



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 22 февраля 2019 года № ФСР 2010/09026

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами TBEV, Borellia burgdorferi sl, Anaplasma phagocytophillum, Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophillum, E.chaffeensis/E.muris-FL" по ТУ 9398-153-01897593-2012**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Производитель

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Место производства медицинского изделия

**см. приложение**

Номер регистрационного досье № РД-25793/6425 от 08.02.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 26

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 22 февраля 2019 года № 1251  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения**

**Д.Ю. Павлюков**



0042431

**ПРИЛОЖЕНИЕ**  
**К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**  
**НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 22 февраля 2019 года № ФСР 2010/09026

Лист 1

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами TBEV, Borellia burgdorferi sl, Anaplasma phagocytophillum, Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophillum, E.chaffeensis/E.muris-FL" по ТУ 9398-153-01897593-2012:**

Комплектация:

Форма 1 включает комплекты реагентов: "РИБО-преп" вариант 50, "РЕВЕРТА-L" вариант 50, "ПЦР-комплект" вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплект реагентов "ПЦР-комплект" вариант FRT-50 F.

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

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0053700



For Professional Use Only

# AmpliSens<sup>®</sup> *Leptospira-FRT*

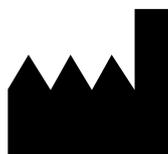
PCR kit

## Instruction Manual

# AmpliSens<sup>®</sup>



Ecoli s.r.o., Studenohorska 12  
841 03 Bratislava 47  
Slovak Republic  
Tel.: +421 2 6478 9336  
Fax: +421 2 6478 9040



Federal Budget Institute of  
Science "Central Research  
Institute for Epidemiology"  
3A Novogireevskaya Street  
Moscow 111123 Russia

## TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE .....	3
2. PRINCIPLE OF PCR DETECTION .....	3
3. CONTENT .....	3
4. ADDITIONAL REQUIREMENTS. ....	4
5. GENERAL PRECAUTIONS.....	4
6. SAMPLING AND HANDLING .....	5
7. WORKING CONDITIONS.....	7
8. PROTOCOL .....	7
9. DATA ANALYSIS .....	9
10. TROUBLESHOOTING.....	11
11. TRANSPORTATION.....	11
12. STABILITY AND STORAGE.....	11
13. SPECIFICATIONS.....	12
14. REFERENCES .....	12
15. QUALITY CONTROL.....	13
16. KEY TO SYMBOLS USED .....	13

## 1. INTENDED USE

**AmpliSens® *Leptospira*-FRT** PCR kit is an *in vitro* nucleic acid amplification test for qualitative detection of 16S RNA of pathogenic *Leptospira* genospecies in the clinical material (blood and cerebrospinal fluid), autopsy material (brain, kidney, liver, lung tissue, and mesenteric lymph nodes) and biological material (material obtained from died animals (lung, brain, and kidney tissue) and animals suffering from acute leptospirosis (blood) or *Leptospira* persisting in kidneys (urine)) using real-time hybridization-fluorescence detection of amplified products.



The results of PCR analysis are taken into account in complex diagnostics of disease.

## 2. PRINCIPLE OF PCR DETECTION

Detection of 16S RNA of pathogenic *Leptospira* genospecies by the polymerase chain reaction (PCR) is based on the amplification of the pathogen genome specific region using specific primers. In the real-time PCR, the amplified product is detected with the use of fluorescent dyes. These dyes are linked to oligonucleotide probes, which bind specifically to the amplified product during thermocycling. The real-time monitoring of the fluorescence intensities during the real-time PCR allows the detection of accumulating product without re-opening the reaction tubes after the PCR run.

**AmpliSens® *Leptospira*-FRT** PCR kit is a qualitative test that contains the Internal Control (Internal Control STI-87-rec (IC)). It must be used in the isolation procedure in order to control the extraction process of each individual sample and to identify possible reaction inhibition.

**AmpliSens® *Leptospira*-FRT** PCR kit uses “hot-start”, which greatly reduces the frequency of nonspecifically primed reactions. “Hot-start” is guaranteed by separation of nucleotides and Taq-polymerase using chemically modified polymerase (TaqF). Chemically modified polymerase (TaqF) is activated by heating at 95 °C for 15 min.

## 3. CONTENT

**AmpliSens® *Leptospira*-FRT** PCR kit is produced in 1 form:

**AmpliSens® *Leptospira*-FRT** PCR kit variant FRT **REF** R-B49(RG,iQ)-CE.

AmpliSens® *Leptospira*-FRT PCR kit variant FRT includes:

<i>Reagent</i>	<i>Description</i>	<i>Volume, ml</i>	<i>Quantity</i>
RT-G-mix-2	colorless clear liquid	0.01	2 tubes
RT-PCR-mix-1-FRT <i>Leptospira</i>	colorless clear liquid	0.6	1 tube
RT-PCR-mix-2-FEP/FRT	colorless clear liquid	0.3	1 tube
Polymerase (TaqF)	colorless clear liquid	0.03	1 tube
TM-Revertase (MMIv)	colorless clear liquid	0.015	1 tube
Positive Control cDNA <i>Leptospira</i> (C+ <i>Leptospira</i> )	colorless clear liquid	0.1	1 tube
RNA-eluent	colorless clear liquid	0.07	2 tubes
Negative Control (C-)*	colorless clear liquid	1.6	2 tubes
Positive Control <i>Leptospira</i> -rec	colorless clear liquid	0.03	5 tubes
Internal Control STI-87-rec (IC) **	colorless clear liquid	0.12	5 tubes

\* must be used in the extraction procedure as Negative Control of Extraction.

\*\* add 10 µl of Internal Control during the DNA extraction procedure directly to the sample/lysis mixture (see RIBO-sorb **REF** K2-1-Et-50-CE, RIBO-zol-C **REF** K2-13-50-CE, RIBO-prep **REF** K2-9-Et-50-CE protocols).

AmpliSens® *Leptospira*-FRT PCR kit is intended for 60 reactions, including controls.

#### 4. ADDITIONAL REQUIREMENTS

- RNA extraction kit.
- Disposable powder-free gloves and a laboratory coat.
- Pipettes (adjustable).
- Sterile RNase-free pipette tips with aerosol filters (up to 200 µl).
- Tube racks.
- Vortex mixer.
- Desktop centrifuge with a rotor for 2-ml reaction tubes.
- PCR box.
- Real-time instruments (for example, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Australia); iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA), or equivalent).
- Disposable polypropylene PCR tubes (0.2-ml).
- Refrigerator for 2–8 °C.
- Deep-freezer at the temperature from minus 24 to minus 16 °C.

- Reservoir for used tips.

## 5. GENERAL PRECAUTIONS

The user should always pay attention to the following:

- Use sterile pipette tips with aerosol barriers and use a new tip for every procedure.
- Store all extracted positive material (specimens, controls and amplicons) away from all other reagents and add it to the reaction mix in a distantly separated facility.
- Thaw all components thoroughly at room temperature before starting an assay.
- When thawed, mix the components and centrifuge briefly.
- Use disposable protective gloves and laboratory cloths, and protect eyes while samples and reagents handling. Thoroughly wash hands afterwards.
- Do not eat, drink, smoke, apply cosmetics, or handle contact lenses in laboratory work areas.
- Do not use the PCR kit if the internal packaging was damaged or its appearance was changed.
- Do not use the PCR kit if the transportation and storage conditions according to the Instruction Manual were not observed.
- Do not use a kit after its expiration date.
- Dispose of all specimens and unused reagents in accordance with local regulations.
- Samples should be considered potentially infectious and handled in biological cabinet in compliance with appropriate biosafety practices.
- Clean and disinfect all samples or reagents spills using a disinfectant, such as 0.5 % sodium hypochlorite or another suitable disinfectant.
- Avoid samples and reagents contact with the skin, eyes, and mucous membranes. If these solutions come into contact, rinse the injured area immediately with water and seek medical advice immediately.
- Safety Data Sheets (SDS) are available on request.
- The PCR kit is intended for single use for PCR analysis of specified number of samples (see the section “Content”).
- The PCR kit is ready for use in accordance with the Instruction Manual. Use the PCR kit strictly for intended purpose.
- Use of this product should be limited to personnel trained in DNA amplification techniques.
- Workflow in the laboratory must be one-directional, beginning in the Extraction Area and moving to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment

and reagents in the area where the previous step was performed.



