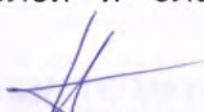


«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека


В.Г. Акимкин

« 4 » июня 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® HNV7-скрин/монитор-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	19
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	21
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)	23
СОСТАВ	23
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	23
А. Подготовка проб для амплификации	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	26
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	31
СОСТАВ	31
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	31
А. Подготовка проб для амплификации	31
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	32
В. Анализ и интерпретация результатов	34
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	39
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок β -глобинового гена человека)
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FL	- ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ВГЧ-7 (HHV7)	- вирус герпеса человека 7

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® HHV7-скрин/монитор-FL предназначен для количественного определения ДНК вируса герпеса человека 7 (*Human betaherpesvirus 7*, ВГЧ-7, HHV7) в биологическом материале (плазма крови, цельная кровь, слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговая жидкость) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на инфекцию, вызванную ВГЧ-7, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания. Противопоказания отсутствуют, за исключением

случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК экзогенного и эндогенного ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Экстракция ДНК проводится в присутствии экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. В качестве эндогенного внутреннего контроля используется участок ДНК β -глобинового гена человека (ВКО Glob), который позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала, его транспортировки и хранения. Являясь участком генома человека, ДНК ВКО Glob должна всегда присутствовать в биологическом материале, содержащем клетки человека (цельная кровь и мазки со слизистой оболочки ротоглотки).

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК ВГЧ-7 возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между логарифмом исходной концентрации ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени, аттестованными по методике Изготовителя. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация трех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК участка β -глобинового гена (BKO Glob)	ДНК ВГЧ-7	ДНК BKO-FL
Область амплификации	β -глобиновый ген	MCP-ген	Искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон измерения и предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Предел обнаружения, копий/мл	Диапазон измерения, копий/мл
Плазма крови	—	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN	200	500 – 1x10 ⁷
	—			«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		
	—	200	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN		
	—			«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		
Цельная кровь	—	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN		
	—			«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		
Слюна	—	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN		
	—			«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	«Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков»	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN		
				«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		
Спинно-мозговая жидкость	—	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN		
	—			«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		
	—	200	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN		
	—			«ПЦР-комплект» вариант FRT-L		

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие,

транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участок ДНК ВГЧ-7 (клинический образец, содержащий ДНК ВГЧ-7 в концентрации не менее 10^4 копий/мл, специфичность подтверждена методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей).

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также ДНК человека:

- Штаммы *Human gammaherpesvirus* 4 NIBSC №09/260, *Human polyomavirus* 1 NIBSC №14/212, *Human polyomavirus* 2 NIBSC №14/114, *Primate erythroparvovirus* 1 NIBSC № 99/802, *Human betaherpesvirus* 5 NIBSC № 09/162 из коллекции NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, UK) в концентрации не менее 5×10^5 МЕ/мл;
- Штаммы *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 12386™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538P™ из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации не менее 1×10^7 копий/мл;
- Клинические изоляты панели штаммов и изолятов, находящейся в распоряжении ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: *Enterovirus* spp., *Human alphaherpesvirus* 1, *Human alphaherpesvirus* 2, *Human alphaherpesvirus* 3, *Human betaherpesvirus* 6A, *Human betaherpesvirus* 6B, *Rubella virus*, *Human respiratory syncytial virus*, *Human metapneumovirus*, *Human parainfluenza virus* types 1-4, *Human coronavirus* (NL-63, 229E, HKU-1, OC43), *Human rhinovirus*, *Human adenovirus* B, C, E, *Human bocavirus*, *Influenza virus* A, *Influenza virus* B в концентрации не менее 1×10^4 копий/мл;
- ДНК человека, производства Sigma-Aldrich, США, в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл.

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

Информация об интерферирующих веществах указана в

разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования образцов негативной плазмы крови, в которых предварительно не была выявлена ДНК ВГЧ-7, а затем был добавлен стандартный образец предприятия, содержащий ДНК ВГЧ-7, до конечных концентраций ДНК ВГЧ-7 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 копий/мл (см. табл. 3, 4).

Таблица 3

Повторяемость

АмплиСенс® HIV7- скрин/монитор- FL	Комплект для экстрак- ции	Выяв- ляемый патоген	Исходное значение концент- рации, копий/мл	Коли- чество повто- ров	Среднее значение концентра- ции, lg	Стандарт- ное отклонение (SD)	Кoeffи- циент вариации (CV), %
Форма 1	«РИБО- преп»	ВГЧ-7	1×10^6	10	5,9	0,03	0,4
			1×10^5	10	5,0	0,02	0,5
			1×10^4	10	4,0	0,04	0,9
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-7	1×10^6	10	6,1	0,03	0,5
			1×10^5	10	5,3	0,08	1,4
			1×10^4	10	4,2	0,09	2,1
Форма 2	«РИБО- преп»	ВГЧ-7	1×10^6	10	6,0	0,03	0,6
			1×10^5	10	4,9	0,06	1,3
			1×10^4	10	4,1	0,08	2,0
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-7	1×10^6	10	6,1	0,04	0,7
			1×10^5	10	5,1	0,06	1,2
			1×10^4	10	4,0	0,08	1,9

Таблица 4

Воспроизводимость

АмплиСенс® HIV7- скрин/монитор-FL	Комплект для экстрак- ции	Выяв- ляемый патоген	Исходное значение концент- рации, копий/мл	Коли- чество повто- ров	Среднее значение концентра- ции, lg	Стандарт- ное отклонение (SD)	Кoeffи- циент вариа- ции (CV), %
Форма 1	«РИБО- преп»	ВГЧ-7	1×10^6	80	6,0	0,08	1,3
			1×10^5	80	5,0	0,10	2,1
			1×10^4	80	4,0	0,09	2,3
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-7	1×10^6	80	6,1	0,14	2,4
			1×10^5	80	5,1	0,20	4,0
			1×10^4	80	4,1	0,16	4,0
Форма 2	«РИБО- преп»	ВГЧ-7	1×10^6	80	6,1	0,12	2,0
			1×10^5	80	5,1	0,15	3,0
			1×10^4	80	4,0	0,14	3,4
	«МАГНО- сорб»	ВГЧ-7	1×10^6	80	6,1	0,10	1,6
			1×10^5	80	5,0	0,12	2,5
			1×10^4	80	4,0	0,10	2,4

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах, на разных сериях набора реагентов.

Правильность

Правильность была определена путем тестирования образцов негативной плазмы крови, в которых предварительно не была выявлена ДНК ВГЧ-7, а затем был добавлен стандартный образец предприятия, содержащий ДНК ВГЧ-7, до конечной концентрации $1,3 \times 10^6$ копий/мл (см. табл.5).

Таблица 5

Правильность

АмплиСенс® HIV7- скрин/монитор-FL	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение, lg	Систематическая погрешность (Б), %
Форма 1	25	6,00	6,00	0,00
Форма 2	25	6,04	6,00	0,67

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы образцы биологического материала детей с первичной инфекцией в возрасте от года до трех лет с подтвержденным диагнозом по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ 10): B08.2 Экзантема внезапная (шестая болезнь), а именно: 180 образцов цельной крови, 180 образцов слюны и 180 мазков со слизистой оболочки ротоглотки. Для подтверждения диагностической чувствительности в спинномозговой жидкости и образцах плазмы крови были протестированы по 180 негативных образцов с добавлением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК ВГЧ-7, до концентраций ДНК ВГЧ-7 от 500 до 1×10^7 копий/мл.

Для подтверждения диагностической специфичности использовано по 180 образцов плазмы крови, цельной крови, слюны, мазков со слизистой оболочки ротоглотки условно-здоровых доноров крови, а также 180 образцов спинномозговой жидкости пациентов без вирусной инфекции.

В качестве референтного метода использовалась система QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР (QX100 droplet digital PCR) (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США, РУ № ФСЗ 2012/13278).

Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

**Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® HNV7-скрин/монитор-FL
в сравнении с референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® HNV7-скрин/монитор-FL		Результаты применения референтного метода	
			положительных	отрицательных
Плазма крови	Всего исследовано 360 образцов	положительных	180	0
		отрицательных	0	180
Цельная кровь	Всего исследовано 360 образцов	положительных	180	0
		отрицательных	0	180
Слюна	Всего исследовано 360 образцов	положительных	180	0
		отрицательных	0	180
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Всего исследовано 360 образцов	положительных	180	0
		отрицательных	0	180
Спинномозговая жидкость	Всего исследовано 360 образцов	положительных	180	0
		отрицательных	0	180

Таблица 7

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® HNV7-скрин/монитор-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
Плазма крови	100 (98,3 – 100) %	100 (98,3 – 100) %
Цельная кровь	100 (98,3 – 100) %	100 (98,3 – 100) %
Слюна	100 (98,3 – 100) %	100 (98,3 – 100) %
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	100 (98,3 – 100) %	100 (98,3 – 100) %
Спинномозговая жидкость	100 (98,3 – 100) %	100 (98,3 – 100) %

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г,

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания, или аналогичный).
3. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
4. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований in vitro (например, Green Vac-Tube, Green Cross Medical Science Corporation («Грин Кросс Медикал Сайнс Корпорейшн»), Корея).
5. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований in vitro (например, Green-Vac[®], Shina Corporation («Шина Корпорейшн»), Корея).
6. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичная).
7. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша, или аналогичная).
8. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

9. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (ПУ № ФСР 2010/09505) для предобработки цельной периферической и пуповинной крови.
10. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
14. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
15. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
16. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
17. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
19. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

20. Комплект реагентов для экстракции ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции «Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция ДНК из исследуемых образцов») – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
21. Комплект реагентов для экстракции ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции «Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция ДНК из исследуемых образцов») – «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265).
22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

23. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
24. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
26. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
27. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
28. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
29. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
30. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

31. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
32. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- плазма крови,
- цельная кровь,
- слюна,
- мазки со слизистой оболочки ротоглотки,
- спинномозговая жидкость.

Плазма крови

Для получения образцов плазмы крови взятие крови следует производить натощак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку с ЭДТА (специальная вакуумная система типа «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6% EDTA)). После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. В течение 6 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого центрифугируют пробирки с цельной кровью при 3 тыс об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре. Полученную плазму отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 5 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – до 3 месяцев.
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Цельная кровь

Взятие крови следует производить натощак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку с ЭДТА (специальная вакуумная система типа «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6% EDTA)). После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть

вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтom.

Допускается хранение образцов до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 72 ч с момента взятия материала.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Слюна

Перед получением слюны следует провести полоскание полости рта водой. Слюну забирать в стерильные сухие пробирки объемом 2,0 мл или в пластиковые стерильные контейнеры объемом 50-60 мл в количестве не менее 0,5 мл.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие мазка проводят при помощи сухого стерильного зонда с тампоном вращательными движениями с поверхности небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия мазка рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Аккуратно обламывают полистирольную палочку на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставляют рабочую часть зонда с биологическим материалом в пробирке. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Допускается хранение образцов исследуемого материала до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 72 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Спинномозговая жидкость

Спинномозговую жидкость получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Взятие спинномозговой жидкости в количестве не менее 1 мл проводят в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом не менее 2 мл или контейнеры.

