

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК EBV, CMV, HHV6 В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH EBV/CMV/HHV6 (R))
ПО ТУ 21.20.23-043-19926214-2024

Инструкция по применению версии 28.10.24

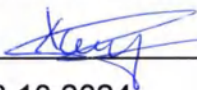
Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

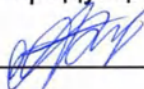
Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

 А.С. Коновалов
28.10.2024

Руководитель научной группы
ООО «Амплитек»

 Г.А. Хайруллина
28.10.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

 А.А. Филичева
28.10.2024

Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК EBV, CMV, HHV6 в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R))
по ТУ 21.20.23-043-19926214-2024

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

Форма 1 **REF** P033-1

Σ 96

Форма 2 **REF** P033-2

Σ 96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	4
4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ	4
5 ФОРМЫ ВЫПУСКА	4
6 СОСТАВ.....	5
7 ПРИНЦИП МЕТОДА.....	6
7.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК Н.....	6
8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	8
11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
11.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1».	
Проведение ПЦР и детекции	10
11.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ПЦР и детекции.....	11
12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	13
13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ.....	16
14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	17
14.1 Контроли, используемые в процессе исследования	17
14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации.....	18
14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований.....	18
15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	18
15.1 Предел обнаружения.....	18
15.2 Диапазон измерения и предел измерения.....	19
15.3 Аналитическая специфичность.....	19
15.4 Прецизионность измерения	20
15.5 Правильность измерения	20
15.6 Диагностические характеристики	20
15.7 Корреляция.....	21
16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА..	22
16.1 Срок годности.....	22
16.2 Хранение	22
16.3 Транспортирование	22
16.4 Эксплуатация	22
17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	22
18 БИБЛИОГРАФИЯ	23
19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	23
20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	24
21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	24
22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	24

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 28.10.24 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК EBV, CMV, HHV6 в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)) по ТУ 21.20.23-043-19926214-2024» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R).

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

2. Большая часть человеческой популяции инфицирована одним из видов герпесвирусов. Герпесвирусная инфекция может протекать в латентной, острой и хронической форме, не редки случаи реактивации вируса в условиях подавления иммунной системы организма человека. Данные вирусы могут вызывать острый, хронический мононуклеоз, опухоли лимфоидной и эпителиальной тканей, ретинопатии, пневмониты и другие заболевания. Заражение герпесвирусными инфекциями беременных может приводить к инфицированию и серьезным проблемам со здоровьем у новорожденных.

Для корректной постановки и подтверждения диагноза необходима дифференциальная диагностика герпесвирусных инфекций, особенно у беременных. Наиболее точный метод дифференциации вирусных инфекций - ПЦР в реальном времени, которая обладает высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов. Набор реагентов «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)» позволяет выявлять, дифференцировать ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6 типа (HHV6) в рамках одной реакции.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6 типа (HHV6) в биологическом материале человека методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из следующих видов биологического материала:

- цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки;
- спинномозговая жидкость (ликвор);
- моча (осадок первой порции утренней мочи).

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение EBV, CMV, HHV6). Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие герпесвирусных инфекций. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования EBV, CMV, HHV6 и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

При применении набора по назначению, в соответствии с данной инструкцией риски и побочные эффекты отсутствуют.

5 ФОРМЫ ВЫПУСКА

Набор выпускается в двух формах¹ (см. таблицу 1).

Таблица 1

Описание форм выпуска набора

Форма	Описание	Количество исследований, в том числе для контролей
1	Готовая к применению реакционная ПЦР-смесь в виде геля, распапанная в 96-луночный планшет	96
2	Готовая к применению реакционная ПЦР-смесь для разнесения по пробиркам	96

¹ Набор в форме выпуска 1 упакован в коробку из картона, в форме выпуска 2 - в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

6 СОСТАВ

Состав набора указан в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Состав формы 1

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Планшет со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	–	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентом в виде геля (от светло-розового до красного цвета) на дне пробирок
Плёнки для планшета	–	2 шт.	Клейкие плёнки
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК Н (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Таблица 3

Состав формы 2

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь EBV/CMV/HHV6 (RW) (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло- серого до фиолетового цвета
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК Н (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

² В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

7 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов ПЦР и раздельное выявление мишеней обеспечивается применением в реакционной смеси для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 4).

