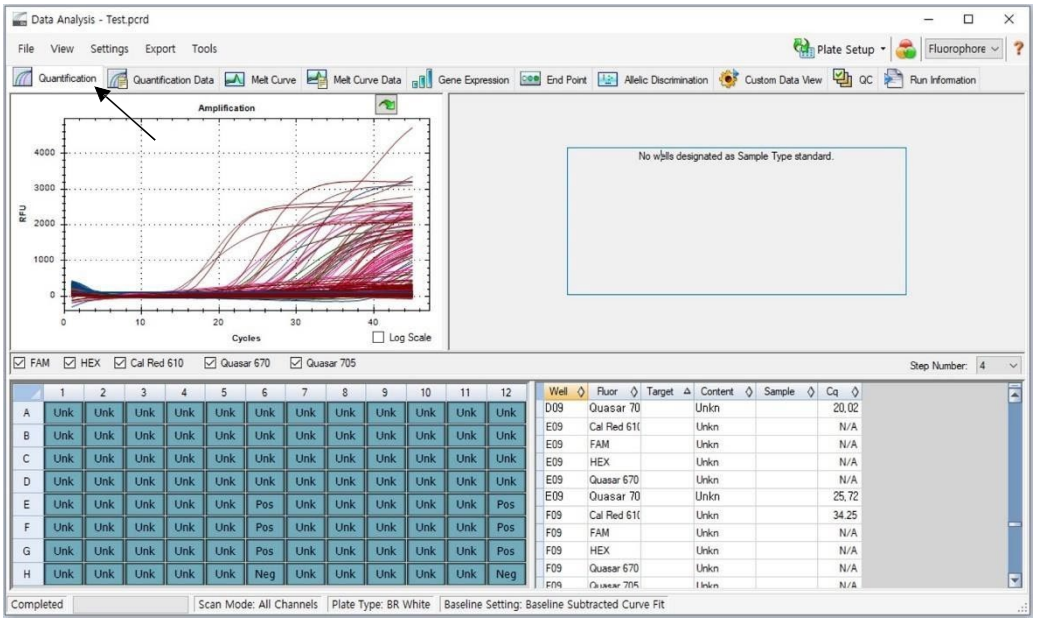


Рис. 9. **Результаты кривой амплификации**

1) Выберите **«No Baseline Subtraction» («Без вычитания базовой линии»)** в пункте Baseline Setting (Настройка базовой линии) меню Settings (Настройки).

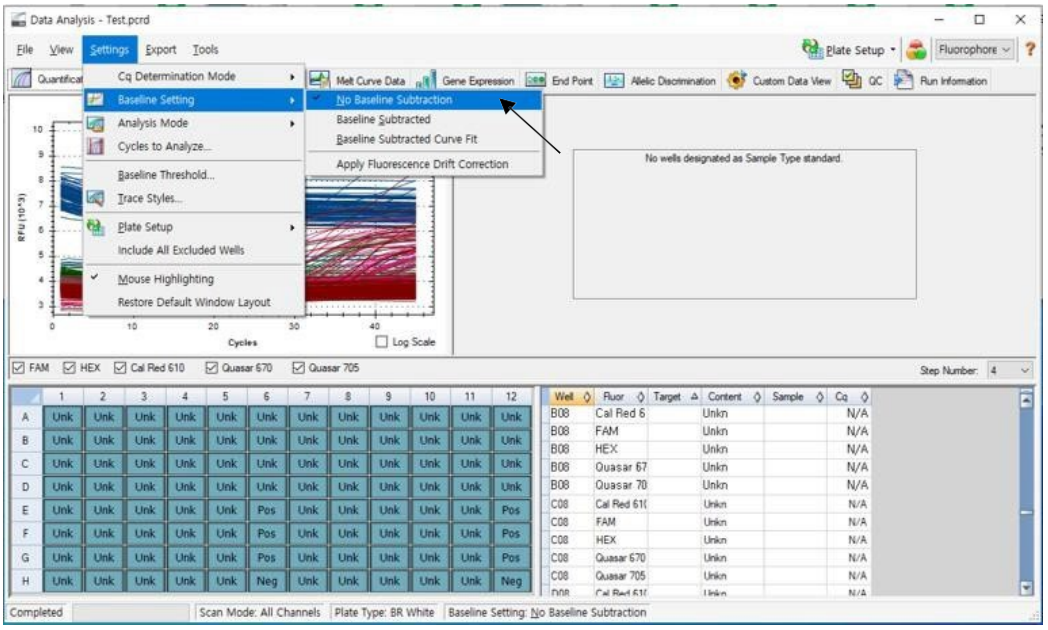


Рис. 10. **Без вычитания базовой линии**

2) Выберите **«Seegene Export» («Экспорт Seegene»)** в меню Export (Экспорт).