Допускается хранение образцов до предварительной подготовки/ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Допускается транспортирование образцов цельной крови, плазмы крови, мазков со слизистой оболочки ротоглотки при температуре от 2 до 8 °С в течение 72 часов, образцов слюны и спинномозговой жидкости при температуре от 2 до 8 °С в течение 24 часов.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы плазмы крови, слюны, мазков со слизистой оболочки ротоглотки и спинномозговой жидкости не требуют предварительной подготовки.

Образцы цельной крови требуют предварительной подготовки.

Отобрать 250 мкл цельной крови в одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Добавить 1 мл «Гемолитика». Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10-15 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 3 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, оставив 100 мкл осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку «Гемолитиком».

Полученный осадок должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции комплектом «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно).

Допускается хранение предобработанных образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 6 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – до 6 месяцев;
- при температуре не выше 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (плазма крови, цельная кровь, слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговая жидкость), используемом для исследования (см. табл. 8).

Были протестированы образцы без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего

вещества указана в табл. 8. Все образцы (плазма крови, цельная кровь, слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, спинномозговая жидкость) содержали стандартный образец предприятия с концентрациями ДНК ВГЧ-7 1×10^5 и 2×10^2 копий/мл.

Таблица 8

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Плазма крови, цельная кровь	Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Общий холестерин	78 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	Не обнаружено
		Триглицериды	37,0 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Не обнаружено
		Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества ⁴	Калия ЭДТА	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
		Лития гепарин	от 12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
Слюна, мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Экзогенные вещества	Хлоргексидин	0,5 %	Не обнаружено
		Стоматофит®	1,5 %	Не обнаружено
		Мирамистин®	0,001 %	Не обнаружено
Спинно-мозговая жидкость	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,89 ммоль/л)	Не обнаружено
		Лейкоциты	500 кл/мм ³ (верхняя граница нормы – 20 кл/мм ³)	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

⁴ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» – для экстракции ДНК из плазмы крови, цельной крови, слюны, мазка со слизистой оболочки ротоглотки и спинномозговой жидкости в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов,
- «МАГНО-сорб» – для экстракции ДНК из плазмы крови и спинномозговой жидкости в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

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

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

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

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

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

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ПК О ННУ7** и **90 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

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

Объем ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку (подробнее см. в инструкции к комплекту «МАГНО-сорб»).

Объем исследуемого образца – **200 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **20 мкл ПК О ННУ7** и **180 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл**.

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN – комплект реагентов для амплификации участка ДНК ВГЧ-7 с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>HHV7</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
К1 <i>HHV7</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 <i>HHV7</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО <i>HHV7</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL HNV7** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL HNV7** и **ПЦР-буфером-Н**. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL HNV7**, **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL HNV7** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **ДНК-калибратор K1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл K1 HNV7**.
 - б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл K2 HNV7**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
 - г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ПКО **HNV7**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 9).

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК ВКО Glob	ДНК ВГЧ-7	ДНК ВКО-FL

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов.

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВГЧ-7, ДНК человека (ВКО Glob) и ДНК ВКО-FL в копиях/реакцию. Полученные значения используются для расчета количества копий ДНК ВГЧ-7 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО-FL в реакцию}} \times A \times B = \text{копий/мл}$$

где:

A – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

A =	$\frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$
------------	---

B – число копий ВКО в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

Полученные значения концентрации ДНК ВГЧ-7 (при экстракции из цельной крови) могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВГЧ-7 на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВГЧ-7 производят согласно формуле:

$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК человека в реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) =$	$\lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-7 на } 10^5 \text{ клеток человека})$
---	---

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно определенного количества клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента B указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов АмплиСенс® HNV7-скрин/монитор-FL путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
Невалидный (при исследовании цельной крови)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
Невалидный (при исследовании мазков со слизистой оболочки ротоглотки)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию, и отсутствует значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
ДНК ВГЧ-7 не обнаружена	Значение C_t для ДНК ВГЧ-7 отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение C_t меньше граничного
менее 500 копий ДНК ВГЧ-7/мл	ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов.
$X \times 10^y$ копий ДНК ВГЧ-7/мл	ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов.
более 1×10^7 копий ДНК ВГЧ-7/мл	ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К- (например, в 10 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца

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

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

Таблица 12

**Результаты для контролей различных этапов
ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контролиру- емый этап ПЦР-иссле- дования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		
		FAM	JOE	ROX
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение Ct и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение Ct и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение Ct и расчетная концентрация
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение Ct и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение Ct и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение Ct и расчетная концентрация

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct и диапазон концентрации ПКО *HHV7* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
2. Рассчитанная концентрация ПКО *HHV7* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо

- предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК;
- б) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участка ДНК ВГЧ-7 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>HHV7-Lyo</i>	Порошок белого цвета	—	96 пробирок объемом 0,2 мл
K1 <i>HHV7</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K2 <i>HHV7</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО <i>HHV7</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *HHV7-Lyo* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K1 HNV7**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K2 HNV7**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО HNV7**.

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

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 13).

Таблица 13

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
ротаторного⁷ и планшетного⁸ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁷ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁸ Например, CFX 96 (Bio-Rad), ДТ-96 (ООО "НПО ДНК-Технология") и другие, рекомендованные Изготовителем.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трем каналам:

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК ВКО Glob	ДНК ВГЧ-7	ДНК ВКО-FL

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений концентраций ДНК ВГЧ-7, ДНК человека в копиях/реакцию и ДНК ВКО-FL в копиях/реакцию. Расчет количества ДНК ВГЧ-7 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов проводится по формуле:

$$\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК ВКО-FL в реакцию}} \times A \times B = \text{копий/мл}$$

где:

A – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

B – число копий ВКО в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

При экстракции ДНК из образцов цельной крови полученные значения концентрации ДНК ВГЧ-7 могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число копий ДНК ВГЧ-7 на 10^5 клеток человека). Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВГЧ-7 производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{число копий ДНК ВГЧ-7 в реакцию}}{\text{число копий ДНК человека в реакцию}} \times 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{число копий ДНК ВГЧ-7 на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

Примечание – Нормированные значения концентраций

отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента В указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов АмплиСенс® HNV7-скрин/монитор-FL путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 15

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора ROX отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
Невалидный (при исследовании цельной крови)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакцию, и отсутствуют значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
Невалидный (при исследовании мазка со слизистой оболочки ротоглотки)	Концентрация ДНК ВКО Glob менее 500 копий/реакцию, и отсутствуют значение рассчитанной концентрации по каналу для флуорофора JOE. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае если в исследуемом образце ДНК ВКО Glob отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование
ДНК ВГЧ-7 не обнаружена	Значение C_t для ДНК ВГЧ-7 отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX определено значение C_t меньше граничного
менее 500 копий ДНК ВГЧ-7/мл	ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
$X \times 10^y$ копий ДНК ВГЧ-7/мл	ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов
более $1,0 \times 10^7$ копий ДНК ВГЧ-7/мл	ДНК ВГЧ-7 обнаружена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ДНК реагентом К- (например, в 10 раз) и

Результат	Интерпретация
	повторить тестирование. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 16 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 16

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролиру- емый этап ПЦР-иссле- дования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		
		FAM	JOE	ROX
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
2. Рассчитанная концентрация ПКО *HNVT* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - б) по каналу для флуорофора ROX значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значения порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует

участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

Транспортирование: Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °C не более 3 дн в термоконтейнерах с охлаждающими элементами, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °C не более 3 сут.

Формы 1. Комплект реагентов «ПЦР-анализ» версии FRT-1/100 ПЧ хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °C, кроме ПЦР-буфера и ПЦР-смеси FL HNV. ПЦР-буфер и ПЦР-смесь FL HNV хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °C. ПЦР-смесь FL HNV хранить в защищенном от света месте.

Формы 2. Комплект реагентов «ПЦР-анализ» версии FRT-1 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °C. ПЦР-смесь HNV-Lys хранить (до растворения) в пакетах-экспонистаторах в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регулируемый температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основным параметрам и характеристикам набора реагентов требованиям, указанным в Таблице 1, и сохранение работоспособности в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинские изделия не подлежат ремонту и замене.

Рекомендуем на место набора реагентов направлять по адресу: 11123, Москва, ул. Мясницкая, дом 3А, e-mail: obn@circ.ru.

Ссылка на программное обеспечение: www.goszdravnadzor.ru, ссылка на сайт производителя: www.cirm.ru.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение.

● **Форма 1.** Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить в холодильных камерах при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *HNVT*. ПЦР-буфер-Н и ПЦР-смесь-FL *HNVT* хранить в морозильных камерах при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *HNVT* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *HNVT*-Lyо хранить (до растворения) в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГARANТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

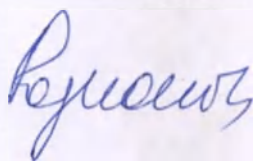
Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹⁰.

⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

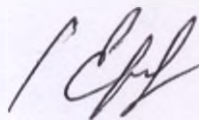
При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 41
сорок один лист

Директор ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии
Роспотребнадзора

« 4 » июня 20 21 г.

М.П.

В.Г. Акимкин

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 1 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
и.м.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.

Система для проведения монокапельной цифровой ПЦР QX100

QX100 droplet ридер

Руководство по эксплуатации



Содержание

ОБЗОР	1
ОБОРУДОВАНИЕ	1
ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ - ddPCR	4
- Работа ddPCR	5
- Анализ результатов	7
ТАБЛИЦА ИНДИКАЦИИ ИНДИКАТОРА СОСТОЯНИЯ	10
ОЧИСТКА	10
КОНТРОЛЬ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	10
ОБСЛУЖИВАНИЕ	10
ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И ТРЕБОВАНИЯ	11
- Общие данные	11
- Технические данные	11
- Расходные материалы и номера деталей	11
- Требования по вентиляции	12
- Электротехнические требования	12
- Описание соединений	12
- Безопасность использования	13
- Удаление и утилизация отходов	13
- Опасные ситуации	14
- Обозначения	14

ОБЗОР

НАЗНАЧЕНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ:

QX100 droplet ридер обеспечивает анализ капель с помощью программного обеспечения ddPCR, которые были получены путем использования QX100 droplet генератора, а затем подвергнуты амплификации до конечной точки в стандартном термоциклере. QX100 droplet ридер использует 96-луночные планшеты с капельной эмульсией в каждой лунке, загружает капли поочередно из каждой лунки, а затем выводит амплитуду данных для точного подсчета каждой капли с использованием программного обеспечения ddPCR.