Таблица 4

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
FAM	ДНК HHV6	Ген ДНК-полимеразы
R6G ³	ДНК EBV	Ген латентного мембранного белка LMP
ROX	ДНК CMV	Ген ДНК-полимеразы
Cy5	ДНК экзогенного ВК	Искусственно синтезированная последовательность
Cy5.5	ДНК эндогенного ВК	Ген β-глобина человека

Линейная зависимость между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (порогового цикла, Ct) позволяет определять концентрацию ДНК выявляемых мишеней в образце относительно положительного контроля ПК Н (образца с известной концентрацией ДНК-мишеней), который проходит этап экстракции ДНК и ПЦР одновременно с исследуемыми образцами. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций ПК Н и полученными значениями Ct для ПК Н и исследуемых образцов.

7.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК Н

Концентрация клонированных фрагментов ДНК всех выявляемых микроорганизмов в ПК Н составляет $5 \lg \pm 0,5 \lg$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [1, 2].

8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 5.

³ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Необходимое оборудование и материалы в случае	
автоматизированной подготовки к проведению ПЦР для формы выпуска 1	ручной подготовки к проведению ПЦР для форм выпуска 1 и 2
• автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.	• ПЦР-бокс; • центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518); • дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 20 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); • штатив для ПЦР-планшетов (при использовании формы 1); • штатив для пробирок объёмом 0,2 мл (при использовании формы 2); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз (при использовании формы 2); • наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ № 4н от 06.06.2012) – 2б.

Работа должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 15190 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

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

- Утилизировать реагенты и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию 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» к утилизации медицинских отходов класса Г.

- Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.

- Утилизировать биологический материал, а также расходные материалы и инструменты, загрязнённые биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса Б.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 2 и 3 для соответствующей формы выпуска набора.

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

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.

- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных 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.

Реагенты, входящие в состав набора, содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое 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.

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только биологического материала, указанного в разделе 1. Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;

- требованиями, перечисленными в таблицах 6 и 7.

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала**Взятие и предобработка цельной крови**

Взятие цельной крови провести натошак или через 3 ч после приёма пищи в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА).

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

Тщательно перемешать кровь с антикоагулянтом, несколько раз перевернув пробирку.

Предобработка для получения плазмы:

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 мин при 800–1600 $\times g$ при комнатной температуре. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные одноразовые пробирки.

Предобработка для получения лейкоцитарной массы:

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 мин при 800–1600 $\times g$ при комнатной температуре. После удаления плазмы, используя наконечник с фильтром, аккуратно собрать клетки крови (лейкоцитарную массу) с поверхности осадка в объёме 200 мкл и перенести в стерильную одноразовую пробирку.

Взятие слюны

Отобрать не менее 1 мл слюны в стерильную одноразовую ёмкость.

Взятие мазков со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового зонда-тампона (например, «Зонд тип А5 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).

Взятие спинномозговой жидкости (ликвора)

Отобрать спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл с помощью стерильной одноразовой иглы в стерильную одноразовую пробирку.

Взятие и предобработка мочи

Отобрать первую порцию утренней мочи в количестве от 15 до 25 мл в специальную одноразовую ёмкость.

Предобработка:

Взболтать ёмкость с мочой. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку. Центрифугировать 5 мин при 10000 $\times g$. Не захватывая осадок, полностью удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в 1 мл физиологического раствора стерильного, затем снова концентрировать центрифугированием и удалить супернатант, не захватывая осадок.

К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала**Условия транспортирования и хранения****Цельная кровь**

При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание цельной крови.