Some components of this kit contain sodium azide as a preservative. Do not use metal tubing for reagent transfer.

## 6. SAMPLING AND HANDLING



Obtaining samples of biological materials for PCR-analysis, transportation and storage are described in manufacturer's handbook [1]. It is recommended that this handbook is read before starting work.

**AmpliSens<sup>®</sup> *Leptospira*-FRT** PCR kit is intended for analysis of RNA extracted with RNA extraction kits from the following material:

### Human material

- clinical material (blood, cerebrospinal fluid);
- autopsy material (brain, kidney, liver, and lung tissue and mesenterial lymph nodes).

### Animal material (biological material)

- urine;
- blood;
- brain, kidney, and lung tissue.

The material can be stored at 2-8 °C for 1 day. The autopsy material can be stored at ≤ -16 °C for 1 week, at ≤ -68 °C for a long time.

### Sampling and pretreatment

6.1. ~~Bsp~~ . Whole blood is taken in the morning after overnight fasting into the tube with 6 % EDTA solution in the ratio 1 : 20. The closed tube with whole peripheral blood should be rotated several times. The tube with blood should be centrifugated at 1,000 g for 10 min to obtain blood plasma (if the blood was stored at 2–8 °C more than 1 hour, it should be mixed carefully by inverting the tube). Transfer 1 ml of plasma into two tubes. Two tubes with 1.0 ml of plasma should be centrifuged at 13,000 rpm for 10 min to concentrate bacterial cells. Then, 900 µl of the supernatant plasma should be removed with a filter tip into the container with disinfectant. The pellet and 100 µl of the supernatant are tested for the presence of ~~b~~ 16S RNA. The second pellet prepared in the same way should be stored at ≤ -16 °C for repeated extraction (if any technological procedure is performed incorrectly). The pellet obtained from blood plasma can be stored at ≤ -16 °C for 1 week or at ≤ -68 °C for a long time.

When cerebrospinal fluid is analyzed, the pellet is obtained by the same procedure by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. The pellet and 100 µl of the supernatant are analyzed.

6.2. ~~U~~ for analyses is taken into a sterile container. If there is no chance to test material within 24 h after sampling, urine is transferred to a centrifuge tube or an Eppendorf tube. The contents of the tube is mixed with glycerol (~10 % v/v) and frozen. It can be stored at  $\leq -16$  °C for 1 week or at  $\leq -68$  °C for a long time.

If a cooling centrifuge (4 °C) with a speed of 9,000–10,000 g intended for 30-ml tubes is available, the following sample preparation procedure is used. The sample is centrifuged at 9,000–10,000 g for 10 min, the supernatant is transferred to a container with disinfectant. Leave ~1 ml of the supernatant over the pellet in the tube and resuspend it. Transfer the suspension to a new tube and concentrate it by centrifugation at 13 000,rpm for 10 min. Then, 900  $\mu$ l of the supernatant is transferred to the container with disinfectant, and the pellet and 100  $\mu$ l of the supernatant is used for RNA isolation. In case of large quantities of salts and mucus, 100  $\mu$ l of the supernatant and the upper layer of cells should be carefully taken from the salt pellet and transferred into a new tube for RNA isolation.

If you have no centrifuge for 30-ml tubes and a speed of 9,000–10,000 g, bacteria are concentrated from 1 ml of urine as described above using 1.5-ml tubes and a microcentrifuge for Eppendorf tubes. The remaining urine should be decontaminated in a disinfectant.

6.3. ~~U~~ ~~U~~ ~~U~~ ~~U~~ is to be homogenized in sterile porcelain mortars with pestles. Then, 10 % suspension in sterile saline or phosphate buffer is prepared; 30  $\mu$ l of the suspension is taken for RNA extraction.

## 7. WORKING CONDITIONS

AmpliSens® *Leptospira*-FRT PCR kit should be used at 18–25 °C.

## 8. PROTOCOL

### 8.1. RNA extraction

It is recommended to use the following nucleic acid extraction kits:

- RIBO-prep, **REF** K2-9-Et-50-CE.
- RIBO-zol-C **REF** K2-13-50-CE and RIBO-sorb **REF** K2-1-Et-50-CE.



Extract the RNA according to the manufacturer's protocol.



**If using the RIBO-prep kit** extract the RNA/DNA according to the manufacturer's protocol taking into account next additions and improvements:

- If RNA is extracted from the tissues homogenates. Add **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** to each tube and then add **300  $\mu$ l** of **Solution for Lysis**. Label test tubes. Then, add **50  $\mu$ l** of test suspensions to the tubes

with **Solution for Lysis** and **Internal Control STI-87-rec (IC)**.

- If RNA is extracted from the cell pellets after  $\beta$  concentration, **300  $\mu$ l** of **Solution for Lysis** and **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** should be added directly into the tubes with the pellets.
- Add only **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** and **300  $\mu$ l** of **Solution for Lysis** into the tube for the Negative Control of extraction (C-).
- Add **300  $\mu$ l** of **Solution for Lysis**, and then add **90  $\mu$ l** of **Negative Control (C-)**, **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** and **10  $\mu$ l** of **Positive Control *Leptospira-rec*** into the tube for the Positive Control of extraction (PCE).
- **40  $\mu$ l** of **RNA-buffer** is to be used.



**If using the RIBO-zol-C and RIBO-sorb kit** extract the RNA/DNA according to the manufacturer's protocol taking into account next additions and improvements:

- Add **300  $\mu$ l** of **Solution D** and then **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** into the tubes with the test pellets of blood, cerebrospinal fluid (when extracting from cerebrospinal fluid add 50  $\mu$ l of Negative control (C-) into the tube after lysis) or urine, or with tissues homogenate.
- In case of analyzing the suspensions of viscera tissues, at the 1<sup>st</sup> stage **300  $\mu$ l** of **Solution D** and **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** can be added first into empty tubes and then **30  $\mu$ l** of test sample can be added.
- Add **300  $\mu$ l** of **Solution D**, **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** and **100  $\mu$ l** of **Negative control (C-)** into the tube for the Negative Control of extraction (C-).
- Add **300  $\mu$ l** of **Solution D**, and then add **90  $\mu$ l** of **Negative Control (C-)**, **10  $\mu$ l** of **Internal Control STI-87-rec (IC)** and **10  $\mu$ l** of **Positive Control *Leptospira-rec*** into the tube for the Positive Control of extraction (PCE).
- After the first stage of RNA extraction with **RIBO-zol-C** kit the top phase of obtained samples (**400  $\mu$ l** when extracting RNA from cerebrospinal fluid, urine pellets and tissues homogenates, **200  $\mu$ l** – from blood pellets, 450  $\mu$ l – from C- and PCE samples) should be transferred into new 1.5-ml tubes with **400  $\mu$ l** of **Lysis Solution** (from RIBO-sorb kit).
- **40  $\mu$ l** of **RNA-buffer** is to be used.