Сопутствующая компьютерная информация

А. УЧЕТНЫЕ ДАННЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

На компьютере, поставляемом с этой системой, имеется две учетные записи данных. Первоначально следует запустить систему согласно учетным данным пользователя. Учетная запись администратора предоставляется для установки программного обеспечения и внесения изменений в сетевые установки.

- **Пользователь:** Местная учетная запись не администратора, отсутствие пароля
- **Администратор:** Местная учетная запись администратора для установки программного обеспечения и обновлений.

В. ПРИЛОЖЕНИЯ И УСТАНОВКИ

Приложения на компьютере настроены так, чтобы обеспечить безопасность данной системы, хотя это не оказывает влияния на характеристики датчика капель.

- **Антивирус:** Установлена программа Free Microsoft Security Essentials.
- **Обновления операционной системы Windows:** Установлена автоматическая загрузка, но установка сопровождается предварительным запросом.

ОБОРУДОВАНИЕ

QX100 Droplet ридер

А. ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДЛЯ QX100 DROPLET РИДЕРА

- Плашка для ПЦР на 96-лунок, заклеенная пленкой из фольги.
- Масло для droplet ридера

В. ПРИНЦИП РАБОТЫ QX100 DROPLET РИДЕРА

1. Включение питания droplet ридера (ДК). Время ожидания для прогрева ДК 30 минут.

2. Проверка индикаторов на передней панели для подтверждения того, что в масляном резервуаре достаточное количество масла и в приемнике менее 400 мл. Это очень важно для завершения работы (Рис. 1).



Рис 1 См. таблицу индикации индикатора состояния (Стр. 10)

При необходимости добавления какой-либо жидкости или удаления отходов выдвинуть каретку (Рис. 2) и осторожно открыть бутылку, удерживая одной рукой верх (или крышку), а другой поворачивая кольцо. Эту операцию выполняют двумя руками.



3. Поставить в держатель плашку, затем верхнюю часть держателя расположить на плашке сверху (Рис. 3). Это следует выполнить с помощью фиксирующих язычков сбоку, отогнув их вверх.

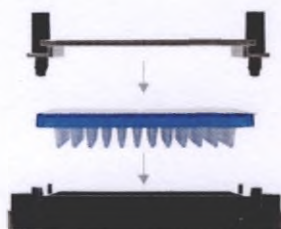


Рис. 3

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ – ddPCR

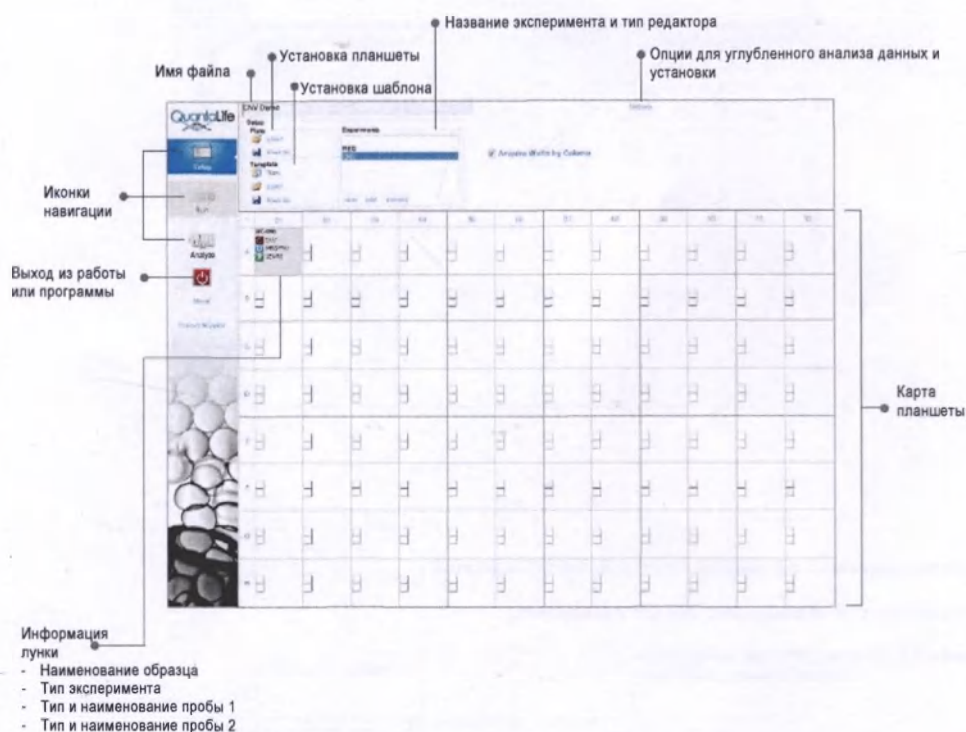
Программное обеспечение ddPCR предоставляет полный набор инструментов для подготовки и присваивания имени образцу, работы и управления прибором и анализа результатов этой работы. Каждая из этих трех главных функций объединена в набор окон, предназначенных для вашего руководства на протяжении всего рабочего процесса. При подготовке образца вы сможете ввести информацию о своих образцах, пробах и экспериментах. Рабочий режим позволяет управлять прибором и при необходимости остановить его работу. Наконец, функция анализа высчитывает концентрацию нуклеиновой кислоты, о которой представляется отчет в копиях на микролитр. Также имеется возможность вычислять число копий, если тип эксперимента установлен на CNV (вариация числа копий). На протяжении всей работы вы увидите, что практически все необходимые операции выполняются путем нажатия какой-либо кнопки.

Существует четыре главных типа файлов, используемых программным обеспечением:

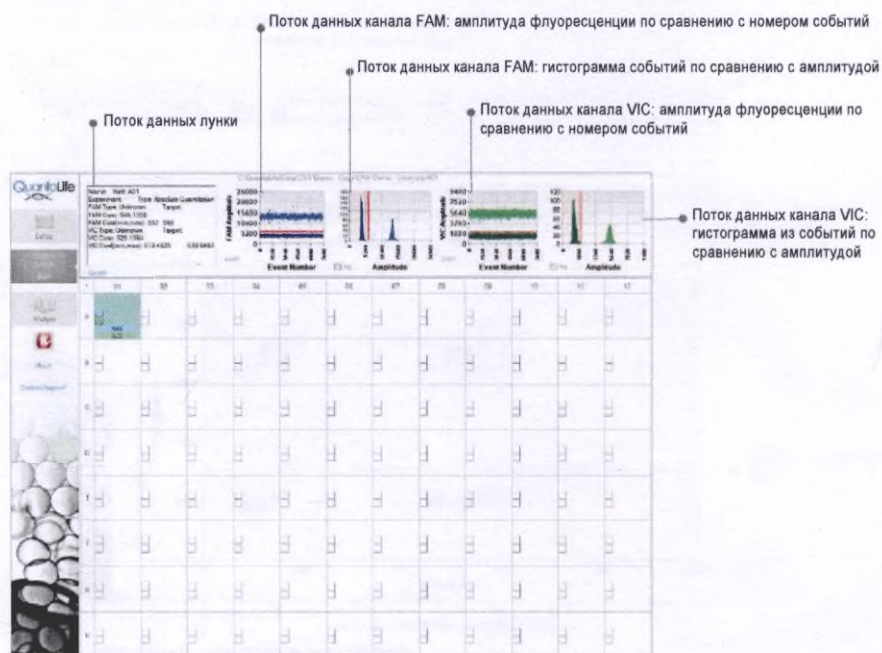
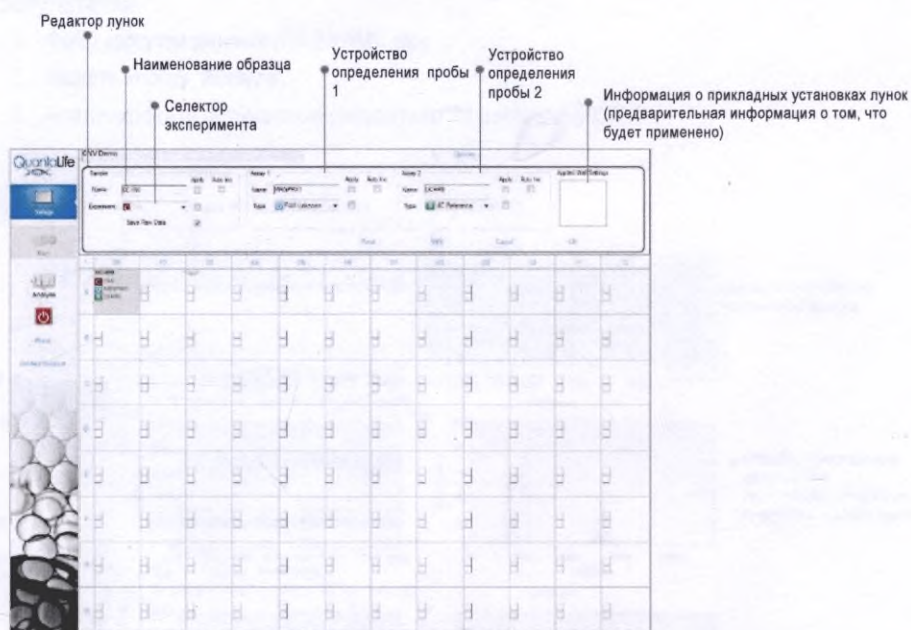
Файл	Описание
Файлы шаблонов (filename.qlt)	Содержит пользовательские типовые установки для чтения данных планшеты ddPCR.
Файлы результатов (filename.qrp)	Содержит пользовательские типовые установки для чтения данных планшеты ddPCR.
Файлы сырых данных (filename.qib)	Содержит исходные необработанные данные каждой отдельной лунки ddPCR.
Оценочные файлы, отделяемые запятой (filename.csv)	Содержит проанализированные данные в формате, который можно исследовать с помощью других программ, таких как Microsoft Excel.

Работа с ddPCR.

1. Ввести карту планшки для описания вашего эксперимента.
2. Нажать кнопку 'Run'.
3. После завершения работы вынуть планшету из ДК и не учитывать.

