

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»



М. Е. Сенина

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК *HUMAN HERPESVIRUS* 6 ТИПОВ А И В (HHV6A / HHV6B)
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® HHV6A / HHV6B»
ПО ТУ 21.20.23-199-09286667-2023

Инструкция по применению версии 08.02.24-2

Лист утверждения

Набор реагентов для выявления и количественного определения
ДНК *Human Herpesvirus 6* типов А и В (HHV6A / HHV6B)
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме
«реального времени» «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B»
по ТУ 21.20.23-199-09286667-2023

АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 HHV6AB и K2 HHV6AB	6
2.4. Техническое обслуживание и ремонт	6
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	7
3.1. Внутренний контроль качества	7
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	8
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	8
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	11
6.1. Взятие исследуемого материала	11
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала	11
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	12
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	13
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	14
7.1. Цельная кровь	14
7.2. Слюна	15
7.3. Отделяемое слизистой оболочки влагалища	15
7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры	16
7.5. Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	16
7.6. Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	16
7.7. Моча	17
7.8. Ликвор	17
7.9. Эякулят	18
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	18
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	18
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	19
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	19
8.4. Анализ и вычисление результатов	20
8.5. Интерпретация результатов	21
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению	23
8.7. Диагностическое значение полученного результата	23
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	24
9.1. Предел обнаружения	24
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	24
9.3. Аналитическая специфичность	25
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения	25
9.5. Правильность измерения	25
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	26
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ	28
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	30
10.1. Срок годности	30
10.2. Транспортирование	30
10.3. Хранение	30
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	30
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	31
13. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
HHV6	– <i>Human Herpesvirus 6</i>
ВКО	– внутренний контрольный образец
ВОЗ	– всемирная организация здравоохранения
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
НК	– нуклеиновая кислота
К1	– калибровочный образец 1
К2	– калибровочный образец 2
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Human Herpesvirus 6* типов А и В (HHV6A / HHV6B) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» по ТУ 21.20.23-199-09286667-2023.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» предназначен для выявления и количественного определения ДНК *Human Herpesvirus 6* типов А и В (HHV6A / HHV6B) в биологическом материале (цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови, слюна, соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки, моча, ликвор, эякулят) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК вирусов герпеса 6 типа HHV6A и HHV6B методом ПЦР в биологическом материале человека).

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

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

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

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

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь HHV6AB	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
K1 HHV6AB	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 HHV6AB	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь HHV6AB	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) ¹	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Таq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
K1 HHV6AB	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
K2 HHV6AB	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

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

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным контролем (ВКО-FL³) и эндогенным контролем ДНК β-глобинового гена человека, а так же одновременной амплификации участков ДНК HHV6A, HHV6B, β-глобинового гена человека и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО-FL с гибридизационно-

¹ Пробирки с голубым парафином не используются.

² Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

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

флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Экзогенный и эндогенный контроли позволяют контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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

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

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 4 реакции – амплификация участков ДНК HHV6A, HHV6B, β-глобинового гена человека и последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁴	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)	ДНК HHV6A	ДНК HHV6B	ДНК Glob (эндогенный ВКО)
Область амплификации	Искусственно синтезированная последовательность	U67/68 gene	U67/68 gene	ДНК β-глобинового гена человека

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 HHV6AB и K2 HHV6AB

Измерение значений концентрации калибраторов K1 HHV6AB и K2 HHV6AB производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов K1 HHV6AB и K2 HHV6AB составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

2.4. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

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

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контроль (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (калибраторы K1 ННУ6АВ и K2 ННУ6АВ). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК ННУ6А, ННУ6В и β -глобинового гена человека. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ННУ6А, ННУ6В, и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должно детектироваться ДНК ВКО-FL, ННУ6А, ННУ6В, и β -глобинового гена человека. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля ПЦР используются реагенты K1 ННУ6АВ и K2 ННУ6АВ, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК ННУ6А, ННУ6В и β -глобинового гена человека в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов K1 ННУ6АВ и K2 ННУ6АВ. Исследование калибровочных образцов K1 ННУ6АВ и K2 ННУ6АВ проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов K1 ННУ6АВ и K2 ННУ6АВ и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов K1 ННУ6АВ и K2 ННУ6АВ и исследуемых образцов. Эффективность калибровки укладывается в заданный диапазон. Если эффективность калибровки не укладывается в граничные значения, требуется повторить исследование с этапа ПЦР.