## 8.2. Preparing reverse transcription and PCR

The total reaction volume is **25  $\mu$ l**, the volume of DNA sample is **10  $\mu$ l**.



Only RNase-free, DNase-free disposable plastic consumables must be used when working with RNA.

### 8.2.1 Preparing tubes for reverse transcription and PCR

1. Prepare the required number of tubes for amplification of cDNA obtained from clinical and control samples. The type of tubes depends on the PCR instrument used for analysis. For carrying out N reactions with 2 controls, N+2 tubes are required.
2. Prepare the **reaction mixture**, calculating per **one** reaction:

- **10 µl** of RT-PCR-mix-1-FRT *Leptospira*
- **5 µl** of RT-PCR-mix-2-FEP/FRT
- **0.5 µl** of polymerase (TaqF)
- **0.25 µl** of TM-Revertase (MMIv)
- **0.25 µl** of RT-G-mix-2

3. Transfer **15 µl** of the prepared mixture to each tube. Discard the unused mixture.
4. Using filter tips add **10 µl** of **RNA** samples obtained at the RNA extraction stage into prepared tubes.



Avoid transferring of sorbent together with the RNA samples into the reaction mixture for RT-PCR.

5. Carry out the control amplification reactions:

- NCA** – Add **10 µl** of **RNA-eluent** to the tube labeled NCA (Negative Control of Amplification).
- C+** – Add **10 µl** of **Positive Control cDNA *Leptospira* (C+*Leptospira*)** to the tube labeled C+ (Positive Control of Amplification).
- C–** – Add **10 µl** of **the sample extracted from the Negative Control of Extraction sample** to the tube labeled C– (Negative control of Extraction).
- PCE** – Add **10 µl** of **the sample extracted from the Positive control of Extraction sample** to the tube labeled PCE (Positive control of Extraction).



Amplification is to be carried immediately after mixing the reaction mixture, RNA-sample and controls. The time period between addition of RNA-samples into the reaction mixture and amplification starting is to be not more than 10-15 min.

### 8.2.2. Amplification

1. Create a temperature profile on your instrument as follows:

Table 1

**Amplification program for *Leptospira* cDNA**

Step	Rotor-type instruments <sup>1</sup>			Plate-type instruments <sup>2</sup>		
	Temperature, °C	Time	Cycles	Temperature, °C	Time	Cycles
1	50 °C	30 min	1	50 °C	30 min	1
2	95 °C	15 min	1	95 °C	15 min	1
3	95 °C	20 s	10	95 °C	20 s	10
	65 °C	50 s		65 °C	50 s	
	72 °C	20 s				
4	95 °C	20 s	38	95 °C	20 s	40
	61 °C	50 s Fluorescence acquiring		61 °C	50 s Fluorescence acquiring	
	72 °C	20 s		65 °C	20 s	

<sup>1</sup> For example, Rotor-Gene 3000/Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia).

<sup>2</sup> For example, iCycler iQ5 (Bio-Rad, USA).

Fluorescent signal is detected in the channels for the FAM and JOE fluorophores.

2. Adjust the fluorescence channel sensitivity according to the Guidelines [2].
3. Insert tubes into the reaction module of the device.
4. Run the amplification program with fluorescence detection.
5. Analyze results after the amplification program is completed.

## 9. DATA ANALYSIS

Analysis of results is performed by the software of the real-time PCR instrument used by measuring fluorescence signal accumulation in two channels:

- The signal of the IC cDNA amplification product is detected in the channel for the FAM fluorophore.
- The signal of the  $\beta$  cDNA amplification product is detected in the channel for the JOE fluorophore.

Results are interpreted by the crossing (or not-crossing) the fluorescence curve with the threshold line set at the specific level that corresponds to the presence (or absence) of a  $C$  value of the cDNA sample in the corresponding column of the results grid.

Principle of interpretation is the following:

- $\beta$  cDNA is **detected** if the  $C$  value determined in the results grid in the channel for the JOE fluorophore is less than the boundary  $C$  value specified in the Guidelines.
- $\beta$  cDNA is **not detected** in a sample if the  $C$  value is not determined (absent) in the channel for the JOE fluorophore, whereas the  $C$  value determined in the channel for the FAM fluorophore is less than the boundary  $C$  value specified in the Guidelines.
- The result is **invalid** if the  $C$  value is not determined (absent) in the channel for the JOE fluorophores whereas the  $C$  value in the channel for the FAM fluorophore is greater than the specified boundary  $C$  value. In such cases, the PCR analysis of this sample should be repeated starting from the RNA extraction stage.
- The result is **equivocal** if the  $C$  value determined in the channel for the JOE fluorophore is greater than the boundary  $C$  value specified in the Guidelines, whereas the  $C$  value determined in the channel for the FAM fluorophore is less than the boundary  $C$  value specified in the Guidelines. In such cases, the PCR analysis of this sample should be repeated two times starting from the RNA extraction stage.



Boundary  $C$  values are specified in the Guidelines [2]

**The result of the analysis is considered reliable only if the results obtained for the**

Positive and Negative Controls of amplification and extraction are correct (see Table 2).

Table 2

**Results for controls**

Control	Stage for control	Ct value in the channel for the fluorophore	
		FAM	JOE
PCE	DNA extraction	Present	< boundary value
C-	DNA extraction	Present	Absent
NCA	PCR	Absent	Absent
C+	PCR	Absent	< boundary value

**10. TROUBLESHOOTING**

Results of analysis are not being registered in the following cases:

1. If the C value is determined for the Negative Control of extraction (C-) in the channel for the JOE fluorophore and/or for the Negative Control of amplification (NCA) in the channels for the FAM and JOE fluorophores in the results grid, it indicates contamination of reagents or samples. In such cases, the results of analysis are considered to be irrelevant. Analysis should be repeated and measures to detect and eliminate the source of contamination should be taken.
2. If no signal is detected for the Negative Control of extraction (C-) in the channel for the FAM fluorophore and/or for the Positive Control of extraction (PCE) in the channels for the FAM and JOE fluorophores, the results of analysis are considered invalid. Analysis of all samples should be repeated starting from the extraction stage.
3. If no signal is detected for Positive Control of amplification (C+) in the channel for the JOE fluorophore, the results of analysis are considered invalid. Analysis of all samples should be repeated starting from the RT-PCR stage.

If you have any further questions or if you encounter problems, please contact our Authorized representative in the European Community.

**11. TRANSPORTATION**

**AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit should be transported at 2–8 °C for no longer than 5 days.

**12. STABILITY AND STORAGE**

All components of the **AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit are to be stored at 2–8 °C when not in use (except for RT-G-mix-2, RT-PCR-mix-1-FRT ~~2~~, RT-PCR-mix-2-FEP/FRT, Polymerase (TaqF), and TM-Revertase (MMIv)). All components of the

**AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit are stable until the expiry date stated on the label. The shelf life of reagents before and after the first use is the same, unless otherwise stated.



RT-G-mix-2, RT-PCR-mix-1-FRT ~~Ⓢ~~, RT-PCR-mix-2-FEP/FRT, Polymerase (TaqF), and TM-Revertase (MMIv) are to be stored at the temperature from minus 24 to minus 16 °C.



RT-PCR-mix-1-FRT ~~Ⓢ~~ is to be stored away from light

### 13. SPECIFICATIONS

#### 13.1. Sensitivity

Analytical Sensitivity of **AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit is not less than  $5 \times 10^3$  copies per 1 ml of sample (copies/ml).



The claimed analytical features of **AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit are guaranteed only when additional reagents kits **RIBO-sorb** and **RIBO-zol-C** or **RIBO-prep** (manufactured by Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”) are used.