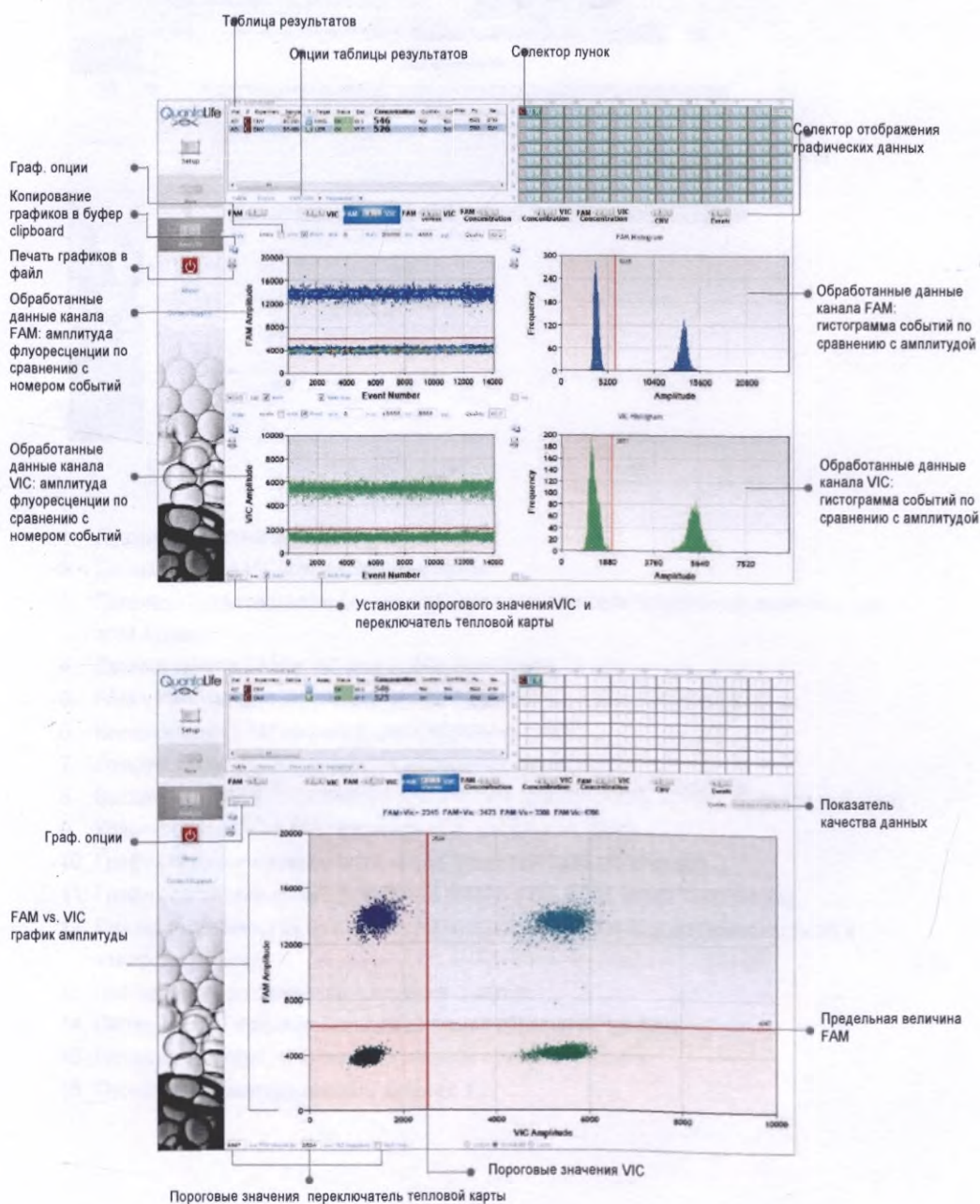


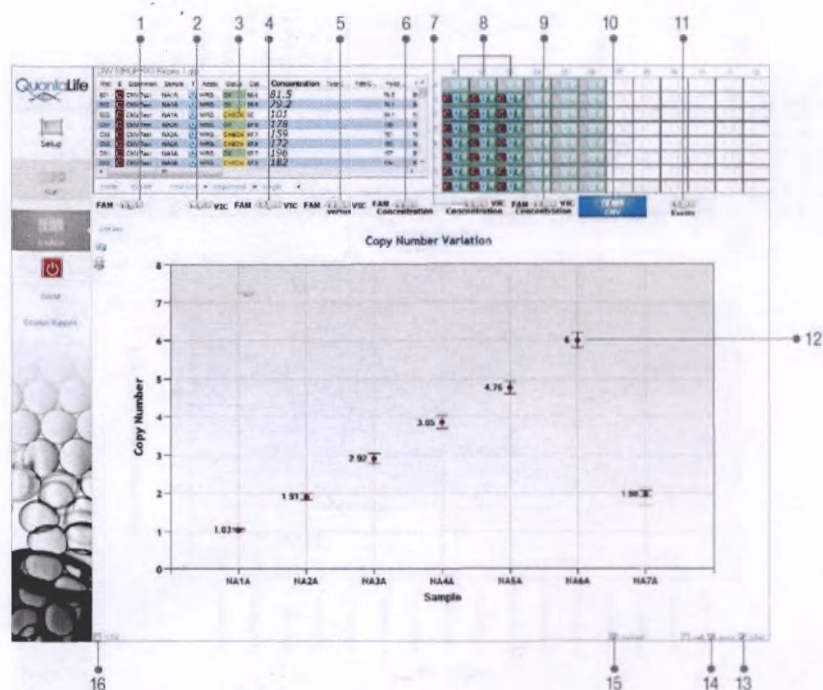
ПРИМЕЧАНИЕ: Выше не показано - промывочная система: Промывает жидкостные дорожки внутри прибора для устранения возможных закупок, Очистка наконечника: Не используется в настоящее время и Переход в позицию Отходы: Перемещает иглоу образца в позицию отходы. При обычном использовании эта операция не требуется.



Анализ результатов

1. Файл загрузки данных (FILENAME.q1p).
2. Нажать кнопку 'Analyze'.
3. Анализировать полученные результаты на вашем ddPCR.





1. Данные FAM канала для выбранных лунок
2. Данные канала VIC для выбранных лунок
3. Проверка пользователем рекомендуемых автоустановок предельной величины для этой лунки
4. Данные канала FAM и VIC для выбранных лунок
5. FAM vs VIC график интенсивности флюоресценции для выбранных лунок
6. Концентрация FAM мишеней для выбранных лунок
7. Концентрация VIC мишеней для выбранных лунок
8. Выбранные лунки, выделенные для анализа (расположены в порядке своей выборки)
9. Концентрация VIC и FAM мишеней для выбранных лунок
10. График вариации измеренного числа копий для каждого образца
11. График сосчитанного числа событий капель (VIC, FAM, Всего, Отклонено)
12. Планки погрешностей, указывающие пуассоновскую границу достоверности 95% измеренного CNV
13. Переключать отображение ярлыка на графике
14. Переключать отображение наименования образца на графике
15. Переключать отображение соединенной лунки на графике
16. Переключать мерную линейку для оси Y

ТАБЛИЦА ИНДИКАЦИИ ИНДИКАТОРА СОСТОЯНИЯ

ДАТЧИК КАПЕЛЬ				
				
Темно-синий	Включено	Уровень бутылки ОК	Планшета на месте	Полный рабочий цикл
Мерцающий синий	—	Уровень масла меньше 20% или отходы превышают 80%	—	В работе
Мерцающий янтарный	—	Уровень масла меньше 5% или отходы превышают 95%	—	Ошибка во время работы
Off (выключено)	Выключено	—	Нет планшеты	Не работает

ОЧИСТКА

Может потребоваться общая чистка поверхностей прибора. Для общей протирки прибора использовать только ионизированную/дистиллированную воду. Для удаления загрязнений можно использовать 10% хлорную известь, а также 70% этанол и/или ионизированную/дистиллированную воду. Не использовать ацетон или водопроводную воду.

КОНТРОЛЬ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Профилактическое обслуживание не требуется. Регулярно проверять оборудование на предмет повреждения внешних компонентов, проводов или трубок с жидкостью. В случае повреждений не использовать.

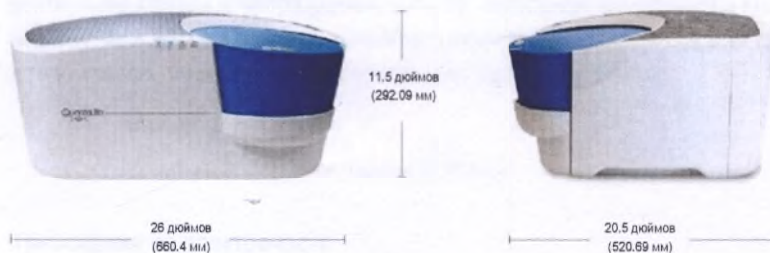


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Использование прибора или относящихся к нему деталей не предписанным в руководстве образом может быть опасно.

ОБСЛУЖИВАНИЕ

В случае неисправностей позвоните, чтобы запланировать визит мастера по обслуживанию. Для замены предохранителей, пробника или трубок позвоните, чтобы запланировать визит мастера по обслуживанию.

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И ТРЕБОВАНИЯ



Общие данные

Вес	Высота	Ширина	Длина
56.6 фунта (25.67 кг)	11.5" (292.09 мм)	20.5" (520.69 мм)	26" (660.4 мм)

Технические данные

Температура	Отметка высоты	Влажность
15 °C-30 °C	0-8000 футов	85% макс. (без конденсации)

Расходные материалы

Наименование
QX100 droplet ридер
Держатель для QX100 droplet ридера
Масло для QX100 droplet ридера 1 л
Набор реагентов
Бутылка для отходов/масла из полиэтилена высокой плотности (ПЭВП) 1л

Требования по вентиляции

Слева и справа от прибора должно быть 5" свободного пространства для правильной вентиляции. Позади прибора должно быть 10" свободного пространства для правильной вентиляции и доступа в случае аварийного отключения. С левой стороны прибора у датчика капель имеется съемная панель, для которой требуется:

- Многократный доступ
- Минимум 8" для выполнения действий

Требования по электрокасти

Стандартная местная номинальная мощность:

100 - 240 В пер. тока (50/60 Гц)

1.8/0.9 А (115/230 В пер. тока)

Тип предохранителя: 5 А/250 В пер. тока Тип 5НТ (5х20 мм)



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Необходимо регулярно проверять кабели и при повреждении не использовать. Не путать все поставляемые кабели.

Описание соединений

Номер детали: ETS240250UTC-P5RP-SZ, Вход: 100-240 В, 50-60 Гц/1.5 А, Выход: 24 В/2.5 А



1



2

1. USB 2.0 Тип штекера USB (на приборе) Standard-B, USB 2.0 Тип штекера USB (на компьютере) Standard-A. Кабели предоставляются.
2. Стандарт США NEMA 5-15/CSA 22.2, № 42). Рассчитан на 15 ампер при 125 вольт.

Безопасность использования

При работе с маслами и плашками с образцами рекомендуется правильное применение перчаток. Согласно требованиям OSHA (Управление США по охране труда и промышленной гигиене) к средствам индивидуальной защиты, изложенным в Своде федеральных правил (CFR) в 29 CFR 1910.132 (Общие требования); 29 CFR 1910.138 (Защита рук); 29 CFR 1926.95 (Критерии для стандартных средств индивидуальной защиты).

Следует выбросить или заменить любые перчатки с нарушенной защитной способностью. При принятии решения повторного использования перчаток, подвергаемых химическому воздействию, учитывать токсичность химических веществ и такие факторы, как продолжительность воздействия, хранения и температуры.

Правильный выбор перчаток при работе с приборами, пробами, маслами и очищающими растворителями.