3.1.3. Контроль ингибирования и качества забора материала

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

Если при проведении количественного анализа в исследуемых образцах цельной крови и лейкоцитов крови не обнаружена ДНК β -глобинового гена человека или обнаружена в концентрации менее 2000 копий/реакцию, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить анализ, начиная с этапа забора материала. Для образцов плазмы крови, слюны, соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки, мочи, ликвора, эякулята допустимое количество ДНК β -глобинового гена человека может быть менее 500 копий/реакцию

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

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

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК HHV6A и HHV6B.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

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

4.4. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

4.5. Не применять набор при нарушении целостности упаковки и с истекшим сроком годности.

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

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

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

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных 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».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

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

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал⁶, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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

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

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

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

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

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

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

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

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

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

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁶ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки), содержащая буферно-солевой раствор с муколитиком, консервантом и стабилизатором (например, «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм TCM», РУ № ФСР 2012/14205 или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд для взятия биологического материала с поверхности слизистых оболочек (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки), однократного применения, стерильный. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

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

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

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

6.1.6. Игла для забора ликвора, одноразовая, стерильная.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Предварительная обработка крови для получения лейкоцитарной массы или плазмы

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

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

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

6.2.1.4. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.2. Предварительная обработка мочи

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

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

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

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

6.2.2.5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

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

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

6.2.2.8. Вортекс.

6.2.2.9. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.3. Предварительная обработка эякулята

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

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

6.2.3.3. Физиологический раствор.

6.2.3.4. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.3.5. Вортекс.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови, слюна, соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки, моча, ликвор, эякулят) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 90 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли «МагноПрайм® ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043), МагноПрайм ЮНИ» (РУ № РЗН 2019/8955), «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017) (в соответствии с таблицей 4).

Таблица 4

Рекомендуемые наборы для экстракции ДНК

Биоматериал	Набор для экстракции
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки, моча	МагноПрайм® ФАСТ
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры) и ротоглотки, моча, слюна, цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови, ликвор	МагноПрайм ЮНИ
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки, плазма крови, ликвор, слюна, эякулят	АмплиПрайм РИБО-преп

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

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

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

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси.

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

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

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

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

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскладки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

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

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

Таблица 5

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

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

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4$ °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229).

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

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

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- слюна;
- соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры);
- соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки;
- соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки;
- моча;
- ликвор;
- эякулят;

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

7.1. Цельная кровь

7.1.1. Взятие материала

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

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

7.1.2.Предварительная обработка для получения плазмы

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

Допускается хранение образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

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

7.1.3.Предварительная обработка для получения лейкоцитарной массы

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

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

7.2. Слюна

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

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

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3. Отделяемое слизистой оболочки влагалища

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

ВНИМАНИЕ! Во избежание контаминации, нельзя обрезать зонд ножницами!

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

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

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

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

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

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

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.5. Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки

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

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

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

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

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.6. Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки

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

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

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

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7. Моча

7.7.1.Порядок сбора

Женщины для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15 – 25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с закручивающейся или плотно защелкивающейся крышкой. Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15 – 25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с закручивающейся или плотно защелкивающейся крышкой.

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

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

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7.2.Предварительная обработка

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

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

7.8. Ликвор

Ликвор собирают с помощью одноразовых игл в одноразовые стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл.