#### 13.2. Specificity

The analytical specificity of **AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit is ensured by the selection of specific primers and probes as well as stringent reaction conditions. The primers and probes have been checked for possible homologies to all sequences published in gene banks by sequence comparison analysis.

The clinical specificity of **AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit was confirmed in laboratory clinical trials.

### 14. REFERENCES

1. Handbook “Sampling, Transportation, and Storage of Clinical Material for PCR diagnostics”, developed by Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology” of Federal Service for Surveillance on Consumers’ Rights Protection and Human Well-Being, Moscow, 2010.
2. Guidelines to the **AmpliSens® Leptospira-FRT** PCR kit for qualitative detection of 16S RNA of pathogenic ~~Ⓢ~~ genospecies in the clinical material, autopsy material and biological material by the polymerase chain reaction (PCR) with real-time hybridization-fluorescence detection developed by Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”.

## 15. QUALITY CONTROL

In compliance with Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology” ISO 13485-Certified Quality Management System, each lot of the **AmpliSens® *Leptospira-FRT*** PCR kit has been tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

## 16. KEY TO SYMBOLS USED

	Catalogue number		Caution
	Batch code		Sufficient for
	<i>Itb</i> diagnostic medical device		Expiration Date
	Version		Consult instructions for use
	Temperature limitation		Keep away from sunlight
	Manufacturer	<b>NCA</b>	Negative control of amplification
	Date of manufacture	<b>C-</b>	Negative control of extraction
	Authorised representative in the European Community	<b>C+</b>	Positive control of amplification
		<b>PCE</b>	Positive control of extraction
		<b>IC</b>	Internal control

### List of Changes Made in the Instruction Manual

VER	Location of changes	Essence of changes
13.12.10	Cover page	The phrase “For Professional Use Only” was added
	Intended use	The phrase “The results of PCR analysis are taken into account in complex diagnostics of disease” was added
	Content	New sections “Working Conditions” and “Transportation” were added
		The “Explanation of Symbols” section was renamed to “Key to Symbols Used”
	Stability and Storage	The information about the shelf life of reagents before and after the first use was added
		Information that RT-PCR-mix-1-FRT <del>β</del> is kept away from light was added
	Key to Symbols Used	The explanation of symbols was corrected
	Footer	Reference number was changed from R-B49(RG)-CE to R-B49(RG,iQ)-CE
Sampling and Handling	Duration of the urine sample storage was changed	
	Information about storage and disposal of urine samples was added	
01.07.11 RT	Cover page, text	The name of Institute was changed to Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”
16.10.15 ChA	3. Content	Quantity of Negative Control (C-) tubes was changed from 1 to 2
	8.1. RNA Isolation	For RIBO-prep the procedure of positive control of extraction preparation was changed: 90 µl of Negative Control (C-) is to be added additionally
17.01.17 ME	Text	Corrections according to the template
	1. Intended use	Types of biological material was specified
	8.1. RNA extraction	The sections were rewritten
	8.2.2. Amplification	
	9. Data analysis	
14. References	The reference to Guidelines was added	

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от 03.02.2012 № 340-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ  
Директор Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и  
благополучия человека  
В.И.Покровский  
«01» августа 2011 г.



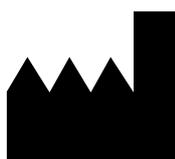
## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс<sup>®</sup> CCHFV-FL»**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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

**IVD**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК.....	11
ФОРМАТ FRT.....	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....	15
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....	15
ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ кДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	15
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	15
Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени».....	17
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	21
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	22
Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-преп».....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	24
Экстракция РНК из клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-золь-В» .....	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	26

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ОК	- отрицательный контроль экстракции РНК
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	-положительный контроль экстракции РНК
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
<i>СCHFV</i>	- <i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i> , вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *СCHFV-FL*» предназначен для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*СCHFV*) в клиническом материале (плазма и сыворотка крови) и клещах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

**ВНИМАНИЕ!** Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания<sup>1</sup>.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *СCHFV* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракция РНК из образцов биологического материала, обратная транскрипция РНК и ПЦР-амплификация участка кДНК *СCHFV* и гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT).

Экстракция РНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес), который позволяет контролировать выполнение

<sup>1</sup> В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента ТМ-ревертазы и амплификация участка кДНК *CSHFV* при помощи специфичных к этому участку кДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

## **ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**Набор реагентов выпускается в 1 формате.**

### **Формат FRT**

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;

**Форма 2** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

**Форма 3** включает комплекты реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

**Форма 4** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в зависимости от вида исследуемого материала.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК из биологического материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Использование формы комплектации 4 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала (объем исследуемой пробы)	Комплект для выделения РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Пробоподготовка материала
Сыворотка крови (100 мкл) Клещи <i>H. marginatum</i> пулы (50 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	$5 \times 10^3$	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом объеме исследуемой пробы
Клещи <i>H. marginatum</i> пулы (100 мкл)	«РИБО-золь-В»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	$5 \times 10^3$	

### Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

- флавивирусах (вирус Западного Нила, Омской геморрагической лихорадки);
- герпесвирусах (I и II типов, CMV, EBV, VZV, IV типа), энтеровирусах (ECHO, Coxsackie);
- риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii* ssp. *caspia*, *Coxiella burnetii*);
- ортобуньявирусах (вирус Тягини, Батаи);
- хантавирусах (Пумала, Добрава);

– тогатовирусах (Баткен).

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека и ДНК клещей ложноположительных результатов выявлено не было.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

**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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

**ВНИМАНИЕ!** В соответствии с Директивой Европейского Союза 67/548/ЕЕС следующие реагенты подлежат маркировке, как содержащие опасные вещества, а также требуют указания факторов риска (R) и мер предосторожности (S):

Наименование реагента	Наименование комплекта, в который входит реагент	Наименование опасного (в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС) вещества	Код опасности, перечень факторов риска (R) и мер предосторожности (S) в соответствии с директивой 67/548/ЕЕС	по ГН 2.2.5.1313-03 <sup>2</sup>			
				ПДК макс разовая/среднесменная	основная опасность	класс опасности	автоматический контроль над содержанием вещества в воздухе рабочей зоны
Раствор для лизиса	«РИБО-преп»	Гуанидин тиоцианат	Harmful <sup>3</sup> R:20/21/22-32-52/53 S:13-61	Нет данных			
Раствор D	«РИБО-золь-В»						
Раствор для преципитации	«РИБО-преп»	Изопропанол	Highly flammable. Irritant <sup>3</sup> R:11-36-67 S:7-16-24/25-26	50/10	Пары	Класс опасности 3	не требуется
Раствор С	«РИБО-золь-В»						
Раствор А	«РИБО-золь-В»	Фенол	Toxic, Corrosive <sup>3</sup> R: 23/24/25-34-48/20/21/22-68 S: 24/25-26-28-36/37/39-45	1/0,3	Пары	Класс опасности 2	не требуется
Раствор В	«РИБО-золь-В»	Хлороформ	Harmful <sup>3</sup> R: 22-38-40-48/20/22 S: 36/37	10/5	Пары	Класс опасности 2	не требуется
Раствор для отмычки 3	«РИБО-преп» «РИБО-золь-В»	Этанол	Highly flammable <sup>3</sup> R:11 S:7-16	2000, 1000	Пары	Класс опасности 4	не требуется
раствор для отмычки 4	«РИБО-преп»						

Расшифровка обозначений факторов риска (R) и мер предосторожности (S).

R11: легко воспламеняется.

R20/21/22: опасен при проглатывании, контакте с кожей или вдыхании.

R22: опасен при проглатывании.

R23/24/25: ядовит при вдыхании, контакте с кожей и при проглатывании.

<sup>2</sup> Данные ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. «Вредные вещества. Классификация. Общие требования безопасности».