Плазма крови

- При температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток;
- При температуре минус 20 °С не более года;
- Допускается однократное замораживание материала.

Лейкоциты крови

- При температуре минус 20 °С не более года;

Условия транспортирования и хранения

- Допускается однократное замораживание материала.

Слюна

- При комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение 6 ч;
- При температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 суток;
- При температуре минус 20 °С в течение недели;
- Допускается однократное замораживание материала.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Спинномозговая жидкость (ликвор)

- При температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 суток;
- При температуре минус 20 °С в течение 1 недели;
- Допускается однократное замораживание материала.

Моча

- При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток;
- При температуре минус 20 °С не более недели;
- Допускается однократное замораживание материала.

11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

Экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей, а также внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки планшета с реакционной Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

11.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Н и осадить капли на вортексе.

11.1.2 Подготовить картридж с реагентами из набора «НК-100 (R)» и внести в него исследуемые образцы и контроли согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Н не менее чем в одном повторе.

11.1.3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «НК-100 (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.

11.1.4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) и снять с них защитную плёнку.

11.1.5 Установить отрезанные пробирки со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

11.1.6 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по

эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-100 (R)»;

Примечание – В протоколе указать объем элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объем элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)».

ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

11.1.7 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесённым элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

11.1.8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 8.

Таблица 8

Программа ПЦР и детекции при подготовке к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1»

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁴ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объем реакции: 25 мкл.
- 2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °C – 15 мин» для экономии времени.

11.1.9 Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

11.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ПЦР и детекции

11.2.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Н и осадить капли на вортексе

⁴ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

11.2.2 Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Ампитек») формы 1 или формы 2 (с применением автоматической или ручной методики) согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объёме 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Н не менее чем в одном повторе.

11.2.3 В зависимости от используемой формы выпуска набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)» провести подготовку к проведению ПЦР в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9

Подготовка к проведению ПЦР в зависимости от формы выпуска набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)»

Подготовка к проведению ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
- Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R). - Снять защитную плёнку с отрезанных пробирок. - Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов. - Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Н). ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)».	- Перемешать содержимое пробирки со Смесью EBV/CMV/HHV6 (RW) и осадить капли на вортексе. - Внести в ПЦР-пробирки по 10 мкл Смеси EBV/CMV/HHV6 (RW). - Внести в подготовленные пробирки с реакционной Смесью по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Н). ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов ДНК закрыть пробирки крышкой.

ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения ДНК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

11.2.4 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 10.

Программа ПЦР и детекции при ручной подготовке к проведению ПЦР

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	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁵ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объем реакции: 25 мкл.
- 2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °C – 15 мин» для экономии времени.

11.2.5 Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуется выставлять пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.

12.2 Проверить валидность исследуемых образцов:

а) Если по каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значение Ct отсутствует, а по каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного⁶, образцу присваивается результат «Невалидный».

б) Для образцов цельной крови и лейкоцитов крови рассчитать концентрацию ДНК человека согласно формуле (1).

$$C_{\text{ч}} = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (1)$$

где $C_{\text{ч}}$ – концентрация ДНК человека, копий/мл;

ΔCt – разность между значением порогового цикла (Ct) для исследуемого образца и значением Ct для ПК Н по каналу Cy5.5.

12.3 В случае, если рассчитанная концентрация ДНК человека для исследуемого образца (цельной крови и лейкоцитов крови) менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует, образцу присваивается результат «Невалидный».

12.4 При получении валидного результата для исследуемого образца проверить наличие значений Ct по каналам FAM, R6G, ROX (соответствие мишеней и каналов детекции см. в таблице 4).