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

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

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.9. Эякулят

7.9.1. Взятие материала

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

Условия хранения и транспортирования материала:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.9.2. Предварительная обработка материала

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

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории⁷:

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

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

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

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

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

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

- объем реагента ВКО-FL – 10 мкл в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца – 100 мкл в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – 100 мкл в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – от 90 до 100 мкл⁸ (в зависимости от используемого набора реагентов для проведения экстракции).

⁷ Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

⁸ 90 мкл при использовании «АмплиПрайм РИБО-преп»; 100 мкл при использовании набора «МагноПрайм® ФАСТ» или «МагноПрайм ЮНИ».

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

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

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

8.1.1.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси ННУ6АВ** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 6). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 6

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ННУ6АВ	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	$5,0 \cdot (N+1)$	

8.1.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью ННУ6АВ** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вихрексе.

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

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.1.2. При использовании формы выпуска 2

8.1.2.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью ННУ6АВ** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

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

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

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

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

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

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

При проведении качественного анализа:

а) Положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **K2** внести 10 мкл **K2 HHV6AB**.

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

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

При проведении количественного анализа:

а) Образец **K1** – в одну пробирку внести 10 мкл **K1 HHV6AB**.

б) Образец **K2** – в одну пробирку внести 10 мкл **K2 HHV6AB**.

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

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

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

Таблица 7

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, ROX, Cy5	

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

8.3.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

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

8.3.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.7. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и вычисление результатов

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

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

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

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

Таблица 8

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5
Продукт амплификации	BKO-FL	ДНК HHV6A	ДНК HHV6B	ДНК Glob

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

При количественном анализе расчет концентрации выполняется в трех вариантах:

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

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

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

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

⁹ Если в исследуемых образцах плазмы крови, слюны, соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки, мочи, ликвора, эякулята обнаружена ДНК β-глобинового гена человека в количестве менее 500 копий/реакцию, то расчет концентрации выполняется только в копиях ДНК возбудителя на 1 мл образца.

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

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении качественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров R6G, ROX не определено и по каналу Cy5 ¹¹ и/или FAM не определено или определено выше граничного ¹²	Результат невалидный
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G и/или ROX определено выше граничного, а по каналу для флуорофора FAM не выше граничного	Результат недостоверный/сомнительный
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G и/или ROX определено не выше граничного. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции	ДНК <i>Human Herpesvirus 6A</i> и/или ДНК <i>Human Herpesvirus 6B</i> обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G и/или ROX не определено, а по каналам для флуорофоров Cy5 ¹¹ и FAM определено не выше граничного	ДНК <i>Human Herpesvirus 6A</i> и/или ДНК <i>Human Herpesvirus 6B</i> не обнаружена

Таблица 10

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного анализа**

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 не определено	Результат невалидный
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 ¹¹ определено выше граничного ¹²	Результат недостоверный (для образцов цельной крови и лейкоцитов крови)
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G и/или ROX определено выше граничного, а по каналу для флуорофора FAM не выше граничного	Результат недостоверный/сомнительный
Рассчитанное значение концентрации ДНК по каналу для флуорофора R6G и/или ROX находится в пределах линейного диапазона измерения набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 ¹¹ определено не выше граничного	ДНК <i>Human Herpesvirus 6A</i> и/или ДНК <i>Human Herpesvirus 6B</i> обнаружена в концентрации $X \times 10^Y$ копий/мл или $Ig X$ копий/ 10^5 клеток человека или X копий/ 10^5 клеток человека
По каналу для флуорофора R6G и/или ROX выявлена ДНК в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 ¹¹ определено не выше граничного	ДНК <i>Human Herpesvirus 6A</i> и/или ДНК <i>Human Herpesvirus 6B</i> обнаружена в концентрации менее 8×10^2 копий/мл
По каналу для флуорофора R6G и/или ROX выявлена ДНК в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 ¹¹ определено не выше граничного	ДНК <i>Human Herpesvirus 6A</i> и/или ДНК <i>Human Herpesvirus 6B</i> обнаружена в концентрации более 1×10^7 копий/мл
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G и/или ROX не определено, а по каналам для флуорофоров Cy5 ¹¹ и FAM определено не выше граничного	ДНК <i>Human Herpesvirus 6A</i> и/или ДНК <i>Human Herpesvirus 6B</i> не обнаружена

¹¹ Для образцов плазмы крови, слюны, соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки и ротоглотки, мочи, ликвора, эякулята допускается превышение граничного значения Ct по каналу для флуорофора Cy5.