<sup>3</sup> Используются данные о коде опасности, факторах риска (R) и мерах предосторожности (S) фирмы Sigma-Aldrich (harmful - вредный для здоровья, highly flammable – легко воспламеняющийся, irritant - вызывающий раздражение, toxic- токсичный, corrosive- коррозионный).

R32: при контакте с кислотой образует токсичный газ.  
R34: вызывает ожоги.  
R36: раздражает слизистую глаз.  
R38: раздражает кожу.  
R40: ограниченное число доказательств канцерогенного эффекта.  
R48/20/22: опасность серьезного вреда для организма при длительном вдыхании и приеме внутрь.  
R48/20/21/22: опасность серьезных повреждений организма при длительном вдыхании, контакте с кожей или при приеме внутрь.  
R52/53: опасен для водных организмов, может вызывать долговременное нежелательное воздействие на водную среду.  
R67: пары вещества могут вызывать сонливость и головокружение.  
R68: риск необратимых последствий.  
S7: держать емкость плотно закрытой.  
S13: держать вдали от пищевых продуктов и напитков, продуктов для животных.  
S16: держать вдали от источников огня, не курить.  
S24/25: избегать контакта с кожей и глазами.  
S26: в случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью.  
S28: после попадания на кожу промыть большим количеством воды.  
S36/37: использовать соответствующую защитную одежду и перчатки.  
S36/37/39: использовать соответствующую защитную одежду, перчатки и маску/очки.  
S45: в случае происшествия или ухудшения самочувствия немедленно обратиться за медицинской помощью.  
S61: избегать попадания в окружающую среду.

**ВНИМАНИЕ!** При работе с легковоспламеняющимися веществами соблюдать правила пожарной безопасности для учреждений здравоохранения ППБО 07-91 от 30.08.91

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия

- монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
2. Комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого биоматериала) – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «РИБО-золь-В» (ТУ 9398-073-01897593-2008), или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 1.
  3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
  4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации клещей.
  5. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 7 мм.
  6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
  7. Центрифуга/вортекс.
  8. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
  9. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и до 200 мкл в штативах.
  10. Штативы для пробирок объемом 0,2 и 0,1 мл.
  11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
  12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК/РНК.
  13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
  14. Емкость для сброса наконечников.
  15. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 (ДНК-технологии, Россия) или аналогичные).
  16. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
    - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с

плоской крышкой или 0,1 мл (например, Axugen, США) – при использовании прибора роторного типа.

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

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

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК**

1. Плазма крови, сыворотка крови. Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают. Для отбора плазмы пробирку с кровью центрифугируют в течение 20 мин при 1600 g. Сыворотку крови получают стандартными методами. Для исследования отбирают 100 мкл клинического материала.
2. Клещи. Предварительно формируют пулы клещей: голодных объединяют по 5-7 особей, полунапитавшихся – по 2-3; полностью напитавшихся – по 1. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применяют следующие параметры для гомогенизации клещей рода *Hyalomma* (диаметр шариков – 7 мм; частота – 50 Гц/с; время гомогенизации – 12-15 мин; объем буфера – 700 мкл (ненапитавшийся клещ), 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей). В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно прокалывают стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей предварительно отмывают в 70 % этаноле в случае если клещ загрязнен маслом. Клещей растирают в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща) или в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща) 0,15 М раствора хлорида натрия или PBS-буфера, смешивая

раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин и отбирают 50 мкл надосадочной жидкости для выделения РНК с набором «РИБО-преп». РНК из полностью напитавшихся клещей рекомендуется выделять с применением набора реагентов «РИБО-золь-В». В этом случае для выделения РНК отбирают 100 мкл осветленной клещевой суспензии.

Допускается хранение вышеперечисленного клинического материала до проведения исследования в течение суток при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С. Клещей хранят или живыми (до 1 мес) или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее - при температуре минус 70 °С.

**ФОРМАТ FRT  
СОСТАВ**

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участка генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT CCHFV</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
<b>ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
<b>RT-G-mix-2</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
<b>Полимераза (TaqF)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
<b>ТМ-Ревертаза (MMIV)</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,015	1 пробирка
<b>ПКО кДНК CCHFV / STI</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
<b>РНК-буфер</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагаются следующие реагенты:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
<b>ПКО CCHFV-FL-rec</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	5 пробирок
<b>ВКО STI-87-rec</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
<b>тРНК 1 мкг/мкл</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок

**Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50** (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>4</sup>	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

**Комплект реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50** (ТУ 9398-073-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор E	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	1 пробирка
Раствор A	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	15	1 флакон
Раствор B	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка
Раствор C	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

<sup>4</sup> При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК из исследуемых образцов.
- Проведение обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CCHFV-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## **ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции РНК CCHFV из различных биологических объектов рекомендуется использовать следующие комплекты реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора:

- **«РИБО-преп»** – экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, суспензии голодных и полунапитавшихся клещей;
- **«РИБО-золь-В»** – экстракция РНК из суспензии полностью напитающихся клещей.

При использовании формы комплектации 2 экстракция РНК проводится с помощью комплекта «РИБО-преп» в соответствии с Приложением 1. При использовании формы комплектации 3 экстракция РНК проводится с помощью комплекта «РИБО-золь-В» в соответствии с Приложением 2.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК И АМПЛИФИКАЦИИ КДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

**Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в**

режиме «реального времени».

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

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

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций - смешайте в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT CCHFV**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, полимеразу (**TaqF**), **ТМ-Ревертазу (MMIv)** и **RT-G-mix-2**, из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT CCHFV**;
- **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**;
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**;
- **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv)**;
- **0,25 мкл RT-G-mix-2**.

При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум четырех контрольных образцов: положительного контроля экстракции (ПК), отрицательного контроля экстракции (ОК), положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+ и К-).

2. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.

**ВНИМАНИЕ!** Приготовленную смесь не хранить.

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

4. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера**.
- б) **положительный контроль ОТ-ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК CCHFV / STI**.

**ВНИМАНИЕ!** Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и проб РНК и контролей.

**Б. Проведение обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с детекцией в режиме «реального времени»**

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

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного типа <sup>5</sup>			Приборы планшетного типа <sup>6</sup>		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	50	30 мин	1	50	30 мин	1
2	95	15 мин	1	95	15 мин	1
3	95	10 с	5	95	10 с	5
	54	25 с		54	30 с	
	72	15 с		72	15 с	
4	95	10 с	45	95	10 с	45
	50	25 с детекция флуоресц. сигнала		50	35 с детекция флуоресц. сигнала	
		72			15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green и JOE/Yellow/HEX.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

**АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

<sup>5</sup> Например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или аналогичные.

<sup>6</sup> Например, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), ДТ-96 (ДНК-технологии, РФ) или аналогичные.

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК ВКО STI-87-rec;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК *ССНFV*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *ССНFV* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- кДНК *ССНFV* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE значение порогового цикла не определено или превышает указанное граничное значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE, и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической

лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® CCHFV-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

### Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора FAM
OK	Экстракция РНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
ПК	Экстракция РНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

### ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
2. Если для положительного контроля экстракции РНК (ПК) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить экстракцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК.
3. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (OK) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE.

4. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и JOE определено значение порогового цикла  $C_t$ , необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, детектируемая на канале для флуорофора JOE, с постановкой К– не менее чем в трех повторах.