⁵ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

⁶ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

- 12.5 В случае, если значения Ct по всем каналам FAM, R6G, ROX отсутствуют, образцу присваивается результат «ДНК EBV, CMV, HHV6 не выявлена».
- 12.6 При наличии значений Ct по каналам FAM/R6G/ROX рассчитать концентрацию ДНК выявленного вируса в геномных эквивалентах в одном миллилитре (ГЭ/мл) согласно формуле (2).

$$C_v = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (2)$$

где C_v – концентрация ДНК выявленного вируса, ГЭ/мл;

ΔCt – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК Н по каналу FAM/R6G/ROX.

Примечание – Коэффициент пересчёта концентрации ДНК EBV/CMV/HHV6 из копий/мл в ГЭ/мл равен 1.

- 12.7 Для образцов плазмы крови, слюны, ликвора рассчитать при необходимости концентрацию выявленного вируса в lg геномных эквивалентов в одном миллилитре (lg (ГЭ/мл)) согласно формуле (3).

$$C_{vlg} = \lg C_v \quad (3)$$

где C_{vlg} – концентрация ДНК выявленного вируса, lg (ГЭ/мл);

C_v – концентрация ДНК выявленного вируса, ГЭ/мл.

- 12.8 Для образцов лейкоцитов крови и цельной крови рассчитать вирусную нагрузку в ГЭ вируса на 10^5 клеток человека согласно формуле (4) и, при необходимости, в lg ГЭ вируса на 10^5 клеток человека согласно формуле (5).

$$VL = \frac{C_v}{C_{ch}} \cdot 200000 \quad (4)$$

где VL – вирусная нагрузка выявленного вируса, ГЭ/ 10^5 клеток;

C_v – концентрация ДНК выявленного вируса, копий/мл;

C_{ch} – концентрация ДНК человека, копий/мл.

$$VL_{lg} = \lg VL \quad (5)$$

где VL_{lg} – вирусная нагрузка выявленного вируса, lg (ГЭ/ 10^5 клеток);

VL – вирусная нагрузка выявленного вируса, ГЭ/ 10^5 клеток.

- 12.9 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 11.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат для образцов		Интерпретация
плазмы крови, слюны, ликвора, мочи, мазков со слизистой оболочки ротоглотки	цельной крови, лейкоцитов крови	
Качественное определение ДНК выявляемых возбудителей		
1 По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. ⁷ По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. Концентрация ДНК человека определена не менее 50000 копий/мл. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	ДНК EBV, CMV, HHV6 в образце <i>не выявлены</i> .
2 По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM определено значение Ct.	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. Концентрация ДНК человека определена не менее 50000 копий/мл. По каналу FAM определено значение Ct.	В образце <i>выявлена</i> ДНК HHV6.
3 По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G определено значение Ct.	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. Концентрация ДНК человека определена не менее 50000 копий/мл. По каналу R6G определено значение Ct.	В образце <i>выявлена</i> ДНК EBV.
4 По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу ROX определено значение Ct.	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. Концентрация ДНК человека определена не менее 50000 копий/мл. По каналу ROX определено значение Ct.	В образце <i>выявлена</i> ДНК CMV.
5 По двум и более каналам для специфических мишеней (FAM, R6G, ROX) определено значение Ct.	По двум и более каналам для специфических мишеней (FAM, R6G, ROX) определено значение Ct.	Интерпретация проводится в соответствии с пп. 2–4. Например: В образце <i>выявлены</i> ДНК HHV6, ДНК EBV.
6 По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют. Концентрация ДНК человека определена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует.	Невалидный результат
Количественное определение ДНК выявляемых возбудителей		
1 По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. Концентрация ДНК человека определена не менее 50000 копий/мл. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	ДНК EBV, CMV, HHV6 в образце <i>не выявлены</i> .
2 Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, укладываемое в диапазон измерения набора.	Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, укладываемое в диапазон измерения набора.	ДНК возбудителя в образце <i>выявлена</i> в концентрации в пределах диапазона измерения набора.

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

Результат для образцов			Интерпретация
плазмы крови, слюны, ликвора, мочи, мазков со слизистой оболочки ротоглотки		цельной крови, лейкоцитов крови	
3	Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, не укладывающееся в диапазон измерения набора.	Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК возбудителя в образце выявлена в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
4	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют. Концентрация ДНК человека определена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 12.