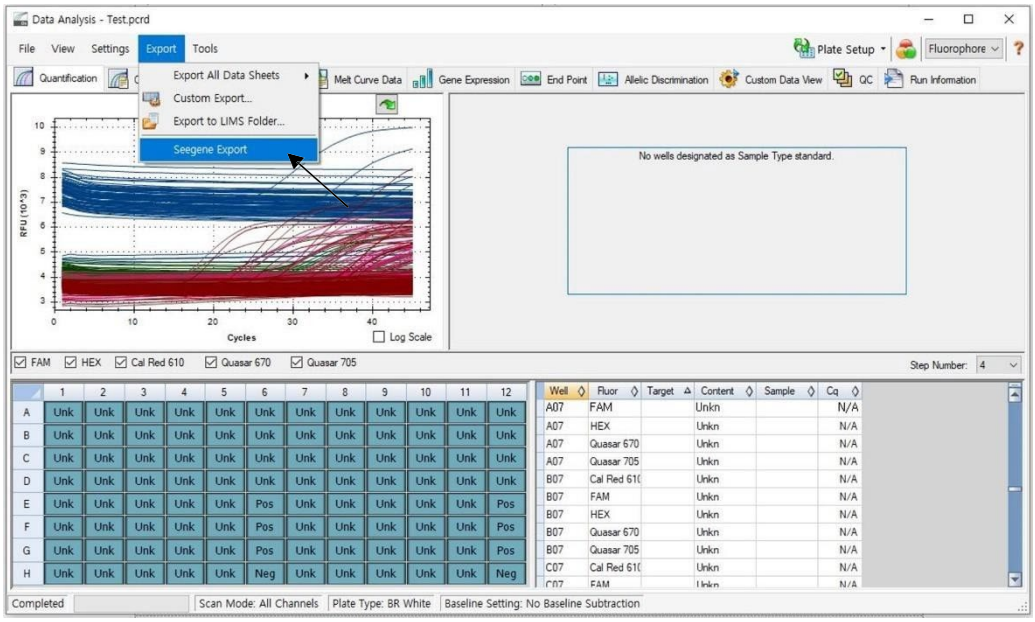


Рис. 11. **Экспорт Seegene**

3) Выберите место для сохранения данных и нажмите **«OK»**.

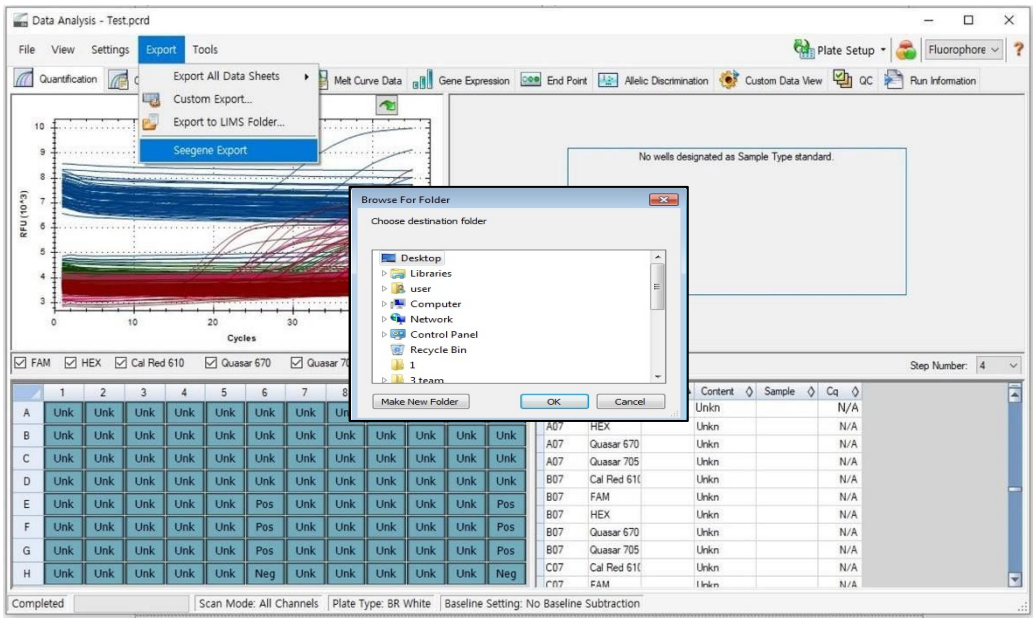


Рис. 12. **Экспорт Seegene в указанную папку**

C. Настройки для анализа данных в программе Seegene Viewer

1) Откройте программу Seegene Viewer и нажмите **«Option» («Параметры»)**, чтобы выбрать ***CFX96*** **или *CFX96 Dx*** в **«Instrument» («Инструмент»).**

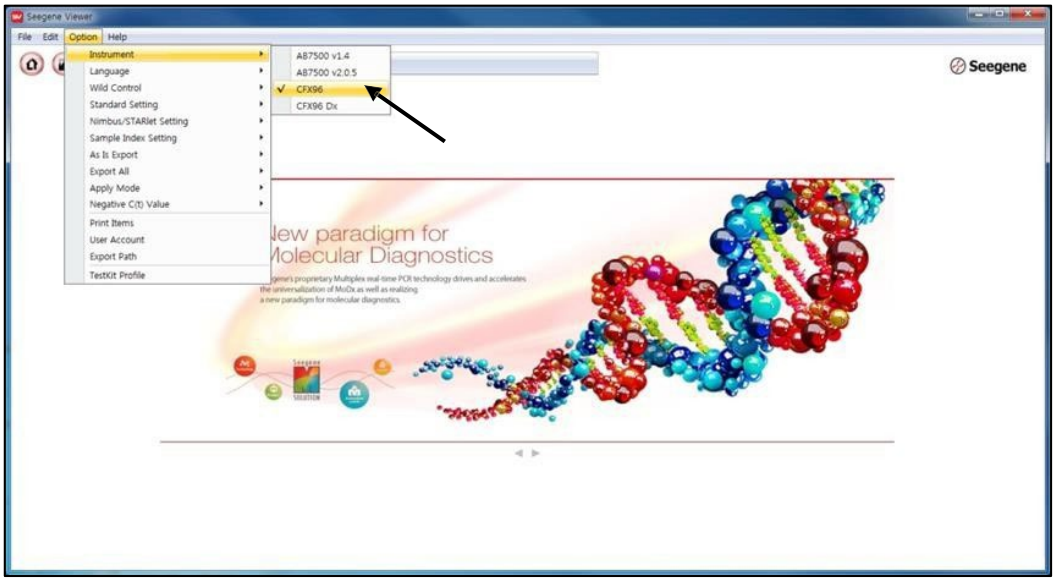


Рис. 13. **Seegene Viewer**

2) Нажмите **«Open» («Открыть»)**, чтобы найти сохраненный файл в папке «QuantStep3», откройте файл результатов и выберите тестовый набор из меню **«PRODUCT» («ПРОДУКТ»).**