- **Перчатки Butyl:** изготовлены из синтетической резины и защищают от пероксида, фтористоводородной кислоты, сильных щелочей, альдегидов и кетонов.
- **Перчатки из натуральной (латекс) резины:** удобные при носке и отличаются повышенной прочностью на разрыв, эластичностью и термостойкостью.
- **Неопреновые перчатки:** изготовлены из синтетической резины и отличаются хорошей эластичностью, удобством для пальцев, высокой плотностью и прочностью на разрыв, воздействие спиртов, органических кислот и щелочей.
- **Нитриловые перчатки:** изготовлены из сополимера и обеспечивают защиту от хлорированных растворителей, таких как трихлорэтилен и тетрахлорэтан. Они защищают при работе с маслами, смазками, кислотами и каустиками.

Отходы и утилизация



ВАЖНО: Планшеты droplet ридера генерируют 250 мл отходов масла на планшету.

При работе с накопившимися отходами и их удалении следует применять стандартные практики MSDS (сертификат безопасности материала) и OSHA.

Генерирование и учет жидкостей QX100 droplet основаны на химии фторированных углеводородов, которые следует удалять в соответствии с институциональными, государственными и местными нормами. Эти негорючие жидкости отличаются инертными свойствами, низким воздействием на экологию и невысокой токсичностью.

Отходы можно собирать в контейнеры ПЭНД, и в течение 1 месяца их следует утилизировать. Капли, созданные смесительным устройством QuantaLife, отличаются антимикробными свойствами, но со временем может наблюдаться рост микробов. Рекомендуемые параметры отходов включают следующее: фторированные углеводороды, воду, флюоресцентный краситель (от пробоотборников), протеиновая и нуклеиновая кислоты.



ПРИМЕЧАНИЕ: Для предотвращения роста микробов добавить в отходы 50 мл 10%-го раствора хозяйственной хлорной извести.

Опасные ситуации

Оставить свободное пространство 10" сзади датчика капель. В случае непредвиденного отключения выключатель питания, расположенный на задней панели прибора рядом с силовым кабелем, отключит его от источника питания.

Обозначения

	Знак CSA	Знак CSA указывает на то, что изделие, процесс или услуга протестированы Канадской ассоциацией по стандартизации или Соединенных Штатов, и отвечают требованиям действующего Канадского стандарта.
	Знак FCC	Это оборудование протестировано и соответствует ограничениям Класса А цифровых устройств согласно Части 15 Правил Федеральной комиссии связи США (FCC). Эти ограничения разработаны для обеспечения разумной защиты от вредных помех при эксплуатации оборудования в коммерческой среде. Это оборудование генерирует, использует и может излучать радиочастотную энергию и, если оно установлено и используется в соответствии с инструкциями изготовителя, может вызывать вредные помехи для радиосвязи. Эксплуатация данного оборудования в жилой зоне может вызывать помехи, и в этом случае пользователь должен устранить их за свой счет.
	WEEE	Символ Предписания по Утилизации электрического и электронного оборудования указывает на то, что, когда конечный пользователь хочет выбросить данный продукт, его следует направить на отдельный объект сбора отходов для утилизации и переработки.
	ВАЖНО	Этот символ обозначает информацию, которая имеет решающее значение для успеха вашего эксперимента и требует особого уведомления или повторения.
	ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ	Этот символ используется для указания на то, что несоблюдение инструкций или процедур может привести к физическим травмам или повреждению оборудования.
	ПРИМЕЧАНИЕ	Этот символ обозначает, что доступны сторонние обстоятельства, которые могут способствовать успеху вашего эксперимента.

Авторское право © 2011 Bio-Rad Laboratories, Inc.
Воспроизведение настоящей документации в любом виде,
печатном или электронном, запрещено без письменного
разрешения компании Bio-Rad Laboratories, Inc.

УВЕДОМЛЕНИЕ ПОКУПАТЕЛЯ О НАЛИЧИИ ЛИЦЕНЗИИ

Настоящий базовый блок, серийный номер _____, предоставляет ограниченный иммунитет от привлечения к суду без права передачи на всю деятельность заказчика, связанную с внутренними исследованиями и разработками, а также с применением в областях, защищенных патентом США № 5 475 610 (только патентные заявки 1, 44, 158, 160–163) или соответствующими формулами изобретения в неамериканских аналогах, принадлежащих компании Applera Corporation. Права не подлежат передаче в прямой форме или подразумеваемым образом любым другим патентным притязаниям на аппаратуру, реагенты, экипировку или методы, например анализы с использованием 5' нуклеазы. Для получения более подробной информации о приобретении лицензионных прав свяжитесь с директором по лицензированию компании Applied Biosystems по адресу: 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

Настоящий продукт защищен одним или более следующими патентами США, их иностранными аналогами или заявленными патентами, принадлежащими компании Eppendorf AG: Патенты США № 6 767 512 и 7 074 367.

Верно
Прошито, пронумеровано и скреплено печатью 16
шестидесять лист 06

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)



«9» 06 20 21 г.

М.П.

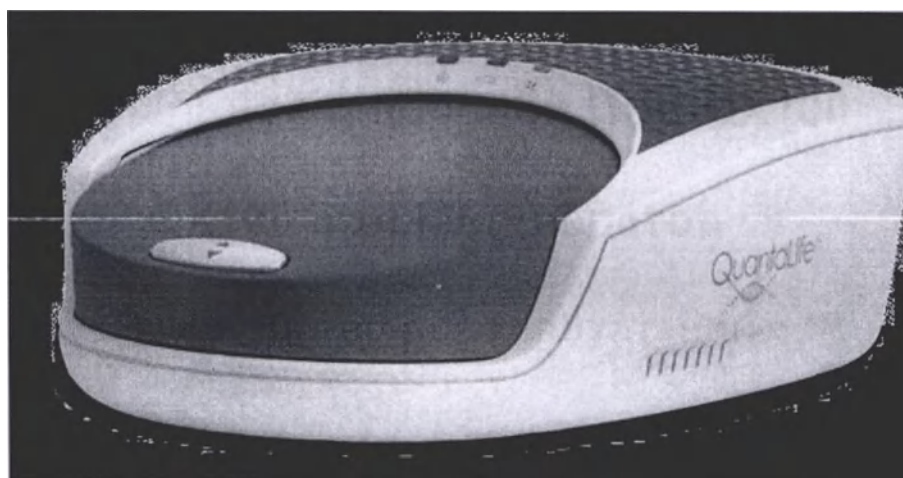
Е.А.Козлова

Система для проведения монокапельной цифровой ПЦР QX100

QX100 droplet генератор

Руководство по эксплуатации

Каталог № 1863002



Содержание

QX100 DROPLET ГЕНЕРАТОР	2
ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ	3
РАБОТА QX100 DROPLET ГЕНЕРАТОРА	3
ЗАКЛЕИВАНИЕ	8
ТАБЛИЦА ИНДИКАЦИИ ИНДИКАТОРА СОСТОЯНИЯ	9
ОЧИСТКА	9
ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И ТРЕБОВАНИЯ	10
- Общие данные	10
- Технические данные	10
- Требования по вентиляции	10
- Электротехнические требования	10
- Описание соединений	11
- Безопасность использования	11
- Отходы и утилизация	12
- Обозначения	12

Наша основная цель- ответить вам на любые вопросы по данной технологии.

Если вам нужна помощь, позвоните нам или отправьте электронное письмо.

QX100 DROPLET ГЕНЕРАТОР - НАЗНАЧЕНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ:

Система QX100 Droplet Digital™ PCR предназначена для проведения монокапельной цифровой ПЦР с высочайшей точностью и достоверностью результатов.

Эта система состоит из QX100 droplet генератора и QX100 droplet ридера, в котором измеряется флуоресценция в каждой капле.

Монокапельная цифровая ПЦР осуществляется в четыре последовательных этапа. Сначала 20 мкл каждого из восьми подготовленных образцов помещаются в картридж QX100 droplet генератора. Затем в соответствующие каналы картриджа заливается масло, и наполненный картридж устанавливают в QX100 droplet генератор, где образцы и масло соединяются для получения эмульсии ~ 20000 капель монодисперсных нанолитров для каждого из 8 подготовленных образцов. Эмульсионные образцы переносятся на стандартную 96-луночную плашку для ПЦР амплифицируются до конечной точки с помощью стандартного термоциклера. После завершения цикла плашка загружается в QX100 droplet ридер.

Ридер автоматически загружает каждый образец, разделяет капли и по одной направляет их через детектор флуоресценции со скоростью 1000 капель в секунду. Ридер детектирует каждую каплю по очереди и определяет, какие капли содержат мишень (1), а какие нет (0).

QX100 DROPLET ГЕНЕРАТОР

Оборудование для генерации капель

Наименование	Изготовитель	Номер детали
ddPCR 2X PCR Master Mix	Bio-Rad	1863010
20X Primer & TaqMan® Probe Mix	Лицензированный изготовитель	—
Масло генерации капель (DG) ddPCR™	Bio-Rad	1863005
Плашка на 96 лунок для ПЦР с полуюбкой	Различные	—
Держатель	Bio-Rad	1863051
Картридж генерации капель DG8™ и уплотнитель (960 реакционных эквивалентов)	Bio-Rad	1863006
Дозатор и наконечники 10 мкл	Различные	—
Дозатор и наконечники 1 мл	Различные	—
8-канальный дозатор	Различные	—
Аппарат для термозаклейки плашек	Eppendorf	—
Лоток для реагента (25 мл)	Различные	—
Пленки для заклеивания ПЦР плашек из фольги	Различные	—
2X Buffer Control	Bio-Rad	1863052

* Рекомендованное оборудование

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Подготовленный образец представляет из себя смесь ddPCR 2X PCR Master Mix, 20X Primer & TaqMan® Probe Mix и образец ДНК.

Примечания по подготовке:

- Всегда принимать стандартные меры предосторожности во избежание загрязнения реакционной смеси и образца. Это обеспечит целостность вашего эксперимента. Такие предосторожности включают использование перчаток, чистых дозаторов, полностью очищенную рабочую зону и пробирки низкого связывания с белком.
Вся работа проводится в ПЦР боксе.
- Если образец склонен к термическому разложению, может возникнуть необходимость подготовки реакционной смеси на льду. Тем не менее, за несколько минут до генерации капель реакционную смесь нужно довести до комнатной температуры.

РАБОТА QX100 DROPLET ГЕНЕРАТОРА

1. Собрать подготовленный образец и масло DG. Залить 500 мкл масла на 8 образцов в лоток для реагента с помощью соответствующей 8-канальной пипетки (Рис. 1).

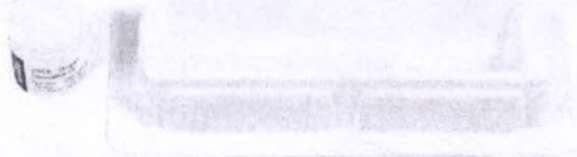


Рис. 1

2. Взять держатель и открыть нажатием защелки в середине (Рис. 2).