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплекты реагентов «РИБО-преп», «РИБО-золь-В» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. РНК-элюент (из комплекта «РИБО-золь-В»), RT-G-mix-2, ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *СCHFV*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и тРНК 1 мкг/мкл (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *СCHFV* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *СCHFV-FL*» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: products@pcr.ru)<sup>7</sup>.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н.Родионова

Директор ФГУЗ Ставропольский  
научно-исследовательский противочумный  
институт Роспотребнадзора



А.Н.Куличенко

<sup>7</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Экстракция РНК из плазмы и сыворотки крови, клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87-rec** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87-rec** внести по **50 мкл** суспензий клещей либо по **100 мкл** плазмы, сыворотки.
4. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**, затем добавить **10 мкл ПКО CCHFV-FL-rec**.
5. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **только 10 мкл ВКО STI-87-rec** и **300 мкл раствора для лизиса**.
6. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
7. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
8. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
10. Процентрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.

11. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
12. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
13. Процентрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
14. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
15. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
16. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
17. Процентрифугировать пробирки при **10 000 g в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### Экстракция РНК из клещей с применением комплекта реагентов «РИБО-золь-В»

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87-гес**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора D**. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки с **раствором D** и **ВКО STI-87-гес** внести по **100 мкл** суспензий клещей.
3. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл ВКО STI-87-гес** и **300 мкл раствора D**, затем **80 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО CCHFV-FL-гес**.
4. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **10 мкл ВКО STI-87-гес** и **300 мкл раствора D**, затем **90 мкл ОКО**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 56 °С** в термостате. Процентрифугировать на вортексе для удаления капель с крышки пробирки.
6. Добавить к раствору **30 мкл раствора E**. Перемешать на вортексе процентрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
7. Добавить к раствору **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и процентрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
8. Добавить к раствору **100 мкл раствора B**. Перемешивать на вортексе 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым).
9. Поставить пробирки в холодильник (температура от 2 до 4 °С) на 10 мин.
10. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. В процессе центрифугирования раствор разделится на две фазы: нижнюю, содержащую белки и ДНК, и верхнюю – водную, содержащую РНК.
11. Отобрать новые пробирки на 1,5 мл, в которые необходимо внести **300 мкл раствора C**. Промаркировать пробирки. В пробирки с отрицательным и положительным контролем

экстракции (промаркированы **ОК** и **ПК**) внести по **10 мкл РНК 1 мкг/мкл**.

12. Аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно 400 мкл), используя наконечники с фильтром и перенести в пробирку с раствором С. Перемешать на вортексе и выдержать в морозильнике при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 ч.
13. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
14. Растворить осадок в **100 мкл раствора D**, добавить **100 мкл раствора С**, перемешать на вортексе. Выдержать в морозильнике при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 ч.
15. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
16. Осадок промыть в **800 мкл охлажденного при температуре плюс 2 до 8 °С раствора для отмывки 3**, перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 1 мл, не задевая осадка.
17. Добавить **150 мкл охлажденного раствора для отмывки 3**. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10 тыс g. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником на 200 мкл, не задевая осадка.
18. Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
19. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-элюента**. Растворить осадок РНК в пробирке, перемешивая элюат на вортексе. В случае высокой вязкости раствора увеличить объем элюента до 100 мкл. Прогреть пробирки в термостате в течение 5-7 мин.
20. Центрифугировать пробирки 2 мин при 10 тыс g. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР. **Раствор РНК хранить при температуре не выше минус 68 °С.**

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!  
Обратитесь к  
сопроводительной  
документации



Код партии



Максимальное  
число тестов



Изделие для in vitro  
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к  
руководству по  
эксплуатации



Ограничение  
температуры



Не допускать  
попадания  
солнечного света



Верхнее ограничение  
температуры



Дата  
изготовления



Производитель



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2012/12997

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® CCHFV-FL" по ТУ 9398-188-01897593-2011**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Производитель

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Место производства медицинского изделия

**см. приложение**

Номер регистрационного досье № РД-26132/11177 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1970  
допущено к обращению на территории Российской Федерации

**Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения**

**Д.Ю. Павлюков**

**0042605**



**ПРИЛОЖЕНИЕ  
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года № ФСР 2012/12997

Лист 1

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, ССНФV) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® ССНФV-FL" по ТУ 9398-188-01897593-2011:**

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-золь-В» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT;

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

*Handwritten mark*

Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков  
0054580

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 10.02.09 № 992-17/09

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального

государственного

учреждения

науки «Центральный научно-

исследовательский институт

эпидемиологии» Федеральной

службы по надзору в сфере защиты

прав потребителей и благополучия

человека

  
В.И. Покровский

«07» ноября 2008 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. в биологическом

материале и культурах микроорганизмов методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL»**

**Набор реагентов выпускается в двух вариантах.**

**Вариант FEP.**

**ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.**

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

**Форма 2** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

**Форма 3** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

**Форма 4** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

**ВНИМАНИЕ!** Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3** и **4** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

**Вариант FRT.**

**ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.**

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 2** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**ВНИМАНИЕ!** Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой **2** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

## СОСТАВ.

**Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50** (ТУ 9398-003-01897593-2006) – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

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

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК бактерий *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FER/FRT <i>Brucella</i> spp. раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Brucella</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

\* При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Вариант FER Форма 3: [REF] B10-50-R0,5-FER; [REF] H-0593-2-5 Форма 4: [REF] B10-50-R0,2-FER; [REF] H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: [REF] HK7-0591-1-2; Форма 2: [REF] R-B10; [REF] H-0592-1-2

<b>Реактив</b>	<b>Описание</b>	<b>Объем (мл)</b>	<b>Кол-во</b>
<b>ОКО</b>	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного	1,6	1 пробирка
<b>ВКО STI-704</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT –** комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК бактерий *Brucella* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

<b>Реактив</b>	<b>Описание</b>	<b>Объем (мл)</b>	<b>Кол-во</b>
<b>ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Brucella</i> spp.</b> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
<b>ПЦР-смесь-2-FL</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
<b>ПКО ДНК <i>Brucella</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
<b>ПКО STI</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
<b>ДНК-буфер</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

<b>Реактив</b>	<b>Описание</b>	<b>Объем (мл)</b>	<b>Кол-во</b>
<b>ОКО</b>	Прозрачная жидкость от соломенно-желтого до бесцветного	1,6	1 пробирка
<b>ВКО STI-704</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

## **НАЗНАЧЕНИЕ.**

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL»** предназначен для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. (*B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*) в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Рекомендуется ознакомиться с МУ 3.1.7.1189-03 «ПРОФИЛАКТИКА И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

БРУЦЕЛЛЕЗА ЛЮДЕЙ», утвержденными Главным государственным санитарным врачом РФ 30.01.2003.

Вариант FEP. Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведение ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала (ТУ 9398-003-01897593-2006) производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT. Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Форма комплектации 2 предназначена для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

## **ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.**

### **ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.**

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

**Для проведения анализа используется следующий материал:**

#### **Материал от людей:**

- цельная периферическая кровь забирается в пробирку с 3 % ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови.
- пунктат из лимфоузлов после взятия помещают в стерильную одноразовую пробирку со 100 мкл транспортной среды (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) или стерильного 0,9 % изотонического раствора натрия хлорида

(физиологического раствора).

- синовиальная жидкость помещают в стерильную одноразовую пробирку.

#### **Материал от животных:**

- кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови.
- молоко отбирают в объеме 10-20 мл в стерильную посуду.
- содержимое брюшной полости и желудка, селезенка, печень абортированного плода.
- плацента и плодовые оболочки от абортировавших животных.
- содержимое бурс, гигром.
- в случае убоя животных для исследования отбирают парные лимфатические узлы с обеих сторон туши целиком (парааортальные, надвыменные, паховые, тазовые) и кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка), от самцов с признаками орхита или эпидидимита отбирают семенники с придатками.