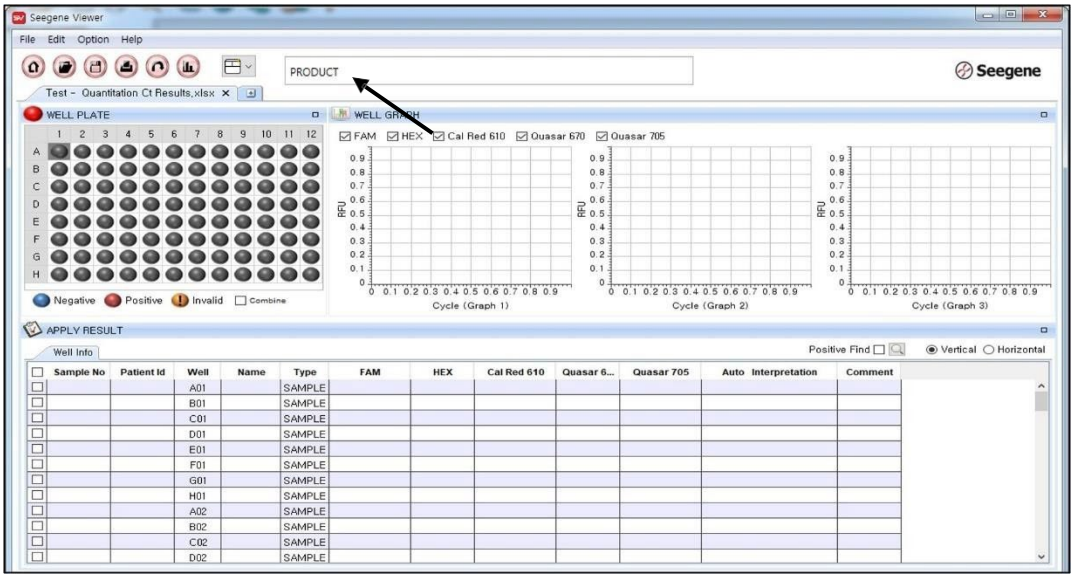


Рис. 14. **Настройки для анализа данных в Seegene Viewer**

3) Проверьте результат для каждой лунки.

Рис. 15. **Результат тестирования в Seegene Viewer**

4) Критерии валидации результатов контроля

a. Корректный запуск анализа

Для проверки валидности экспериментов ПЦР-пробы должны сопровождаться ПК (положительным контролем) и ОК (отрицательным контролем). Проба считается валидной, если соблюдены все следующие условия критерии соблюдены:

<A MOM>

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer															
	FAM (Ct)			HEX (Ct)			Cal Red 610 (Ct)			Quasar 670 (Ct)			Quasar 705 (Ct)			Автоматическая интерпретация
	66	45	58	51	59	16	33	39	52	IC	35	18	56	68	31	
Положительный контроль 1	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 2	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 3	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный Контроль (-)

<B MOM>

Контроль	Результат работы программы Seegene Viewer															
	FAM (Ct)			HEX (Ct)			Cal Red 610 (Ct)			Quasar 670 (Ct)			Quasar 705 (Ct)			Автоматическая интерпретация
	26	69	73	42	82	53	43	54	70	IC	61	6	44	40	11	
Положительный контроль 1	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 2	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	Положительный контроль (+)
Положительный контроль 3	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	-	-	15 Ct≤≤ 31	Положительный контроль (+)
Отрицательный контроль	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отрицательный Контроль (-)

b. Некорректный запуск анализа

В случае неудачи валидации результаты не следует интерпретировать или сообщать, а ПЦР Реакция должна быть повторена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Информация об аналите

<A MOM>

Флуорофоры	Аналиты		
	График 1	График 2	График 3
FAM	HPV66	HPV45	HPV58
HEX	HPV51	HPV59	HPV16
CalRed 610	HPV33	HPV39	HPV52
Quasar 670	IC	HPV35	HPV18
Quasar 705	HPV56	HPV68	HPV31

<B MOM>

Флуорофоры	Аналиты		
	График 1	График 2	График 3
FAM	HPV26	HPV69	HPV73
HEX	HPV42	HPV82	HPV53
CalRed 610	HPV43	HPV54	HPV70
Quasar 670	IC	HPV61	HPV6
Quasar 705	HPV44	HPV40	HPV11

2. Интерпретация результатов

Аналиты	Значение Ct	Результат
Цели	≤ 43	Обнаружено (+)
	> 43 или N/A	Не обнаружено (-)
IC	≤ 43	Обнаружено (+)
	> 43 или N/A	Не обнаружено (-)

Целевой результат	IC Результат*	Общая интерпретация
+	+	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаруженная** - Идентификация целевого типа HPV
+	-	**Целевая нуклеиновая кислота, обнаружена**** - Идентификация целевого типа HPV - Дополнительные генотипы HPV, которые могли присутствовать, не были обнаружены.
-	+	**Целевая нуклеиновая кислота, не обнаружена**
-	-	**Неверный** - Отрицательный сигнал IC свидетельствует о неадекватном сборе, обработке образца или наличии ингибиторов. - Повторите тест, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот используя другую аликвоту исходного образца.