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

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного ¹³	Значение Ct отсутствует		
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует			
K1 HHV6AB (K1)	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct		
K2 HHV6AB (K2)	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного		
K1 HHV6AB (K1) K2 HHV6AB (K2)	—	Показатель эффективности (E) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2		

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналу для флуорофора R6G, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК HHV6A, и/или HHV6B, и/или β-глобинового гена человека, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM, и/или R6G/HEX/JOE/VIC, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех исследуемых образцов.

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

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

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

8.7. Диагностическое значение полученного результата

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

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

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения¹⁴

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ННУ6А / ННУ6В» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 12).

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

Таблица 12

Предел обнаружения набора

Биоматериал	Набор для экстракции	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл		95%-ый доверительный интервал, копий/мл	
		ДНК ННУ6А	ДНК ННУ6В	ДНК ННУ6А	ДНК ННУ6В
Цельная кровь	МагноПрайм ЮНИ	4×10^2	4×10^2	$3,36 \times 10^2 - 4,89 \times 10^2$	$3,35 \times 10^2 - 4,92 \times 10^2$
Плазма крови	АмплиПрайм РИБО-преп	4×10^2	4×10^2	$3,50 \times 10^2 - 5,28 \times 10^2$	$3,41 \times 10^2 - 5,04 \times 10^2$
	МагноПрайм ЮНИ			$3,14 \times 10^2 - 4,58 \times 10^2$	$3,16 \times 10^2 - 4,57 \times 10^2$
Лейкоциты крови	МагноПрайм ЮНИ	4×10^2	4×10^2	$3,22 \times 10^2 - 4,64 \times 10^2$	$3,19 \times 10^2 - 4,53 \times 10^2$
Слюна	АмплиПрайм РИБО-преп	4×10^2	4×10^2	$3,27 \times 10^2 - 4,90 \times 10^2$	$3,13 \times 10^2 - 4,69 \times 10^2$
	МагноПрайм ЮНИ			$3,14 \times 10^2 - 4,58 \times 10^2$	$3,16 \times 10^2 - 4,57 \times 10^2$
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	МагноПрайм® ФАСТ	4×10^2	4×10^2	$3,48 \times 10^2 - 5,45 \times 10^2$	$2,99 \times 10^2 - 4,31 \times 10^2$
	МагноПрайм ЮНИ			$3,77 \times 10^2 - 5,87 \times 10^2$	$3,57 \times 10^2 - 5,41 \times 10^2$
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	МагноПрайм® ФАСТ	4×10^2	4×10^2	$3,35 \times 10^2 - 5,02 \times 10^2$	$3,35 \times 10^2 - 4,92 \times 10^2$
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	АмплиПрайм РИБО-преп	4×10^2	4×10^2	$3,05 \times 10^2 - 4,33 \times 10^2$	$3,16 \times 10^2 - 4,57 \times 10^2$
	МагноПрайм ЮНИ	4×10^2	4×10^2	$3,50 \times 10^2 - 5,28 \times 10^2$	$3,35 \times 10^2 - 5,02 \times 10^2$
	МагноПрайм® ФАСТ	4×10^2	4×10^2	$3,64 \times 10^2 - 5,54 \times 10^2$	$3,19 \times 10^2 - 4,53 \times 10^2$
Моча	МагноПрайм® ФАСТ	4×10^2	4×10^2	$3,16 \times 10^2 - 4,57 \times 10^2$	$3,35 \times 10^2 - 4,92 \times 10^2$
	МагноПрайм ЮНИ			$3,36 \times 10^2 - 4,89 \times 10^2$	$3,22 \times 10^2 - 4,64 \times 10^2$
Ликвор	АмплиПрайм РИБО-преп	4×10^2	4×10^2	$3,35 \times 10^2 - 4,92 \times 10^2$	$3,41 \times 10^2 - 5,04 \times 10^2$
	МагноПрайм ЮНИ			$3,27 \times 10^2 - 4,90 \times 10^2$	$3,14 \times 10^2 - 4,58 \times 10^2$
Эякулят	АмплиПрайм РИБО-преп	4×10^2	4×10^2	$2,99 \times 10^2 - 4,31 \times 10^2$	$3,24 \times 10^2 - 4,94 \times 10^2$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от 8×10^2 до 1×10^7 копий/мл для ДНК ННУ6А и ДНК ННУ6В. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