#### **Культуры микроорганизмов.**

- культуры в жидких средах использовать без предварительной подготовки.
- подозрительные на *Brucella* spp. колонии ресуспендировать в 0,5 мл физиологического раствора.

Хранить материал до проведения исследования можно в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, 1 мес при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

#### **Подготовка исследуемого материала.**

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов,

скальпелей), дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и наконечников с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т и утилизироваться в соответствии с вышеуказанными документами. Ступки, пестики и инструменты должны обрабатываться согласно СП 1.3. 1285–03.

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, синовиальной жидкости, пунктаты из лимфоузлов, содержимое бурс и гигром, культуры микроорганизмов используют для выделения ДНК без предварительной подготовки после стадии обеззараживания (см. раздел «**Обеззараживание материала**»).

Пробы паренхиматозных органов, семенников, плодовых оболочек, плаценты (каждую отдельно) размером 1x1x1см, а лимфатические узлы целиком, гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков добавляют равный объем стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Образовавшуюся смесь отстаивают при температуре от 20 до 25 °С в течение 5 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирки на 1,5 мл, проводят обеззараживание (см. раздел «**Обеззараживание материала**») и 0,1 мл используют для выделения ДНК. Нижнюю фазу вместе с пробиркой утилизируют в соответствии с требованиями СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Молоко в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора), обеззараживают (см. раздел «**Обеззараживание материала**») и центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости

и 0,1 мл суспензии используют для выделения ДНК.

### **ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА.**

Проводят согласно МУ 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

#### **Обработка мертиолятом натрия.**

1. В образцы биологического материала и культуры микроорганизмов (при необходимости после предварительной подготовки см. пункт **«Подготовка исследуемого материала»**) добавить 0,1 % натрия мертиолята (разведение 1:1000) до конечной концентрации 0,01 % (разведение 1:10000) и прогревают при температуре  $(56 \pm 1)$  °С в течение 30 мин. Далее в работе использовать по 100 мкл проб.
2. При работе с подозрительными культурами обработанные мертиолятом бактериальные культуры по 1 мл отдельными дозаторами перенести в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировать при 12000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удалить в емкость с дезинфицирующим раствором, осадок ресуспендировать в 100 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида и использовать далее в работе.
3. Лизирующий раствор из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
4. В каждую пробирку со 100 мкл обеззараженного исследуемого материала внести по 300 мкл лизирующего раствора и инкубировать в течение 15 мин при температуре 65 °С.

Дальнейшие исследования проб проводить как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «Выделение ДНК из проб».

### **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.**

1. **Необходимо строго соблюдать СП 1.3. 1285–03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп**

- патогенности (опасности)».
2. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
  3. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности».
  4. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
  5. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
  6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.**

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

### **ЗОНА 1.**

**Для выделения ДНК из исследуемого материала  
требуются:**

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс

- об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
4. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
  5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
  6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
  7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
  8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
  9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
  10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
  11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
  12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
  13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

## **ЗОНА 2.**

**Для проведения ПЦР-амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:**

**(с указанием фирм-производителей / поставщиков):**

1. **Вариант FEP:** амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный), для микропробирок 0,2 мл (например, «Gradient Palm Cyclor», «Corbett Research», Австралия или эквивалентный). Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия) или эквивалентный.
2. **Вариант FRT:** амплификатор «Rotor-Gene» 3000 или 6000 («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный.
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

5. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.**

### **ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.**

**(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).**

**Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.**

#### **Порядок работы.**

1. Подготовить **отрицательный контроль выделения ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора и 100 мкл ОК** – отрицательного контрольного образца.
2. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку с пробами (см. раздел «Обеззараживание материала»), включая **ОК**, по **10 мкл ВКО STI-704**.
3. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
4. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе

- на 5 мин.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  6. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  7. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
  8. Повторить отмывку раствором для отмывки 2, следуя п. 7, удалить надосадочную жидкость полностью.
  9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
  10. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
  11. Процентрифугировать пробирки при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

**Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.**

## **ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.**

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы - 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при температуре 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

### **Вариант FEP.**

Порядок работы.

#### **А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.**
3. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** на поверхность воска внести **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella* spp.** Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР.**

#### **Б. Проведение амплификации.**

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
  - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
  - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Brucella*.**

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

/ **VER** 07.11.08 /стр. 13 из 23

3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

**Таблица 1.**

**Программа амплификации ДНК *Brucella* spp.**

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):				Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Uno-2» («Biometra»), «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»)					
«GeneAmp PCR System 2400» («Applied Biosystems»), «Терцик» (точный алгоритм регулирования) («ДНК-технология»)				«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»)					
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		93 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	2 мин	1	93 °С	2 мин	1	95 °С	2 мин	1
2	95 °С	10 с	10	93 °С	10 с	10	95 °С	25 с	10
	65 °С	25 с		65 °С	25 с		65 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
3	95 °С	10 с	35	93 °С	10 с	35	95 °С	25 с	35
	56 °С	25 с		56 °С	25 с		56 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	25 с	
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение	

4. По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции.

**В. Детекция с помощью флуоресцентного ПЦР детектора «АЛА-1/4».**

**Установка параметров теста «Brucella».**

1. Запустить программу «ALA\_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать «Настройки» → «Тест».
3. Нажать кнопку «Новый» (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста «Brucella», нажать кнопку ОК.
5. В группе параметров «Каналы» отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX), в группе «ВКО» отметить канал, который используется для внутреннего контроля (FAM).

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

6. В полях «п-» и «п+» установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каналу для детекции специфической ДНК:  
HEX: «п-» = 2.5, «п+» = 3.0;  
В поле «ВКО/фон» задать пороговое значение отношения сигнала по каналу для детекции ВКО к фону:  
«ВКО/фон» = 2.5.
7. В группе параметров «Уровень фона» установить значения флуоресценции, допустимые для фоновых пробирок:  
FAM: = 100;  
HEX: = 50.
8. Ввести названия мишеней в блок параметров «Привязка каналов» и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу «Добавить», при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце «Привязка каналов» выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:  
Brucella= HEX
9. Блокировать функцию «Доверительный интервал», установив в поле «Доверительный интервал», значение 555 %.
10. Нажать кнопку «Сохранить».

### **Измерение флуоресцентного сигнала.**

1. Включить прибор и запустить программу «ALA\_1» на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать «Протокол» → «Создать новый» или «Открыть», чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора 36 x 0,5 или 48 x 0,2, ввести номер протокола, выбрать нужный тест («Brucella») в меню-вкладке «Тест» и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как «фон» (используя сочетание клавиш «Ctrl» и «F»). В качестве образцов, обозначенных

- «ФОН» использовать пробирки с образцами «ФОН».
5. Закрывать окно редактирования протокола, нажав на кнопку «Exit» в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
  6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью и запустить детекцию, выбрав в меню «Протокол» → «Детекция» или значок «Детекция по протоколу» на панели инструментов (вверху экрана).

### Учет результатов.

1. Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы «ALA\_1». Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:  
**«обнаружено»** – положительный результат;  
**«не обнаружено»** – отрицательный результат;  
**«сомнительно»** – результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);  
**«нд»** – недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).
2. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 2).

**Таблица 2.**

**Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат автоматической интерпретации	
		канал FAM	канал HEX
«OK»	Выделение ДНК	ВКО+	«Brucella - не обнаружено»
«К-»	ПЦР	ВКО-	«Brucella - нд»
«К+»	ПЦР	ВКО-	«Brucella – обнаружено»

3. Образцы, для которых получен результат «нд» (кроме К-), требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если повторно получен результат «нд», требуется повторить

анализ образца, начиная с этапа выделения. Для образца «К-» результат «нд» является нормой.