* Внутренний контроль или какие-либо другие сигналы не наблюдаются: см. раздел УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК

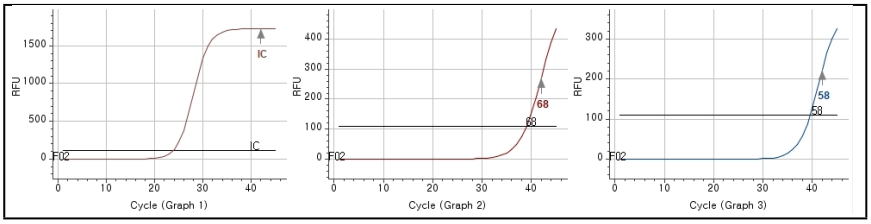
** Сигнал внутреннего контроля может быть снижен или отсутствовать из-за высокого титра патогенов.

Примечание: В случае, если результат A MOM или B MOM будет признан недействительным, т.е. не будет обнаружено сигналов ни для целей, ни для ВК, общая интерпретация анализа будет недействительной.

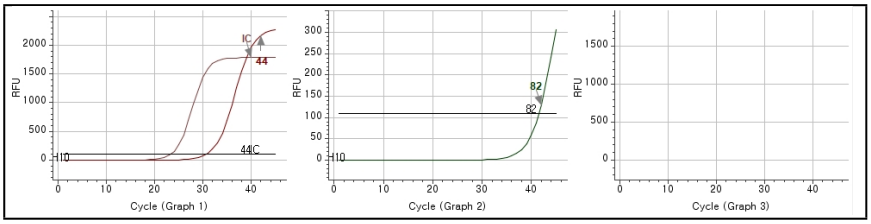
3. Применение к клиническим образцам

Клинический образец 1

<A MOM>

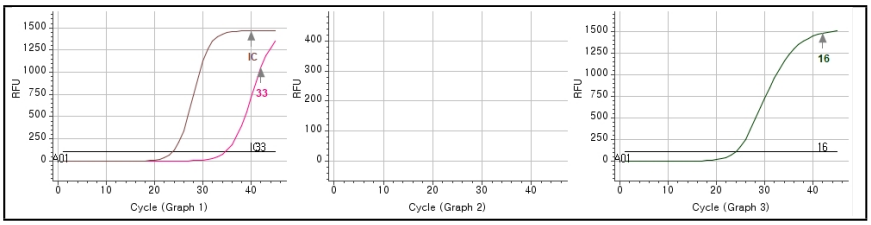


<B MOM>

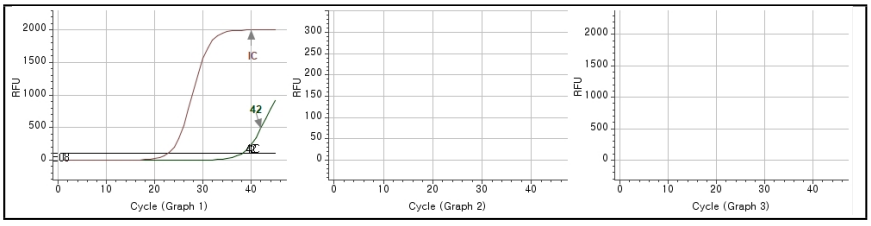


Клинический образец 2

<A MOM>



<B MOM>



Результат работы программы Seegene Viewer (Ct)																	
Образец		FAM			HEX			Cal Red 610			Quasar 670		Quasar 705			Quaar 670	Автоинтерпретация
1	A	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31	IC	58,68,82,44
	MOM	Н/Д	Н/Д	39.58	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	39.05	Н/Д	23.7	
	B	26	69	73	42	82	53	43	54	70	61	6	44	40	11	IC	
	MOM	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	41.58	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	30.92	Н/Д	Н/Д	23.49	
2	A	66	45	58	51	59	16	33	39	52	35	18	56	68	31	IC	16,33,42
	MOM	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	24.04	34.78	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	23.79	
	B	26	69	73	42	82	53	43	54	70	61	6	44	40	11	IC	
	MOM	Н/Д	Н/Д	Н/Д	38.27	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	22.84	

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Allplex™ HPV28 Detection		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Нет сигнала	Флуорофоры для анализа данных не соответствуют с протоколом	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Неправильная настройка термоциклера реального времени	Пожалуйста, проверьте условия термоциклирования и повторите тест при правильных настройках.
	Неправильное хранение или истечение срока годности набора для тестирования	Пожалуйста, проверьте условия хранения (см. стр. 10) и срок годности (см. этикетку) набор для тестирования и при необходимости новый набор.
Нет сигнала внутреннего контроля	Высокая нагрузка на нуклеиновую кислоту патогена	Если сигнал патогена-мишени наблюдается, но не ВК, то ВК-амплификация может быть подавлена высоким титром патогена-мишени. Если вы хотите наблюдать сигнал ВК, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест. с этапа экстракции.
	Наличие ингибитора ПЦР	Пожалуйста, разбавьте выделенную нуклеиновую кислоту (1/2~1/5) в воде, не содержащей РНК, и повторите тест, начиная с этапа ПЦР. Если результат тот же, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Некорректный сбор образцов	Если и целевой, и сигнал ВК не наблюдались, это означает, что образец был собран неправильно. Повторно соберите образец..
Предполагаемый ложноположительный или целевой сигнал(ы), наблюдаемый в отрицательном контроле	Загрязнение	Обеззараживайте все поверхности и инструменты гипохлоритом натрия и этанолом. На протяжении всей процедуры используйте только фильтрующие насадки и меняйте их между пробирками. Повторите всю процедуру, начиная с выделения нуклеиновых кислот, используя новый набор реагентов.