Таблица 12

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналам FAM, R6G, ROX значение Ct отсутствует. По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁸ . По каналу Cy5.5 значение Ct отсутствует или определено, но рассчитанная концентрация ⁹ ДНК человека не больше 1000 копий/мл.
ПК Н	По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct определено не больше граничного.

13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 13.

Таблица 13

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного ⁸ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу FAM и/или R6G и/или ROX определено значение Ct,	Контаминация реагентов или исследуемых	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить

⁸ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

⁹ В случае наличия значения Ct по каналу Cy5.5 произвести расчёт концентрации ДНК человека по формуле (1).

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
или по каналу Cy5.5 рассчитанная концентрация ⁹ ДНК человека больше 1000 копий/мл.	образцов продуктами амплификации.	исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Невалидный результат для исследуемого образца (значение Ct по каналу Cy5 отсутствует или определено больше граничного, по каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции ДНК. Наличие в образце ингибиторов ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.
Невалидный результат для исследуемого образца цельной крови и лейкоцитов крови (ДНК человека получена менее 50000 копий/мл, либо значение Ct по каналу Cy5.5 отсутствует).	Нарушения при взятии и/или хранении биоматериала. Некорректное проведение экстракции ДНК. Наличие в образце ингибиторов ПЦР.	
Для исследуемого образца/контролей определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей.

14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

14.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 12.

14.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК Н для контроля корректного прохождения исследования, а также для количественного определения ДНК выявляемых с помощью набора микроорганизмов в биологическом материале человека.

14.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации используется:

- экзогенный ВК, который добавляется на этапе экстракции ДНК в каждый

исследуемый образец и контроли;

- эндогенный ВК (участок ДНК β -глобинового гена человека), который присутствует в каждом исследуемом образце цельной крови, лейкоцитов крови и ПКН.

Невалидный результат амплификации для экзогенного ВК свидетельствует о присутствии ингибиторов ПЦР в образце и/или некорректном проведении экстракции ДНК. Невалидный результат амплификации для эндогенного ВК свидетельствует о плохом качестве взятия и/или хранения биоматериала и/или некорректном проведении экстракции ДНК.

14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению и количественному определению ДНК выявляемых микроорганизмов, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для качественного и количественного определения ДНК выявляемых микроорганизмов в биологическом материале методом ПЦР.

15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА¹⁰

15.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 14.

Таблица 14

Предел обнаружения		
Мишень	Предел обнаружения, ГЭ/мл	95 %-ый ДИ, ГЭ/мл
ДНК EBV	400	235-668
ДНК CMV	400	245-645
ДНК HHV6	400	252-626

¹⁰ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями ДНК выявляемых микроорганизмов.

15.2 Диапазон измерения и предел измерения

Диапазон измерения и предел измерения набора указаны в таблице 15.

Таблица 15

Диапазон измерения и предел измерения

Мишень	Диапазон измерения, ГЭ/мл	Предел измерения, ГЭ/мл
ДНК EBV	$8 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^2$
ДНК CMV	$8 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^2$
ДНК HHV6	$8 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^2$

15.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 16, геномной ДНК человека, а также НК выявляемых микроорганизмов. НК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 16

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
HAV	HDV	HSV 2 типа
HBV	HIV	HSV 1 типа
HCV	VZV	

15.3.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 17.