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

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК вирусов герпеса 6 типа HHV6A и HHV6B.

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК HHV6A и ДНК HHV6B. Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми вирусами при тестировании ДНК данных вирусов в концентрации не менее 1×10^7 копий/мл.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Epstein-Barr virus (EBV)	Herpes simplex virus I (HSV I)
Cytomegalovirus (CMV)	Herpes simplex virus II (HSV II)
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Neisseria sicca</i>	—

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

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора, стандартными образцами предприятия, содержащими искусственно-синтезированные ДНК HHV6A и ДНК HHV6B. Были протестированы образцы в четырех концентрациях ДНК выявляемых вирусов, одна из которых соответствовала пределу обнаружения набора (4×10^2 копий/мл), а другие три – укладывались в линейный диапазон измерения набора (8×10^2 копий/мл, 1×10^5 копий/мл и 1×10^7 копий/мл). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации и пороговых циклов (Ct), не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения концентрации и пороговых циклов (Ct), не превышал 10 %.

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с использованием набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» была определена путем тестирования модельных образцов в 40 повторах. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора, стандартными образцами предприятия, содержащими искусственно-синтезированные ДНК HHV6A и ДНК HHV6B в концентрации. Были протестированы образцы, содержащие ДНК выявляемых вирусов в концентрации 5×10^5 копий/мл.

При оценке правильности величина систематической погрешности, рассчитанная по результатам определения концентрации, не превышала 15 %.

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 14.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие/отсутствие ДНК HHV6A и ДНК HHV6B, использовались наборы реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»¹⁵ (РУ № РЗН 2021/15314) и «Интифика HHV6A/HHV6B» (РУ № РЗН 2023/20469).

Таблица 14

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B»

Исследуемые образцы			Результаты тестирования			
Тип	Возбудитель	Количество	Образцы	Набор сравнения «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»	Набор сравнения «Интифика HHV6A/HHV6B»	Тестируемый набор «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B»
Цельная кровь	HHV6A	87	Положительных	27	Тестирование не проводилось	27
			Отрицательных	60	Тестирование не проводилось	60
	HHV6B (модельные образцы)		Положительных	30	Тестирование не проводилось	30
			Отрицательных	57	Тестирование не проводилось	57
Плазма крови	HHV6A	130	Положительных	25	25	25
			Отрицательных	105	Тестирование не проводилось	105
	HHV6B		Положительных	38	38	38
			Отрицательных	92	Тестирование не проводилось	92
Лейкоциты крови	HHV6A	130	Положительных	26	26	26
			Отрицательных	104	Тестирование не проводилось	104
	HHV6B		Положительных	39	39	39
			Отрицательных	91	Тестирование не проводилось	91
Слюна	HHV6A	312	Положительных	28	28	28
			Отрицательных	284	Тестирование не проводилось	284
	HHV6B		Положительных	132	132	132
			Отрицательных	180	Тестирование не проводилось	180
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитально го тракта	HHV6A	312	Положительных	26	26	26
			Отрицательных	286	Тестирование не проводилось	286
	HHV6B		Положительных	127	127	127
			Отрицательных	185	Тестирование не проводилось	185
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	HHV6A	85	Положительных	25	Тестирование не проводилось	25
			Отрицательных	60	Тестирование не проводилось	60
	HHV6B (модельные образцы)		Положительных	30	Тестирование не проводилось	30
			Отрицательных	55	Тестирование не проводилось	55
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	HHV6A	125	Положительных	25	25	25
			Отрицательных	100	Тестирование не проводилось	100
	HHV6B		Положительных	40	40	40
			Отрицательных	85	Тестирование не проводилось	85