Allplex™ HPV28 Detection		
ОБЗОР	**ВЕРОЯТНЫЕ ПРИЧИНЫ**	**РЕШЕНИЕ**
Предполагаемый ложный отрицательный результат или отсутствие сигнала в положительном контроле.	Перекрестное загрязнение между ПК1, 2 и 3	Перезапустите с этапа экстракции или перезапустите с этапа ПЦР в реальном времени.
	Ошибка при сборе образца	Пожалуйста, проверьте метод сбора образцов и повторно соберите образец.
	Неправильное хранение образца	Пожалуйста, повторно соберите образец и повторите процедуру всю процедуру. Убедитесь, что образец хранится в соответствии с рекомендациями.
	Ошибка при выделении нуклеиновых кислот	Пожалуйста, проверьте процедуру экстракции нуклеиновых кислот, а также концентрацию нуклеиновых кислот и повторно экстрагируйте нуклеиновые кислоты.
	Ошибка при добавлении нуклеиновой кислоты в нужные пробирки для ПЦР	Проверьте номера образцов трубок, содержащих нуклеиновые кислоты, и убедитесь, что вы добавили нуклеиновые кислоты в правильные ПЦР-трубки, а при необходимости аккуратно повторите тест.
	Наличие ингибитора	Пожалуйста, разбавьте образец (1/3~1/10) в физиологическом буфере и повторите тест, начиная с этапа экстракции.
	Флуорофоры для анализа данных не соответствуют протоколу	Выберите правильный флуорофор для анализа данных.
	Некорректное программирование	Повторите ПЦР с исправленными настройками.
	Неправильная смесь для ПЦР	Убедитесь, что все компоненты добавлены в реакционную смесь. Чувствительность снижается при использовании предварительно приготовленных смесей. Все реагенты должны перед использованием гомогенизировать и отжать.
	Длительное пребывание реагентов при комнатной температуре или неправильные условия хранения	Пожалуйста, проверьте условия хранения и срок годности (см. этикетку набора) реагентов и при необходимости используйте новый набор.
Скачки на всех циклах кривой амплификации	Пузырек воздуха в пробирке для ПЦР	Перед запуском центрифугируйте пробирку для ПЦР.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

1. Аналитическая специфичность

Высокая специфичность Allplex™ HPV28 Detection обеспечивается олигосом, разработанным специально для интересующих мишеней. Allplex™ HPV28 Detection был протестирован на перекрестную реактивность к 105 различным патогенам, а ПЦР-амплификация и детекция были выявлены только для указанных мишеней.