Таблица 17

Потенциально интерферирующие вещества

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Цельная кровь	Гепарин	Гепарин	Антикоагулянт	0,15 МЕ/мл	Концентрация в вакуумной пробирке
	ЭДТА-K2	ЭДТА-K2		0,5 мМ/мл	
	Гепарин	Гепарин		0,15 МЕ/мл	
Плазма крови, лейкоциты крови	ЭДТА-K2	ЭДТА-K2	Антикоагулянт	0,5 мМ/мл	
	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды		5 % v/v	
	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды		5 % v/v	
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки, слюна	Муцин	Очищенный белок	Эндогенная субстанция	5 % v/v	Объем в образце в условиях «наихудшего случая»
	Раствор хлоргексидина	Хлоргексидин		0,25 %	
	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды		5 % v/v	
Спинномозговая жидкость	Глюкоза	Глюкоза	Эндогенная субстанция	10 ммоль/л	Объем в образце в условиях «наихудшего случая»
	Альбумин	Белок		500 мг/л	
	Азитромицин	Азитромицин		1 мг/мл	

По результатам оценки было определено вещество (гепарин), ингибирующее ПЦР, а также показано, что влияние остальных испытанных потенциально интерферирующих веществ в концентрациях согласно таблице 17 на ПЦР, проводимую с использованием набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)», отсутствует.

15.4 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_p значений концентрации, характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v значений концентрации, характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

15.5 Правильность измерения

Систематическая погрешность, характеризующая правильность измерения с использованием набора, не превышает 15 %.

15.6 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 18.

Таблица 18

Диагностические характеристики

Исследуемый материал	Мишень	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
		положит.	отрицат.		
Цельная кровь	ДНК EBV	102	188	97,1 – 100	98,4 – 100
	ДНК CMV	107	183	97,2 – 100	98,4 – 100
	ДНК HHV6	101	189	97,1 – 100	98,4 – 100
Плазма крови	ДНК EBV	103	185	97,1 – 100	98,4 – 100
	ДНК CMV	100	188	97,0 – 100	98,4 – 100
	ДНК HHV6	105	183	97,2 – 100	98,4 – 100
Лейкоциты крови	ДНК EBV	100	185	97,0 – 100	98,4 – 100
	ДНК CMV	100	185	97,0 – 100	98,4 – 100
	ДНК HHV6	105	90	97,2 – 100	96,7 – 100
Слюна	ДНК EBV	104	158	97,2 – 100	98,1 – 100
	ДНК CMV	104	158	97,2 – 100	98,1 – 100
	ДНК HHV6	94	168	96,9 – 100	98,2 – 100
Спинномозговая жидкость	ДНК EBV	94	188	96,9 – 100	98,4 – 100
	ДНК CMV	94	188	96,9 – 100	98,4 – 100
	ДНК HHV6	94	188	96,9 – 100	98,4 – 100
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	ДНК EBV	106	162	97,2 – 100	98,2 – 100
	ДНК CMV	106	162	97,2 – 100	98,2 – 100
	ДНК HHV6	86	182	96,6 – 100	98,4 – 100
Моча (осадок первой порции)	ДНК EBV	80	160	96,3 – 100	98,1 – 100
	ДНК CMV	78	162	96,2 – 100	98,2 – 100
	ДНК HHV6	82	158	96,4 – 100	98,1 – 100

15.7 Корреляция

Корреляция экспериментальных значений концентраций, полученных при исследовании образцов биологического материала с использованием набора реагентов «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)» и референтного набора реагентов, представлена на рисунке 1.