¹⁵ Набор реагентов «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6» выявляет и количественно определяет ДНК HHV6, но не позволяет определять тип HHV6A или HHV6B.

Исследуемые образцы			Результаты тестирования			
Тип	Возбудитель	Количество	Образцы	Набор сравнения «АмплиПрайм® EBV / CMV / HHV6»	Набор сравнения «Интифика HHV6A/HHV6B»	Тестируемый набор «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B»
Моча	HHV6A	86	Положительных	26	Тестирование не проводилось	26
			Отрицательных	60	Тестирование не проводилось	60
	HHV6B (модельные образцы)		Положительных	30	Тестирование не проводилось	30
			Отрицательных	56	Тестирование не проводилось	56
Ликвор	HHV6A	150	Положительных	50	50	50
			Отрицательных	100	Тестирование не проводилось	100
	HHV6B		Положительных	50	50	50
			Отрицательных	100	Тестирование не проводилось	100
Эякулят	HHV6A	85	Положительных	25	Тестирование не проводилось	25
			Отрицательных	60	Тестирование не проводилось	60
	HHV6B (модельные образцы)		Положительных	30	Тестирование не проводилось	30
			Отрицательных	55	Тестирование не проводилось	55

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 15.

Таблица 15

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B»

Тип образцов	Возбудитель	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Цельная кровь	HHV6A	100 % (94,04 % – 100 %)	100 % (87,23 % – 100 %)
	HHV6B (модельные образцы)	100 % (93,73 % – 100 %)	100 % (88,43 % – 100 %)
Плазма крови	HHV6A	100 % (96,55 % – 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
	HHV6B	100 % (96,07 % – 100 %)	100 % (90,75 % – 100 %)
Лейкоциты крови	HHV6A	100 % (96,52 % – 100 %)	100 % (86,77 % – 100 %)
	HHV6B	100 % (96,03 % – 100 %)	100 % (90,97 % – 100 %)
Слюна	HHV6A	100 % (98,71 % – 100 %)	100 % (87,66 % – 100 %)
	HHV6B	100 % (97,97 % – 100 %)	100 % (97,24 % – 100 %)
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	HHV6A	100 % (98,72 % – 100 %)	100 % (86,77 % – 100 %)
	HHV6B	100 % (98,03 % – 100 %)	100 % (97,14 % – 100 %)
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	HHV6A	100 % (94,04 % – 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
	HHV6B (модельные образцы)	100 % (93,51 % – 100 %)	100 % (88,43 % – 100 %)
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	HHV6A	100 % (96,38 % – 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
	HHV6B	100 % (95,75 % – 100 %)	100 % (91,19 % – 100 %)
Моча	HHV6A	100 % (94,04 % – 100 %)	100 % (86,77 % – 100 %)
	HHV6B (модельные образцы)	100 % (93,62 % – 100 %)	100 % (88,43 % – 100 %)

Тип образцов	Возбудитель	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Ликвор	HHV6A	100 % (96,38% – 100 %)	100 % (92,89 % – 100 %)
	HHV6B	100 % (96,38% – 100 %)	100 % (92,89 % – 100 %)
Эякулят	HHV6A	100 % (94,04 % – 100 %)	100 % (86,28 % – 100 %)
	HHV6B (модельные образцы)	100 % (93,51 % – 100 %)	100 % (88,43 % – 100 %)

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 16, в максимально возможной концентрации.