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
1	*Acinetobacter baumannii*	ZMC	0801597	Не обнаружено
2	*Acinetobacter lwoffii*	ZMC	0801909	Не обнаружено
3	Adenovirus Type 1	ZMC	0810050CF	Не обнаружено
4	Adenovirus type 18	KBPV	KBPV-VR-4D	Не обнаружено
5	Adenovirus type 23	KBPV	KBPV-VR-5D	Не обнаружено
6	Adenovirus Type 40	ZMC	0810084CF	Не обнаружено
7	*Bacteroides fragilis*	ZMC	0801583	Не обнаружено
8	*Bifidobacterium longum*	ZMC	0804047	Не обнаружено
9	*Candida albicans*	ZMC	0801504	Не обнаружено
10	*Chlamydia trachomatis*	ZMC	0801775	Не обнаружено
11	*Clostridium perfringens* Type A	ZMC	0801585	Не обнаружено
12	*Corynebacterium genitalium*	ZMC	0804108	Не обнаружено
13	*Cytomegalovirus* (CMV) (Strain: AD-169)	ZMC	0810003CF	Не обнаружено
14	*Enterobacter cloacae*	ZMC	0801597	Не обнаружено
15	*Enterococcus faecalis*	ZMC	0801637	Не обнаружено
16	*Escherichia coli*	ZMC	0801517	Не обнаружено
17	*Fusobacterium nucleatum*	ZMC	0801911	Не обнаружено
18	*Gardnerella vaginalis*	ZMC	0801894	Не обнаружено
19	*Haemophilus ducreyi*	ZMC	0801736	Не обнаружено
20	Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) (Strain: MacIntyre)	ZMC	0810005CF	Не обнаружено
21	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) (Strain: MS)	ZMC	0810006CF	Не обнаружено
22	Human Hepatitis B Virus (HBV)	ZMC	NATHBV-0006	Не обнаружено
23	Human immunodeficiency virus (HIV-1)	ATCC	VR-3245SD	Не обнаружено
24	*Klebsiella pneumoniae*	ZMC	0801506	Не обнаружено
25	*Lactobacillus acidophilus*	ZMC	0801540	Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
26	*Lactobacillus crispatus*	ZMC	0804143	Не обнаружено
27	*Lactobacillus gasseri*	ZMC	0804327	Не обнаружено
28	*Lactobacillus iners*	ZMC	0804261	Не обнаружено
29	*Lactobacillus jensenii*	ZMC	0804260	Не обнаружено
30	*Mobiluncus curtisii*	ZMC	0804141	Не обнаружено
31	*Mobiluncus mulieris*	ZMC	0804116	Не обнаружено
32	*Mycoplasma hominis*	ZMC	0804011	Не обнаружено
33	*Neisseria gonorrhoeae*	ZMC	0801482	Не обнаружено
34	*Neisseria lactamica*	ZMC	0801752	Не обнаружено
35	*Neisseria meningitidis* Serogroup A	ZMC	0801511	Не обнаружено
36	*Neisseria sicca*	ZMC	0801754	Не обнаружено
37	*Peptostreptococcus anaerobius*	ZMC	0804012	Не обнаружено
38	*Prevotella melaninogenica*	ZMC	0804292	Не обнаружено
39	*Proteus mirabilis*	ZMC	0804544	Не обнаружено
40	*Pseudomonas aeruginosa*	ZMC	0801519	Не обнаружено
41	*Pseudomonas fluorescens*	ZMC	0804248	Не обнаружено
42	*Serratia marcescens*	ZMC	0801723	Не обнаружено
43	Simian Virus 40 (SV40)	ATCC	VRMC-2	Не обнаружено
44	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)	ZMC	0801638	Не обнаружено
45	Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE)	ZMC	0801651	Не обнаружено
46	*Streptococcus agalactiae*	ZMC	0801545	Не обнаружено
47	*Streptococcus mitis*	ZMC	0801695	Не обнаружено
48	*Streptococcus pyogenes*	ZMC	0801512	Не обнаружено
49	Syphilis (*Treponema pallidum*)	ZMC	KZMC002	Не обнаружено
50	*Trichomonas vaginalis*	ZMC	0801805	Не обнаружено
51	*Ureaplasma urealyticum*	NCTC	10177	Не обнаружено
52	HPV1	Клонированная ДНК		Не обнаружено
53	HPV2	Клонированная ДНК		Не обнаружено
54	HPV3	Корейский изолят		Не обнаружено
55	HPV4	Клонированная ДНК		Не обнаружено
56	HPV5	Клонированная ДНК		Не обнаружено
57	HPV8	Клонированная ДНК		Не обнаружено
58	HPV10	Корейский изолят		Не обнаружено

№.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
59	HPV13	Клонированная ДНК		Не обнаружено
60	HPV27	Корейский изолят		Не обнаружено
61	HPV30	Клонированная ДНК		Не обнаружено
62	HPV32	Корейский изолят		Не обнаружено
63	HPV34	Корейский изолят		Не обнаружено
64	HPV55	Корейский изолят		Не обнаружено
65	HPV57	Корейский изолят		Не обнаружено
66	HPV62	Корейский изолят		Не обнаружено
67	HPV67	Корейский изолят		Не обнаружено
68	HPV71	Корейский изолят		Не обнаружено
69	HPV72	Корейский изолят		Не обнаружено
70	HPV74	Корейский изолят		Не обнаружено
71	HPV81	Корейский изолят		Не обнаружено
72	HPV83	Клонированная ДНК		Не обнаружено
73	HPV84	Корейский изолят		Не обнаружено
74	HPV85	Клонированная ДНК		Не обнаружено
75	HPV102	Клонированная ДНК		Не обнаружено
76	SiHa (HPV16 positive)	KCLB	30035	Обнаружен HPV16
77	HeLa (HPV18 positive)	KCLB	10002	Обнаружен HPV18
78	HPV16	NCTC	06/202	Обнаружен HPV16
79	HPV18	NCTC	06/206	Обнаружен HPV18
80	HPV31	NCTC	14/258	Обнаружен HPV31
81	HPV33	NCTC	14/260	Обнаружен HPV33
82	HPV35	Корейский изолят		Обнаружен HPV35
83	HPV39	Корейский изолят		Обнаружен HPV39
84	HPV45	NCTC	14/104	Обнаружен HPV45
85	HPV51	Корейский изолят		Обнаружен HPV51
86	HPV52	NCTC	14/262	Обнаружен HPV52
87	HPV56	Корейский изолят		Обнаружен HPV56
88	HPV58	NCTC	14/264	Обнаружен HPV58
89	HPV59	Корейский изолят		Обнаружен HPV59
90	HPV66	Корейский изолят		Обнаружен HPV66
91	HPV68	Корейский изолят		Обнаружен HPV68
92	HPV6	NCTC	14/256	Обнаружен HPV6

Нет.	Организм	Источник	Изолят №.	Результат†
93	HPV11	NCTC	14/100	Обнаружен HPV11
94	HPV26	Корейский изолят		Обнаружен HPV26
95	HPV40	Корейский изолят		Обнаружен HPV40
96	HPV42	Корейский изолят		Обнаружен HPV42
97	HPV43	Корейский изолят		Обнаружен HPV43
98	HPV44	Корейский изолят		Обнаружен HPV44
99	HPV53	Корейский изолят		Обнаружен HPV53
100	HPV54	Корейский изолят		Обнаружен HPV54
101	HPV61	Корейский изолят		Обнаружен HPV61
102	HPV69	Корейский изолят		Обнаружен HPV69
103	HPV70	Корейский изолят		Обнаружен HPV70
104	HPV73	Корейский изолят		Обнаружен HPV73
105	HPV82	Корейский изолят		Обнаружен HPV82

† Тесты на специфичность повторяли 3 раза.