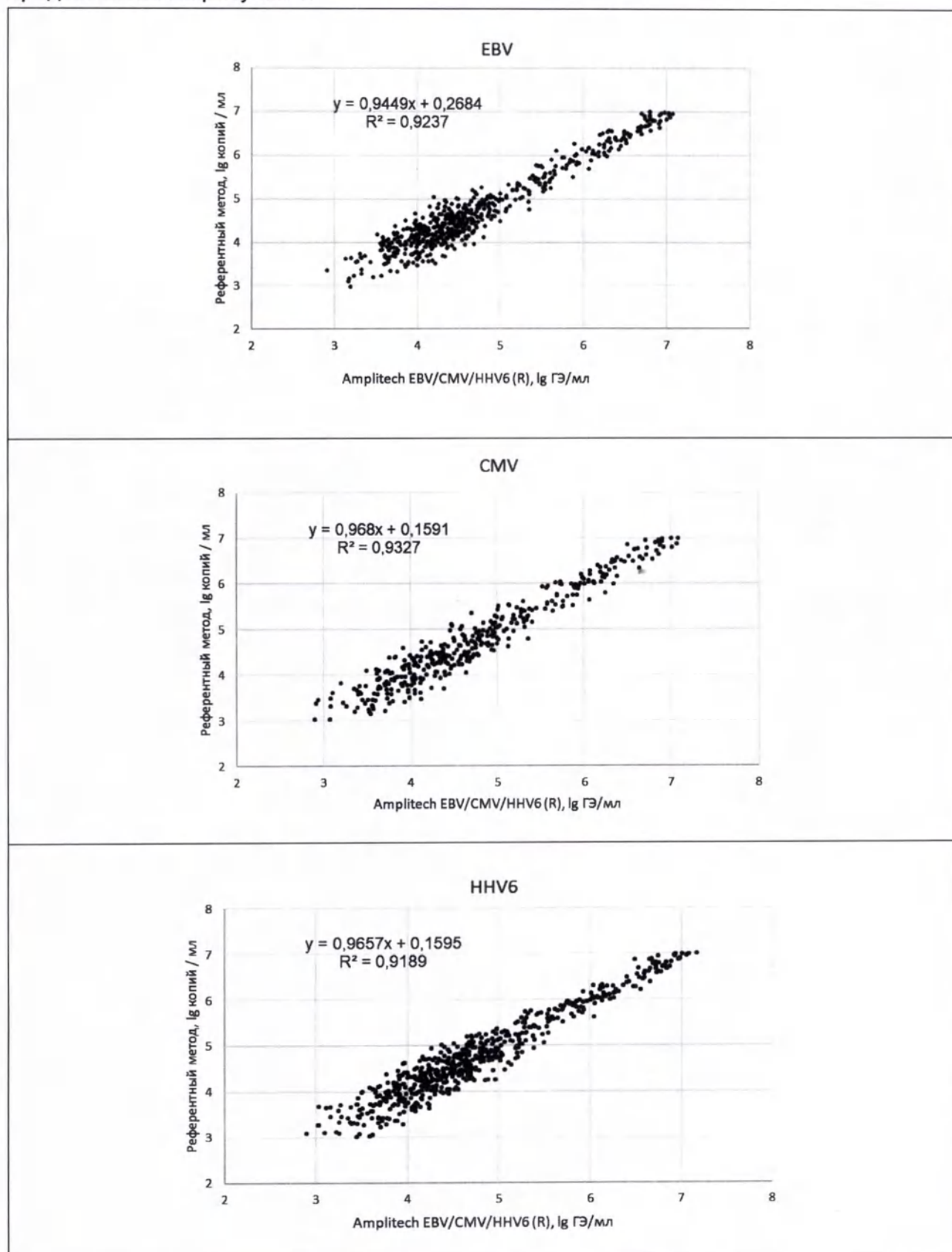


Рисунок 1

16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

16.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ВК, ПК Н, ОК, Смесь EBV/CMV/HHV6 (RW) использовать до истечения срока годности набора. Планшет со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) после снятия защитной пленки хранить не более 30 минут.

Не допускается смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

16.2 Хранение

Форму выпуска 1 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) беречь от влаги. После транспортирования допускается хранить набор не более 5 суток при температуре от 8 °С до 25 °С.

Форму выпуска 2 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищённом от солнечного света месте.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

16.3 Транспортирование

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

Допускается транспортировать набор формы выпуска 1 при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

16.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

St	– cycle threshold (пороговый цикл)
в.	– версия
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаз	– дезоксирибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

18 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology. – 1981. – Vol. 126. – P. 1614–1619.
2. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737–742.

19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Методы испытаний

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 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

Сообщения о неблагоприятных событиях (инцидентах), возникших при работе с набором и не указанных в данной инструкции, следует направлять производителю по указанному выше адресу и в уполномоченный регуляторный орган согласно действующему законодательству.