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (лубриканты (интимный гель-смазка Contex Silk на силиконовой основе, интимный гель-смазка Durex), семенная жидкость, антисептик «Мирамистин», итраконазол, метронидазол, гормоны дидрогестерон и прогестерон, мочевины, муцин, гемоглобин) и прямой кишки (хлорофилл, гликохолат натрия, натрий таурохолат гидрат) было показано в испытаниях с использованием набора для экстракции «МагноПрайм® ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043).

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов соскобного материала или отделяемого слизистой оболочки ротоглотки (муцин, гемоглобин, антисептик «Мирамистин», хлоргексидин) было показано в испытаниях с использованием комплекта для экстракции «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017) и набора для экстракции «МагноПрайм® ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043).

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов мочи (муцин, гемоглобин, мочевины) было показано в испытаниях с использованием набора для экстракции «МагноПрайм® ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043).

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов слюны (муцин, гемоглобин) и ликвора (гемоглобин) было показано в испытаниях с использованием комплекта для экстракции «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017).

Таблица 16

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Цельная кровь	гемоглобин	200 мг/мл
	билирубин	0,2 мг/мл
	ацикловир	0,3 мг/мл
	преднизолон	0,003 мг/мл
	дексаметазон	0,0006 мг/мл
	холестерин	2,5 мг/мл
	триглицериды	5 мг/мл
	альбумин	50 мг/мл

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Плазма крови	гемоглобин	200 мг/мл
	билирубин	0,2 мг/мл
	ацикловир	0,3 мг/мл
	преднизолон	0,003 мг/мл
	дексаметазон	0,0006 мг/мл
	холестерин	2,5 мг/мл
	триглицериды	5 мг/мл
	альбумин	50 мг/мл
Лейкоциты крови	гемоглобин	200 мг/мл
Слюна	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	хлоргексидин	0,1 %
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	хлоргексидин	0,1 %
Моча	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	мочевина	3,3 мг/мл
Ликвор	гемоглобин	200 мг/мл
Эякулят	муцин	2,3 мг/мл

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации $1,0 \times 10^8$ копий/мл.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

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

10.2. Транспортирование

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

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

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

10.3. Хранение

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

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси HHV6AB и ПЦР-буфера-Н, хранению не подлежит.

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

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® HHV6A / HHV6B» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

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

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

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Номер серии



Дата изготовления



Медицинское изделие для
диагностики *in vitro*



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения <n> тестов



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению или к
инструкции по применению в
электронном виде



Не допускать
воздействия
солнечного света



Осторожно

13. ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

- ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны»;
- ГОСТ 14261-77 «Кислота соляная особой чистоты. Технические условия»;
- ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации»;
- ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»;
- ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения»;
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 «Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования»;
- ГОСТ 14192-96 «Маркировка грузов»;
- ГОСТ Р 15.301-2016 «Система разработки и постановки продукции на производство. Продукция производственно-технического назначения. Порядок разработки и постановки продукции на производство»;
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*»;
- ГОСТ 15.309-98 «Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения»;
- ГОСТ Р ЕН 13612-2010 «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*»;
- ГОСТ ISO 14971-2021 «Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям»;
- ГОСТ ISO 13485-2017 «Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования»;
- ГОСТ Р 56430-2015/GHTF/SG3/N18:2010 «Система менеджмента качества. Изделия медицинские. Руководство по корректирующим и предупреждающим действиям и связанным процессам системы менеджмента качества»;
- ГОСТ Р 56431-2015/GHTF/SG3/N99-10:2004 «Система менеджмента качества. Изделия медицинские. Руководство по валидации процессов»;
- ГОСТ Р ИСО 17511-2022 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, приписанных калибраторам, контрольным материалам правильности и образцам биологического материала человека».

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменен или изменен, то при применении настоящего документа следует пользоваться замененным (измененным) документом.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито
34 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио»

М.Е. Сенина