※ ATCC: Американская коллекция типовых культур
KBPV: Корейский банк патогенных вирусов
ZMC: ZeptoMetrix Corporation
NCTC: Национальная коллекция типовых культур
NIBSC: Национальный институт биологических стандартов и контроля

2. Аналитическая чувствительность

Для определения предела обнаружения (LoD) Allplex™ HPV28 Detection, pDNA для таргета 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 69, 70, 73, 82 и 2 типа клеточных линий для таргета 16 и 18 были серийно разведены в объединенных HPV-отрицательных образцах шейки матки, собранных в растворе ThinPrep. Нуклеиновые кислоты были извлечены с помощью Microlab NIMBUS IVD (STARMag 96 X 4 Universal Cartridge Kit). LoD для каждой цели оценивался с помощью пробит-анализа с использованием программного обеспечения (MedCalc V20.015).

2-1. Предел обнаружения: Линии клеток HPV

Цель	Предел обнаружения (клеток/мл)
SiHa (HPV16)	88.9
HeLa (HPV18)	45.2

2-2. Предел обнаружения: рДНК HPV

Цель	Предел обнаружения (копий/мл)
HPV26	2101
HPV35	3556
HPV39	2515
HPV40	3171
HPV42	1801
HPV43	2586
HPV44	1477
HPV51	3142
HPV53	2385
HPV54	2917
HPV56	3623
HPV59	3660
HPV61	1184
HPV66	3941
HPV68	3586
HPV69	1871
HPV70	2563
HPV73	2434
HPV82	2832

Цель	Предел обнаружения (МЕ/мл)
HPV6	5193
HPV11	4931
HPV 16	4134
HPV18	1217
HPV31	3680
HPV33	1616
HPV45	5643
HPV52	2967
HPV58	2263

3. Воспроизводимость

Тест на воспроизводимость был подготовлен, включая образцы с умеренно положительным результатом (3X LoD) и с низким положительным результатом (1X LoD). На каждом тестовом участке набор тестировался в течение 5 дней, 2 запуска в день двумя разными экспериментаторами и в тройных образцах для каждой цели. Положительные показатели были зафиксированы для каждой цели в исследовании воспроизводимости: 100,0% для образцов с умеренно положительным результатом, ≥95% для образцов с низким положительным результатом. Воспроизводимость теста Allplex™ HPV 28 Detection была оценена между пробами, участками и партиями продукта. Положительные показатели для всех концентраций соответствовали критериям, а значения CV (коэффициент вариации) были менее 10 (<10). Результаты удовлетворяли установленным выше критериям, что подтверждает воспроизводимость тестов Allplex™ HPV28 Detection.

4. Мешающие вещества

Добавление вещества не повлияло на результаты: неспецифические детекции или ингибирование амплификации мишени. Согласно полученным результатам, 7 различных типов мешающих веществ не влияли на результаты Allplex™ HPV28 Detection.

№	Вмешивающиеся вещества	Источник	Тестовая концентрация
1	Кровь	Человек	5% v/v
2	Лейкоциты, сонированные	Lee Biosolutions (кат. № 342-10-1)	$1X10^6$ клеток/мл
3	Муцин (муцин из желудка свиньи)	Sigma-Aldrich (Кат. № M1778-10G)	10% v/v
4	Спермицид (Ноноксинол-9)	Abcam (кат. номер ab143673)	10% w/v
5	Yeast Gard Advanced®	Озеро Потребитель Продукты, Инк.	10% w/v
6	Смазочный материал	Vagisil®	10% w/v
7	Противозачаточные таблетки (Mercilon)®	Алвоген®	10% w/v

5. Клинические показатели

[Клиническая эффективность Allplex™ HPV28 Detection в цервикальных образцах].

Клинические характеристики Allplex™ HPV28 Detection были подтверждены на образцах шейки матки. Всего был исследован 981 образец шейки матки, и каждый результат Allplex™ HPV28 Detection сравнивался с соответствующим результатом компаратора, имеющего маркировку CE. Каждая цель, включая 19 HPV высокого риска и 9 HPV низкого риска, показала положительное процентное согласие, отрицательное процентное согласие и общее процентное согласие более 95%, что свидетельствует о клинической достоверности. Подробности см. в следующей таблице.

Тип HPV	**PPA (%)**	**NPA (%)**	**OPA (%)**
HPV16	100.00	99.89	99.90
HPV18	96.00	99.89	99.69
HPV31	100.00	99.56	99.59
HPV33	100.00	100.00	100.00
HPV35	98.25	99.89	99.80
HPV39	97.64	99.77	99.49
HPV45	100.00	99.89	99.90
HPV51	97.78	99.78	99.59
HPV52	100.00	98.66	98.78
HPV56	95.30	98.80	98.27
HPV58	99.33	99.76	99.69
HPV59	98.55	99.78	99.69
HPV66	98.72	99.45	99.39
HPV68	98.96	99.77	99.69
HPV26	100.00	100.00	100.00
HPV53	98.39	98.80	98.78
HPV69	100.00	100.00	100.00
HPV73	100.00	99.90	99.90
HPV82	100.00	99.90	99.90
HPV6	100.00	99.79	99.80
HPV11	100.00	100.00	100.00
HPV40	100.00	100.00	100.00
HPV42	97.22	100.00	99.90
HPV43	100.00	99.69	99.69
HPV44	97.62	99.68	99.59
HPV54	96.23	99.57	99.39
HPV61	100.00	99.37	99.39
HPV70	96.77	99.79	99.69

PA: Положительное процентное соглашение
NPA: Отрицательное процентное согласие
OPA: Общее процентное согласие

[Клинические показатели для самостоятельно собранных вагинальных образцов]

Для сравнения эффективности обнаружения HPV в самостоятельно собранных и собранных врачом образцах с помощью Allplex™ HPV28 Detection было проведено клиническое исследование самостоятельно собранных вагинальных образцов. Самостоятельно собранные и собранные врачом образцы были получены от одного и того же субъекта с помощью кисточки Evalyn® и ThinPrep® , соответственно. В этом клиническом исследовании Allplex™ HPV28 Detection показал схожие результаты клинические показатели между парными образцами, собранными самостоятельно и собранными врачом.