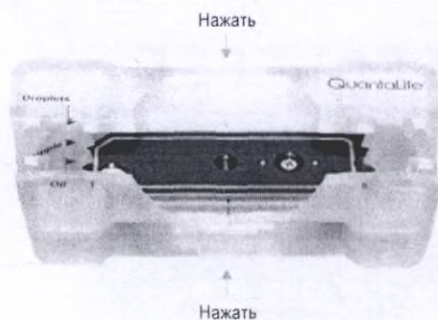


Рис. 2

3. Вставить картридж DG8 (Рис. 3) в держатель с выемкой в верхнем левом углу и нажать на края держателя до защелкивания, чтобы закрыть (Рис. 3А).



Рис. 3

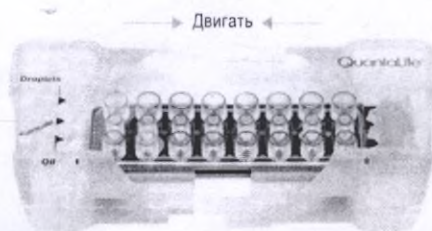


Рис. 3А



Закрето

4. Переместить по 20 мкл подготовленных образцов (см. протокол ПЦР по подготовке образцов) из 96-луночной планшеты или пробирок, с которыми вы работаете, в среднюю лунку картриджа DG8 (Рис. 4).

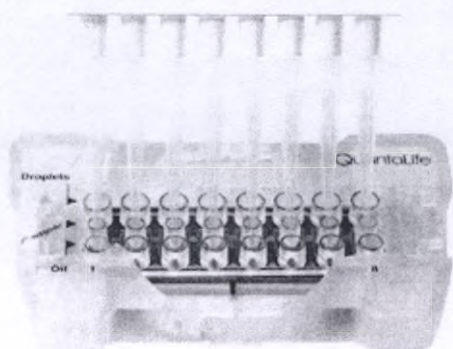


Рис. 4



ПРИМЕЧАНИЕ: Нет необходимости использовать 8-канальным дозатором. Можно пользоваться одноканальным дозатором.



ВАЖНО: Все 16 лунок должны содержать жидкость и масло. Если не все лунки используются для образца, до запуска чипа необходимо заполнить пустые лунки таким же объемом 1 X Buffer Control.

5. Заполнить нижние лунки масляного картриджа маслом DG по 60 мкл масла из лотка (Рис. 5).

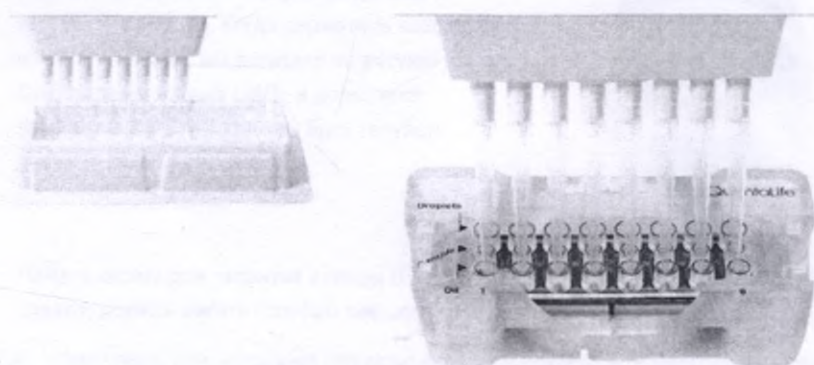


Рис. 5



ПРИМЕЧАНИЕ: Верхние лунки пустые и готовы принять генерированные капли.

6. Перекинуть уплотнитель через держатель DG8 по обе стороны. Необходимо надежно закрепить прокладку с двух сторон держателя. Следует выровнять отверстия по лункам держателя DG8 (Рис. 6).

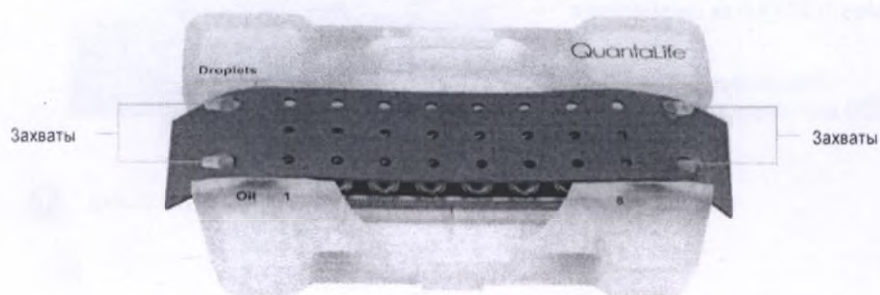


Рис. 6

7. Для работы с устройством нажать кнопку, чтобы открыть дверцу (Рис. 7).



Рис. 7

8. Поместить держатель с картриджем DG8 в устройство (Рис. 8). Когда держатель находится в том положении, как показано на рисунке, и СИД питания (левый СИД), и держателя (центральный СИД) должны быть голубого цвета.



Рис. 8

9. Нажать кнопку для закрытия дверцы (Рис. 7). Через 10 секунд СИД капель (дальний справа) должен мигать голубым светом, указывая на генерацию капель.



ПРИМЕЧАНИЕ: Если центральный СИД мигает янтарным светом (Рис. 9), В таком случае или уплотнитель не расположен правильно на держателе, либо отсутствует, или нет уплотнения. Если правый СИД мигает янтарным светом, тогда произошла ошибка при обработке данных в виду того, что объем одной или нескольких лунок слишком маленький. См. таблицу индикации индикатора состояния на стр. 9.

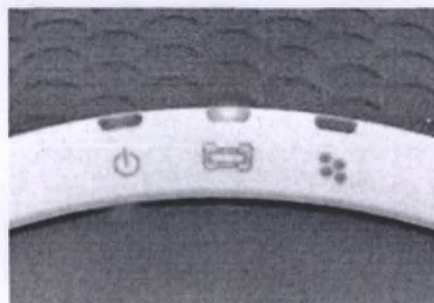


Рис. 9

10. Когда генерация капель завершена, все три индикатора должны светиться темно-синим цветом.
11. Нажать кнопку для открытия дверцы (Рис. 7) и удалить держатель (картридж DG8 остается в держателе) из QX100 droplet генератора
12. Удалить использованный уплотнитель из держателя DG8 и выбросить.



ВАЖНО: До выемки капель не вынимать контейнер DG8 из держателя.

13. Теперь в верхних лунках содержатся капли, а средние и нижние лунки почти пустые с небольшим количеством остаточного масла. Держатель плоско лежит на посадочном месте, 8-канальную пипетку установить на объем 35 мкл под углом $\sim 45^\circ$ так, что наконечники этой пипетки опираются на дальний край лунок верхнего ряда контейнера DG8 (Рис. 10). (Не располагать наконечники внизу лунки во избежание соприкосновения между наконечниками пипеток и нижней частью лунок.). Медленно наберите 35 мкл каплей из выходных лунок.

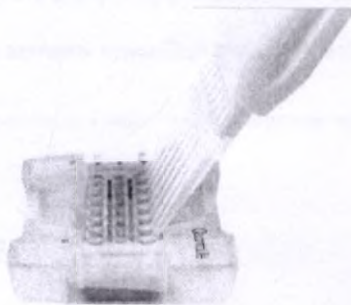


Рис. 10

14. Медленно переместите капли в ряд 96-луночной плашки (Рис. 11). При использовании одноканальной пипетки повторять операцию, пока не опустошатся все лунки сгенерированных вами капель.

! ВАЖНО: Переливать медленно.

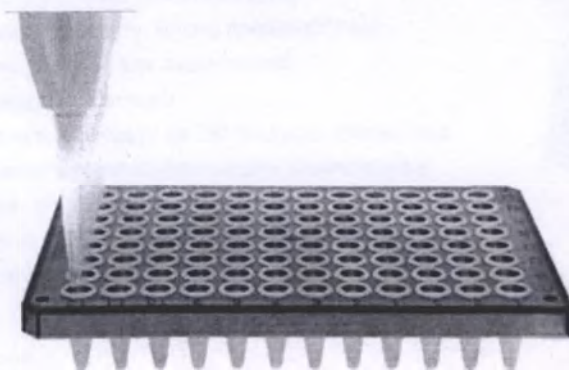


Рис. 11

Избегать сжатия или отпускания плунжера дозатора при максимальной скорости. Применяйте равномерное давление на плунжер, чтобы правильно переливать капли, и постепенно набирать их в наконечники дозаторов или удалять из них. Это обеспечит целостность ваших капель.

15. Как только капли удалены, надавить на держатель картриджа DG8, чтобы открыть и удалить картридж. Выбросить использованный картридж DG8.
16. При необходимости повторить этапы 1-15 для заполнения 96-луночной ПЦР плашки.
17. Сразу после переливания заклеить лунки ПЦР плашки во избежание испарения.



ПРИМЕЧАНИЕ: Не оставлять эмульсию в открытых пробирках дольше чем на 30 мин при комнатной температуре.

ЗАКЛЕИВАНИЕ



ВАЖНО: Включить приспособление для заклеивания планшетов минимум за 10 минут до начала эксперимента.

С целью заклеивания планшеты фольгой использовать термическое приспособление для заклеивания планшетов Eppendorf (Рис. 12):

- Включить приспособление для заклеивания планшетов Eppendorf, чтобы его разогреть.
- Поместить пленку из фольги на планшету и вставить в приспособление для заклеивания.
- Заклеить планшету, крепко прижимая к ней приспособление для заклеивания. Удерживать 3 секунды.
- Повернуть планшету на 180 градусов. Надавить и удерживать приспособление для заклеивания в течение еще 3 секунд.
- После заклеивания плашка готова к помещению в термоциклер.

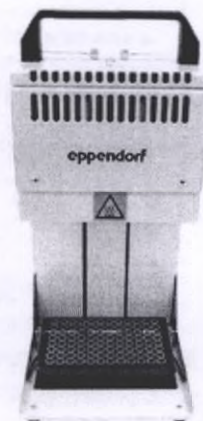


Рис. 12



ВАЖНО: Убедиться, что все лунки планшеты полностью закрыты.



Рис. 13

Когда планшета правильно заклеена, на фольге видны следы вдавливания покрытых лунок (Рис. 13). Это визуальное подтверждение является решающим для вашего эксперимента.



ВАЖНО: Термоциклирование начать в течение 30 мин. после заклеивания планшета.



ПРИМЕЧАНИЕ: Перед началом теплового цикла планшета можно хранить при 4 °С до четырех часов.