21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Код серии



Дата изготовления



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению



Не допускать воздействия солнечного света



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Не допускать воздействия влаги



Номер по каталогу



Диапазон влажности



Общество с ограниченной ответственностью «Амплитек»
(ООО «Амплитек»),
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru,
e-mail: support@amplitech.ru

Лист регистрации изменений

[illegible]

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 26 листа(-ов)

Генеральный директор

ООО «Амплитек»

Ходяков А.В.

Подпись



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 26 ЛИСТОВ



Ген. Директор

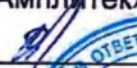
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

Варнавиус Р.К.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»


_____ А.В. Ходяков
15.08.2024



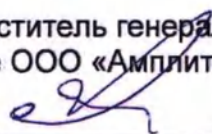
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК EBV, CMV, HHV6 В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH EBV/CMV/HHV6 (R))
ПО ТУ 21.20.23-043-19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 1

Лист утверждения

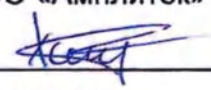
СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»


_____ А.С. Коновалов

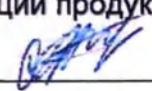
26.07.2024

Руководитель научной группы
ООО «Амплитек»


_____ Г.А. Хайруллина

26.07.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»


_____ А.А. Филичева

26.07.2024

Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК EBV, CMV, HHV6 в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R))
по ТУ 21.20.23-043-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО



P033-1



xxxx



96

ВНИМАНИЕ! Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

Экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из следующих видов биологического материала:

- цельная кровь, плазма крови, лейкоциты крови;
- слюна, мазки со слизистой оболочки ротоглотки;
- спинномозговая жидкость (ликвор);
- моча (осадок первой порции утренней мочи).

Экстракцию ДНК и внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки планшета с реакционной Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Н и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») формы 1 согласно инструкции по его применению.
- 3 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) и снять с них защитную плёнку.
- 4 Установить отрезанные пробирки со Смесью EBV/CMV/HHV6 (R) на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.
- 5 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-100 (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного ниже.



ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

6 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech EBV/CMV/HHV6 (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесённым элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

7 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	2 мин	—	1
3	95	10 с	—	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) При одновременном поведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °C – 15 мин» для экономии времени.

8 Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции

При необходимости ручной подготовки к ПЦР после экстракции ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») (с применением автоматической или ручной методики), необходимо:

1 Установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.

2 Внести в подготовленные пробирки по **20 мкл** образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Н).

3 Программа амплификации для этого случая описана ниже:

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	—	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Учёт и интерпретация результатов

1 Результаты интерпретировать на основании наличия (отсутствия) Ct (кривых накопления флуоресцентного сигнала, пересекающих пороговую линию) по детектируемым каналам в соответствии с таблицей:

Наличие Ct по каналу для флуорофора	FAM	R6G	ROX
Выявлена ДНК	HHV6	EBV	CMV

Примечание – Если в исследуемом образце не обнаружены ДНК HHV6, EBV и CMV, необходимо убедиться, что значение Ct по каналу **Cy5** не превышает 32 и концентрация **ДНК человека** определена не менее **50000 копий/мл** (для образцов цельной крови и лейкоцитов крови). В противном случае результат считать **невалидным**.

2 Количественное определение ДНК выявляемых возбудителей рассчитать с помощью алгоритма, приведенного в инструкции к набору реагентов.

3 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей², приведённой ниже:

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5.5	Cy5
ОК	Значение Ct отсутствует, или по каналу Cy5 определено значение Ct, но рассчитанная концентрация ДНК человека не больше 1000 копий/мл				≤ 32
ПК Н	≤ 32	≤ 32	≤ 32	≤ 32	≤ 32

¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

² Переменная информация, специфичная для лота, выделена цветом.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

4/250761
лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

А.В. Ходяков