ССЫЛКИ

1. Burd EM. [Human papillomavirus and cervical cancer.] Clin Microbiol Rev. (2003) 16(1): 1-17
2. Castle PE. [The potential utility of HPV genotyping in screening and clinical management.] J Natl Compr Canc Netw. (2008) 6(1): 83-95
3. Chris JM, Peter JS, Philip EC. [Clinical utility of HPV genotyping.] Gynecol Oncol. (2006) 103: 12-17
4. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, Kim JK. [Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene.] Nucleic Acids Res. (2007) 35(6): e40
5. Chun JY. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] Seegene Bulletin (2012) 1: 1-4
6. Giorgi Rossi P, Bisanzi S, Paganini I, Di Iasi A, Angeloni C, Scalisi A, Macis R, Pini MT, Chini F, Carozzi FM. [HPV Prevalence Italian Working Group Prevalence of HPV high and low risk types in cervical samples from the Italian general population: a population based study.] BMC Infect Dis. (2010) 20(10): 214
7. Hwang IT. [Cyclic-CMTA: An Innovative Concept in Multiplex Quantification.] Seegene Bulletin (2012) 1: 11-15
8. Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. [Papanicolaou smear sensitivity for the detection of adenocarcinoma of the cervix: a study of 49 cases.] Cancer. (2001) 93(1): 8-15
9. Lee DH. [TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR.] Seegene Bulletin (2012) 1: 5-10
10. Li J, Mei J, Wang X, Hu L, Lin Y, Yang P. [Human papillomavirus type-specific prevalence in women with cervical intraepithelial neoplasm in Western China.] J Clin Microbiol. (2012) 50(3): 1079-1081
11. Novaes LC, Novaes MR, Simes-Barbosa A. [Diagnosis of human papillomatosis by polymerase chain reaction in cases of divergence between results of hybrid capture and papanicolaou cytology.] Braz J infect Dis. (2006) 10(3):169-172
12. Son S, Noh HT, An S. [Human papillomavirus status in cervical scrapes and biopsy specimens using the HPV genotyping DNA microarray.] Int J Gynaecol Obstet. (2006) 93(3): 258-259
13. Sun ZR, Ji YH, Zhou WQ, Zhang SL, Jiang WG, Ruan Q. [Characteristics of HPV prevalence among women inLiaoning province, China.] Int J Gynaecol Obstet. (2010) 109(2): 105-109
14. Wallace J, Woda BA, Pihan G. [Facile, Comprehensive High-Throughput Genotyping of Human Genital Papillomaviruses Using Spectrally Addressable Liquid Bead Microarrays.] J Mol Diagn. (2005) 7(1): 72-80
15. Ursu RG, Onofriescu M, Nemescu D, Iancu LS. [HPV prevalence and type distribution in women with or withoutcervical lesions in the Northeast region of Romania.] Virol J. (2011) 22(8): 558

КЛЮЧ К СИМВОЛАМ

Ключ к символам, используемым в руководстве и на этикетках.

Символ	Пояснение
IVD	Медицинское устройство для диагностики *in vitro*
LOT	Код партии
REF	Номер по каталогу
	Срок годности
	Верхний предел температуры
PRIMER	Олигонуклеотидная смесь для амплификации и детекции
ENZYME	Ферментная смесь
BUFFER	Буфер
WATER	Вода, не содержащая РНКаз
CONTROL +	Положительный контроль (ПК)
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Производитель
	Дата изготовления
EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
	Внимание
	Содержит достаточное количество <n> тестов
UDI	Уникальный идентификатор устройства
rxns	Штрих-код реакции для автоматизированной системы экстракции

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №.	Продукт	Размер
Серия Allplex™ HPV		
HP10373Z	**Allplex™ HPV28 Detection**	**25 ркcн**
HP10372X	**Allplex™ HPV28 Detection**	**100 ркcн**
HP10371Z	Allplex™ HPV HR Detection	25 ркcн
HP10370X	Allplex™ HPV HR Detection	100 ркcн
HP10376L	Allplex™ HPV HR Detection	100 ркcн x 8 наборов
Автоматизированные системы извлечения		
65415-02	Микролаборатория NIMBUS IVD	EA
173000-075	Микролаборатория STARlet IVD	EA
65415-03	Seegene NIMBUS	EA
67930-03	Seegene STARlet	EA
SG72100	AIOS	EA
744300.4.UC384	Универсальный комплект картриджей STARMag 96 X 4	384T / 1 коробка
SG71100	SEEPREP32	EA
EX00009P	STARMag 96 ProPrep (Plate Type)	96T / 1 коробка
EX00009T	STARMag 96 ProPrep (Tube Type)	96T / 1 коробка