ТАБЛИЦА ИНДИКАЦИИ ИНДИКАТОРА СОСТОЯНИЯ

Генератор капель			
			
Темно-синий	Питание включено	Держатель DG8 установлен	Полный рабочий цикл
Мигающий синий	—	—	Создание капель
Мигающий янтарный	—	Нет уплотнителя, пустая лунка или не заклеено	Лунка с маленьким объемом
Off (выключено)	Питание выключено	Нет держателя DG8	Не работает

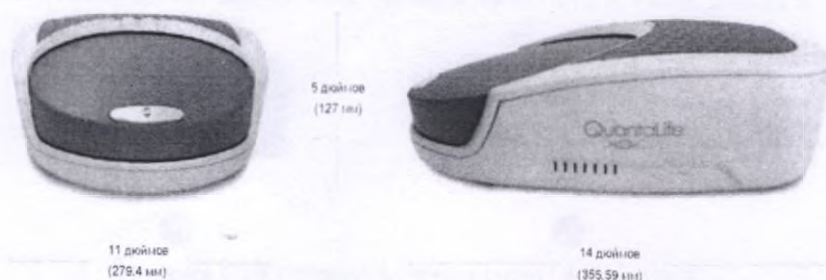
ОЧИСТКА

Может потребоваться общая чистка поверхностей прибора. Для общей протирки прибора использовать только ионизированную/дистиллированную воду. Для удаления загрязнений можно использовать 10% хлорную известь, а также 70% этанол и/или ионизированную/дистиллированную воду. Не использовать ацетон или водопроводную воду.

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Профилактическое обслуживание не требуется. Регулярно проверять оборудование на наличие поврежденных компонентов или проводов. В случае повреждений не использовать.

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И ТРЕБОВАНИЯ



Общие данные

Вес	Высота	Ширина	Длина	Требования по электрочасти
4.54 кг	5" (127 мм)	14" (355.59 мм)	11" (279.4 мм)	100-240 В, 50/60 Гц 60 Вт

Технические данные

Температура	Отметка высоты	Влажность
15°C-30 °C	0-8000 футов	85% макс. (без конденсации)

Требования по вентиляции

Слева и справа от прибора должно быть 5" свободного пространства для правильной вентиляции.

Электротехнические требования

Стандартная местная номинальная мощность:
Вольт: 100-240 В, Частота: 50/60 Гц, Мощность: 60 Ватт

QX100 droplet генератору требуется 1 стандартная электрическая розетка с силовым заземлением. До подключения оборудования пользователь должен убедиться, что заземление правильно работает.

Описание соединений

№ детали: ETS240250UTC-P5RP-SZ, Вход: 100-240 В, 50-60 Гц/1.5 А, Выход: 24 В/2.5 А



1



2

1. Штепсель США Стандарт 3 к соединителю C5 (10 А/125 В)
2. Блок питания для штепселя силового входа пост. тока 5 мм.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Использовать ТОЛЬКО источники электропитания, предоставленные компанией Bio-Rad для этого оборудования.

Безопасность использования

При работе с маслами и плашками для образцов рекомендуется применение перчаток. Согласно требованиям OSHA (Управление США по охране труда и промышленной гигиене) к средствам индивидуальной защиты, изложенным в Своде федеральных правил (CFR) в 29 CFR 1910.132 (Общие требования); 29 CFR 1910.138 (Защита рук); 29 CFR 1926.95 (Критерии для стандартных средств индивидуальной защиты).

Следует выбросить или заменить любые перчатки с нарушенной защитной способностью. При принятии решения повторного использования перчаток, подвергаемых химическому воздействию, учитывать токсичность химических веществ и такие факторы, как продолжительность воздействия, хранения и температуры.

Правильный выбор перчаток при работе с приборами, пробами, маслами и очищающими растворителями.

- Перчатки Butyl: изготовлены из синтетической резины и защищают от пероксида, фтористоводородной кислоты, сильных щелочей, альдегидов и кетонов.
- Перчатки из натуральной (латекс) резины: удобные при носке и отличаются повышенной прочностью на разрыв, эластичностью и термостойкостью.
- Неопреновые перчатки: изготовлены из синтетической резины и отличаются хорошей эластичностью, удобством для пальцев, высокой плотностью и прочностью на разрыв, воздействие спиртов, органических кислот и щелочей.
- Нитриловые перчатки: изготовлены из сополимера и обеспечивают защиту от хлорированных растворителей, таких как трихлорэтилен и тетрахлорэтан. Они защищают при работе с маслами, смазками, кислотами и каустиками.

Отходы и утилизация

При работе с накопившимися отходами и их удалении следует применять стандартные практики MSDS (сертификат безопасности материала) и OSHA.

Генерирование и учет жидкостей QX100 droplet ридером капель основаны на химии фторированных углеводородов, которые следует удалять в соответствии с институциональными, государственными и местными нормами. Эти негорючие жидкости отличаются инертными свойствами, низким воздействием на экологию и невысокой токсичностью.

Отходы можно собирать в контейнеры ПЭНД, и в течение 1 месяца их следует утилизировать. Капли, созданные смесительным устройством, отличаются антимикробными свойствами, но со временем может наблюдаться рост микробов. Рекомендуемые параметры отходов включают следующее: фторированные углеводороды, воду, флюоресцентный краситель (из проб), белок и нуклеиновые кислоты. Генератор капель не предназначен для использования с биологически опасными материалами.

Опасные ситуации

Оставить свободное пространство 26 см сзади QX100 droplet генератора. В случае опасной ситуации отсоединить прибор на задней панели от источника питания.

Обозначения

	знак CSA	Знак CSA указывает на то, что изделие, процесс или услуга протестированы Канадской ассоциацией по стандартизации или Соединенных Штатов и отвечают требованиям действующего Канадского стандарта.
	знак FCC	Это оборудование протестировано и соответствует ограничениям Класса А цифровых устройств согласно Части 15 Правил Федеральной комиссии связи США (FCC). Эти ограничения разработаны для обеспечения разумной защиты от вредных помех при эксплуатации оборудования в коммерческой среде. Это оборудование генерирует, использует и может излучать радиочастотную энергию и, если оно установлено и используется в соответствии с инструкциями изготовителя, может вызывать вредные помехи для радиосвязи. Эксплуатация данного оборудования в жилой зоне может вызывать помехи, и в этом случае пользователь должен устранить их за свой счет.
	WEEE	Символ Предписания по Утилизации электрического и электронного оборудования указывает на то, что, когда конечный пользователь хочет выбросить данный продукт, его следует направить на отдельный объект сбора отходов для утилизации и переработки.
	ВАЖНО	Этот символ обозначает информацию, которая имеет решающее значение для успеха вашего эксперимента и требует особого уведомления или повторения.
	ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ	Этот символ используется для указания на то, что несоблюдение инструкций или процедур может привести к физическим травмам или повреждению оборудования.
	ПРИМЕЧАНИЕ	Этот символ обозначает, что доступны сторонние обстоятельства, которые могут способствовать успеху вашего эксперимента.

Авторское право © 2011 Bio-Rad Laboratories, Inc.
Воспроизведение настоящей документации в любом
виде, печатном или электронном, запрещено без
письменного разрешения компании Bio-Rad
Laboratories, Inc.

УВЕДОМЛЕНИЕ ПОКУПАТЕЛЯ О НАЛИЧИИ ЛИЦЕНЗИИ

Настоящий базовый блок, серийный номер _____,
предоставляет ограниченный иммунитет от привлечения к суду
без права передачи на всю деятельность заказчика, связанную с
внутренними исследованиями и разработками, а также с
применением в областях, защищенных патентом США № 5 475 610
(только патентные заявки 1, 44, 158, 160–163) или
соответствующими формулами изобретения в неамериканских
аналогах, принадлежащих компании Applera Corporation. Права не
подлежат передаче в прямой форме или подразумеваемым
образом любым другим патентным притязаниям на аппаратуру,
реагенты, экипировку или методы, например анализы с
использованием 5' нуклеазы. Для получения более подробной
информации о приобретении лицензионных прав свяжитесь с
директором по лицензированию компании Applied Biosystems по
адресу: 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

Настоящий продукт защищен одним или более следующими
патентами США, их иностранными аналогами или заявленными
патентами, принадлежащими компании Eppendorf AG: Патенты
США
№ 6 767 512 и 7 074 367.

Верно
Прошито, пронумеровано и скреплено печатью 75
пятидцать лист 06

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)

« 9 » 06 2021 г.



Е.А.Козлова



УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека

В.Г. Акимкин

« 18 » декабря 2020 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
стандартного образца предприятия № 211 «Положительный
контрольный образец, содержащий
ДНК вируса герпеса человека 7 (HHV7)»
(СОП № 211 ПКО ДНК HHV7)



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 211 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК вируса герпеса человека 7 (HHV7)» (СОП № 211 ПКО ДНК HHV7), далее по тексту СОП, предназначенного для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией набора реагентов АмплиСенс® HHV7-скрин/монитор-FL.

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП № 211 ПКО ДНК HHV7 проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП и при постановке ПЦР следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытываемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытываемого набора реагентов.

3.3 Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП и дать нагреться до комнатной температуры. СОП должен представлять собой прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений или примесей. Оценить визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП перемешать и осадить капли на вортексе. Открыть пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отобрать необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрыть.

5.2 Приготовить разведения, указанные в ТУ / методике испытаний набора реагентов, с использованием ТЕ-буфера, приложенного к СОП.

Разведения готовить по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, развести N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение провести согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N=A \quad (2)$$

$$C-A=B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП № 211 ПКО ДНК *HHV7*,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 копий/мл,

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления **C** мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ТЕ-буфера, который необходимо взять для приготовления **C** мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m копий/мл развести последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ / методике испытаний набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, приготовить последующие разведения, указанные в ТУ/методике испытаний, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, СОП № 211 ПКО ДНК *HHV7* имеет концентрацию $1,5 \times 10^8$ копий/мл. Необходимо приготовить разведения с концентрациями: $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^3$ и $5,0 \times 10^2$ копий/мл.

Маркируют пробирки «А», «В», «С» и «D».

В пробирку «А» последовательно вносят автоматической микропипеткой, используя наконечники с аэрозольным барьером, 933 мкл ТЕ-буфера и 67 мкл исходного СОП №211 ПКО ДНК *HHV7*. При внесении СОП в буфер пипетируют вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

В пробирку «В» последовательно вносят автоматической микропипеткой, используя наконечники с аэрозольным барьером, 990 мкл ТЕ-буфера и 10 мкл из пробирки «А». При внесении СОП в буфер пипетируют вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

В пробирку «С» последовательно вносят автоматической микропипеткой, используя наконечники с аэрозольным барьером, 990 мкл ТЕ-буфера и 10 мкл из пробирки «В». При внесении СОП в буфер пипетируют вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

В пробирку «D» последовательно вносят автоматической микропипеткой, используя наконечники с аэрозольным барьером, 500 мкл ТЕ-буфера и 500 мкл из пробирки «С». При внесении СОП в буфер пипетируют вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10^3 копий/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10^3 копий/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10^3 копий/мл.

5.3 Далее провести анализ разведений СОП в соответствии с ТУ / методикой испытаний набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 211 ПКО ДНК <i>HHV7</i>	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВОК И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
четыре лист 2

Руководитель подразделения развития и качества продукции
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 60/20 от 17.04.2020 г.)

Е.А. Козлова

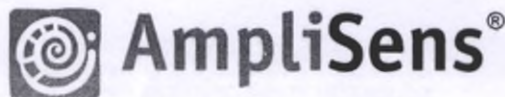


« 9 » 06 2021 г.

М.П.



Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов

АмплиСенс®
HHV7-скрин/монитор-FL

Форма 1: **REF** H-2431-1-1

Форма 2: **REF** H-2432-1-14



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123, город
Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

– «РИБО-преп», «МАГНО-сорб».

Контроли: Внутренний контрольный образец ВКО-FL – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ОКО + ПК HHV7	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:

ВКО	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	200 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	200 мкл	в пробирку для ОК
ОКО + ПК HHV7	180 мкл + 20 мкл	в пробирку для ПК

Элюция

все образцы	50 мкл	в каждую пробирку
-------------	--------	-------------------

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 FN

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов: 2 ДНК-калибратора (K1 и K2); 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.

- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL HNV7 и ПЦР-буфером-Н.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL HNV7	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-Н	5*(N+K+1)	

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

Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Внести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК, ПК <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
Пробы ДНК, экстрагированной из ПКО	
K1 HNV7	в пробирку для ДНК-калибратора K1
K2 HNV7	в пробирку для ДНК-калибратора K2

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K-.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов: 2 ДНК-калибратора (K1 и K2); 1 положительный (ПК) и 1 отрицательный (ОК) контроли экстракции.

- Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью HNV7-Луо для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК, ПК <i>При экстракции с помощью сорбционных методов избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
Пробы ДНК, экстрагированной из ПКО	
KL1 HNV7	в пробирку для ДНК-калибратора K1
KL2 HNV7	в пробирку для ДНК-калибратора K2

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

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Единая программа амплификации «АмплиСенс»

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортесе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трём каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX
Мишень для амплификации	ДНК ВКО Glob	ДНК ВГЧ-7	ДНК ВКО-FL

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, значения концентрации калибраторов, диапазон концентраций ПКО *HHV7* и граничные значения порогового цикла (*C_t*) необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Верно
Прошито, пронумеровано и скреплено печатью 3
три листа

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)

«9» 06 2021 г.

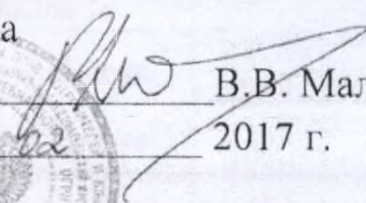
 Е.А.Козлова



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



 В.В. Малеев

2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов

для выделения РНК/ДНК из клинического материала

«РИБО-преп»

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50.

Форма 2 включает комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала включает:

Реактив	Описание	вариант 50		вариант 100	
		Объём (мл)	Кол-во	Объём (мл)	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ¹	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли.

ВНИМАНИЕ! В работе необходимо использовать контрольные образцы – ОКО, ВКО, ПКО – для тех инфекционных агентов, РНК/ДНК которых необходимо выявить.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов «РИБО-преп» предназначен для выделения тотальной РНК/ДНК из клинического материала (плазмы периферической крови, ликвора, амниотической жидкости, мазков из носа, зева, слюны) для последующего анализа методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК/РНК ИЗ ПРОБ.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Axygen», США).
8. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл (например, «Axygen», США).
10. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Axygen», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

¹ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
 2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции). Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.
 3. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО (если используется), внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции).
 4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.
 5. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.
 6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.
 7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.
 8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
 9. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
 10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.
 11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
 12. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
 13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.
 14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
 15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до 90 мкл.
 16. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.
- Очищенная РНК/ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 9 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

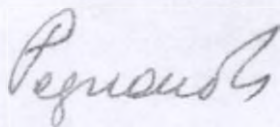
Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 25 °С не более 5 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Условия отпуска. Для — лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru².

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 5

к.л.76

лист 06

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 60/20 от 17.04.2020г.)

Е.А. Козлова



«9» 0 2021 г.

М.П.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 05.05.2012 № 2189-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека

В.И.Покровский
«15» апреля 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов

для выделения РНК/ДНК из клинического материала

«МАГНО-сорб»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов предназначен для выделения (экстракции) РНК/ДНК из плазмы крови человека для последующего исследования на наличие вирусов гепатитов В и С, вируса иммунодефицита человека и других инфекций методом ПЦР (полимеразной цепной реакции).

ПРИНЦИП МЕТОДА ЭКСТРАКЦИИ.

Клинический образец обрабатывается лизирующим раствором в присутствии частиц магнетизированной силики (магнитного сорбента). В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение нуклеиновых кислот (НК). Растворенная НК связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента на магнитном штативе и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции НК к магнитному сорбенту происходит переход НК с поверхности носителя в раствор, который затем отделяется от частиц сорбента магнитной силой. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат НК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200.

Форма 2 включает комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-1000.

Форма 3 включает комплекты реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по комплектам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 или вариант 100-1000 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Вариант 100-200		Вариант 100-1000	
		Объем (мл)	Кол-во	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ¹	25	4 флакона	70	4 флакона
Компонент А	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки	0,6	4 пробирки
Раствор для отмывки 5	Прозрачная бесцветная жидкость ¹	60	4 флакона	60	4 флакона
Раствор для отмывки 6	Прозрачная бесцветная жидкость	20	4 флакона	20	4 флакона
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	4 пробирки	0,9	4 пробирки
Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	12 пробирок	1,2	12 пробирок

Комплект реагентов вариант 100-200 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 200 мкл.

Комплект реагентов вариант 100-1000 рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Объем исследуемого материала 1000 мкл.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008г.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

¹ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 5 при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК ИЗ ПРОБ.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема с возможностью дозирования от 1 до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
4. Штативы для пробирок (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Ахуген, США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, США).
6. Термостат для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм, с температурой от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия)

7. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» с температурой от 25 до 100 °С (например, BioSan, Латвия).
8. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл (например, Promega, США).
9. Магнитный штатив для пробирок объемом 5 мл, диаметром 12 мм (например, Promega, США).
10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
11. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, США).
12. Одноразовые полипропиленовые или полистирольные пробирки объемом 5 мл диаметром 12 мм, круглодонные (например, Axugen, США).
13. Одноразовые полипропиленовые крышки для пробирок объемом 5 мл диаметром 12 мм (например, Axugen, США).
14. Электронный или механический дозатор переменного объема с возможностью дозирования от 1000 до 5000 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл, до 1000 мкл и до 5000 мкл (например, Axugen, США).
16. Холодильник от 2 до 8 °С.
17. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
18. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки проб).

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Экстракция из 1000 мкл образца плазмы.

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок объемом 5 мл и одноразовых крышек (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. При экстракции ДНК/РНК из 24 образцов:
 - а) во флакон с лизирующим раствором МАГНО-сорб (70 мл) внести необходимое количество содержимого из пробирки с ВКО (если он предусмотрен для анализа

данного возбудителя инфекции), все содержимое пробирки с компонентом А (0,6 мл) и все содержимое пробирки с магнетизированной силикой (0,9 мл).

- б) закрыть крышку флакона и **аккуратно** перемешать переворачиванием 5-7 раз, избегая образования пены.
- в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** подготовленной смеси **лизирующего раствора МАГНО-сорб, ВКО, компонента А и магнетизированной силики**.
4. При экстракции ДНК/РНК менее чем из 24 образцов:

- а) смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции), **компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО, 20 мкл Компонента А и 30 мкл Магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	140	210
12	130	260	390
18	190	380	570

- б) внести в пробирки на 5 мл по **60 мкл** подготовленной смеси ВКО, Компонента А и Магнетизированной силики.
- в) внести в пробирки на 5 мл по **2,6 мл** **лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
5. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **1 мл** исследуемого образца **плазмы**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
6. В случае если это предусмотрено для анализа данного возбудителя, необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **1 мл** соответствующего **ПКО**. Если предусмотренный объем ПКО менее 1 мл, необходимо довести объем, используя **ОКО**. Перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **1 мл ОКО**, перемешать пипетированием, закрыть крышкой.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**.
9. Перенести пробирки в магнитный штатив на **6 мин**.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надсадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 1000 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **700 мкл** раствора для отмывки **5**, пробирки закрыть крышкой.
12. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на **1,5 мл** (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.

13. Смыть магнетизированную силику со стенок осторожным вортексированием, а затем пипетированием, и перенести всю жидкость в приготовленные пробирки на 1,5 мл.
14. Переставить пробирки в магнитный штатив и инкубировать **2 мин.**
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Добавить **700 мкл раствора для отмывки 5**, ресуспендировать магнетизированную силику вортексированием, затем осадить капли кратким центрифугированием и повторить пп. 14-15.
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
18. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем коротко осадить капли на вортексе.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
21. Добавить **50 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив.
Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК/ДНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

После отбора надосадочной жидкости в пробирки ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C или в течение года при температуре не выше минус 16 °C; РНК-пробы можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 мес при температуре не выше минус 16 °C или в течение года при температуре не выше минус 68 °C.

Экстракция из 200 мкл образца плазмы.

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5 прогреть при температуре 60 °C до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции), **компонент А** и **магнетизированную силику** из расчета на одну точку 10 мкл ВКО, 10 мкл Компонента А и 20 мкл Магнетизированной силики. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше,

например:

Количество образцов для экстракции РНК	ВКО, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси ВКО, компонента А и магнетизированной силики.
5. Внести в пробирки **900 мкл** лизирующего раствора МАГНО-сорб.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **200 мкл** исследуемого образца плазмы и перемешать на вортексе.
7. В случае если это предусмотрено для анализа данного возбудителя, необходимо поставить **положительный контроль (ПК)**. Для этого пробирку с лизирующим раствором добавить **200 мкл** соответствующего ПКО. Если предусмотренный объем ПКО менее 200 мкл, необходимо довести объем, используя ОКО. Перемешать содержимое пробирки на вортексе.
8. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **200 мкл** ОКО, перемешать на вортексе.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °C** на **10 мин**.
10. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
11. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
12. Добавить в пробирки по **700 мкл** раствора для отмывки **5**.
13. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
14. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
15. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
16. Повторить отмывку раствором для отмывки **5** (пп. 12-15).
17. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл** раствора для отмывки **6**.
18. Добавить **200 мкл** раствора для отмывки **7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
19. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.

20. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
21. Добавить **50 мкл буфера** для элюции и перемешать на вортексе. Допускается увеличение объема элюции до 100 мкл.
22. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °С на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.
23. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных РНК/ДНК для внесения в ОТ-ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

РНК/ДНК-пробы не рекомендуется хранить дольше 30 мин при температуре от 2 до 8 °С.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 15 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. При температуре от 2 до 25 °С.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Рекламации на качество комплекта реагентов «МАГНО-сорб» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)².

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.А. Никонов

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное число
тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 10

реситб

лист 06

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

Роспотребнадзора (Доверенность № 60/20 от 17.04.2020г.)

Е.А. Козлова

[Подпись]

« 3 » 06 2021 г.

М.П.