4. Образцы, для которых получен результат «**сомнительно**», требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными.
5. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
6. Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

## **Вариант FRT.**

### **Порядок работы.**

#### **А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Brucella spp.***

#### **Б. Проведение амплификации.**

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
  - а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
  - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Brucella***.
  - в) **положительный контроль (ВК+)** – в подготовленные для ПЦР пробирки внести **10 мкл ПКО STI**.

## **В. Программирование амплификатора:**

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с прибором «Rotor-Gene» 6000- программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Нажать кнопку «New»/«Новый» в основном меню программы.
2. В открывшемся окне выбрать меню «Advanced»/«Детальный мастер» и шаблон запуска эксперимента «Dual Labeled Probe»/«Hydrolysis probes»/«Флуоресцентные зонды (TaqMan)». Нажать кнопку «New»/«Новый».
3. Выбрать тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Поставить отметку в окне рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено».
4. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
5. Выбрать объем реакционной смеси: Reaction volume/Объем реакции – 25 мкл. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 должно быть активно (отмечено галочкой) окно «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». (Если галочка не стоит в окне по умолчанию, поставить ее с помощью мышки).
6. Нажать кнопку «Next»/«Далее».
7. В верхней части окна нажать кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля».
8. Задать следующие параметры эксперимента:
  1. Hold/Удерж. темп-ры 95 °C – 5 мин
  2. Cycling/Циклирование 95 °C – 10 с  
65 °C – 25 с  
72 °C -10 с  
Cycle repeats/Цикл повторить – 10 times/раз.
  3. Cycling2/Циклирование2 95 °C – 10 с  
56 °C – 25 с – Детекция  
72 °C -10 с

Cycle repeats/Цикл повторить – 35 times/раз.

4. Флюоресценцию измеряют при **56 °C** (во втором блоке циклирования) по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow**.
5. Нажать кнопку «ОК»/«Да».
9. В нижней части окна нажать кнопку «Calibrate»/«Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.». В открывшемся окне нажать кнопку «Calibrate Acquiring»/«Optimise Acquiring»/«Опт.детек-мых». Для обоих красителей нужно указать в графе **Min Reading/Миним. Сигнал** значение **5**, а в графе **Max Reading/Максим. Сигнал** значение **10**. В графе «Tube position/Позиция Пробирки» указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «*gain*»/«усиление сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью. Поставить галочкой бокс в строке «Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition»/«Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition»/«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Закрыть окно «Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала», нажав кнопку «**Close**»/«**Заккрыть**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».
10. Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Запустить амплификацию кнопкой «**Start run**»/«**Старт**».
11. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в карусели. Для этого надо использовать кнопку «**Edit samples**»/«**Правка образцов**» (в нижней правой части основного окна). Все пробы и контроли обозначить в меню **Samples/Образцы** как **Unknown/Образец**.

## **АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.**

### Анализ результатов амплификации ВКО.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green», «Show»/«Показать».

Вариант FEP Форма 3: **REF** B10-50-R0,5-FEP; **REF** H-0593-2-5 Форма 4: **REF** B10-50-R0,2-FEP; **REF** H-0594-2-2; Вариант FRT Форма 1: **REF** HK7-0591-1-2; Форма 2: **REF** R-B10; **REF** H-0592-1-2

2. Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale видна кнопка Log scale).
4. В меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню основного окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) 0 %.
6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» (в правой части окна) выставить Threshold/Порог = 0.1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct, которые должны быть не более 31 для исследуемых образцов и контролей.

#### Анализ результатов амплификации ДНК *Brucella*.

1. Нажать в меню кнопку «Analysis»/«Анализ», выбрать режим анализа «Quantitation»/«Количественный», нажать кнопку «Cycling A. JOE»/«Cycling A. Yellow», «Show»/«Показать».
2. Отменить автоматический выбор Threshold/Порог.
3. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale видна кнопка Log scale).
4. В меню основного окна (Quantitation analysis/Количественный анализ) должна быть нажата кнопка «Dynamic tube»/«Динамич.фон».
5. В меню основного окна «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» установить значение NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) 10 %.
6. В меню «СТ Calculation»/«Вычисление СТ» выставить Threshold/Порог = 0.1.
7. В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

## УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

**Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 3).**

Таблица 3.

### Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
OK	Выделение ДНК	< 31	Нет значений
К-	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	Нет значений	< 33
ВК+	ПЦР	< 31	Нет значений

- Образец считают положительным**, если значение Ct на канале JOE/Yellow менее 33.
- Образец считают отрицательным**, если по каналу JOE/Yellow для него значение Ct отсутствует, а по каналу FAM/Green для него определено значение Ct, не превышающее 31.

#### Результаты не подлежат учету:

- Отсутствие положительного сигнала в пробах с положительными контролями ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.
- Если значение Ct на канале JOE/Yellow больше 33, а значение Ct по каналу FAM/Green не превышает 31, требуется повторить ПЦР и считать его положительным в случае повторения результата или получения значения Ct на канале JOE/Yellow менее 33.

3. Образцы, для которых отсутствует значение Ct как по каналу JOE/Yellow, так и по каналу FAM/Green, или получено значение Ct по каналу FAM/Green более 31 требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае, если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.
4. Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля (на канале JOE/Yellow) и для отрицательного контроля ПЦР (ДНК-буфер) (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

### **ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.**

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

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

**Срок годности.** 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

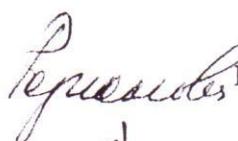
**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.-FL*» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: [products@pcr.ru](mailto:products@pcr.ru)).

Руководитель Производства  
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

 Родионова Е.Н.

Директор ФГУЗ Российского научно-исследовательского  
противочумного института «Микроб»  
Роспотребнадзора

 Кутырев В.В.

Руководитель приемочных технических  
и медицинских испытаний  
Зав. лабораторией препаратов против чумы  
и других особо опасных инфекций  
ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора

 Саяпина Л.В.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2009/04212

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL" по ТУ 9398-059-01897593-2008**

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Производитель

**Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А**

Место производства медицинского изделия

**см. приложение**

Номер регистрационного досье № РД-26122/11208 от 01.03.2019

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 21.20.23.110

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 13 марта 2019 года № 1992  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения**



**Д.Ю. Павлюков**

**0042653**

**ПРИЛОЖЕНИЕ  
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ  
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**

от 13 марта 2019 года

№ ФСР 2009/04212

Лист 1

На медицинское изделие

**Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL" по ТУ 9398-059-01897593-2008:**

Вариант FER выпускается в четырех формах комплектации:

- Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,5 мл);
- Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,2 мл);
- Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,5 мл);
- Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,2 мл);
- Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Вариант FRT выпускается в двух формах комплектации:

- Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT;
- Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT;
- Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Место производства:

1. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А.
2. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6.

Заместитель руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



Д.Ю. Павлюков

0054910



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

## РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

№ ФСР 2010/07097

от 18 ноября 2011 года

Настоящее регистрационное удостоверение выдано  
Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А  
и подтверждает, что медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» по ТУ 9398-060-01897593-2009

производства

Федеральное бюджетное учреждение науки "Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора), Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А  
место производства

111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А

класс потенциального риска 3

ОКП 93 9816

вид медицинского изделия –

соответствующее регистрационному досье № 33000 от 17.08.2011

приказом Росздравнадзора от 18 ноября 2011 года № 7518-Пр/11  
и приказом от 18 сентября 2013 года № 5072-Пр/13 о замене  
допущено к обращению на территории Российской Федерации.  
Приложение: на 1 листе

Врио руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0003673

**ПРИЛОЖЕНИЕ**  
**К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ**  
**НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**  
**№ ФСР 2010/07097**

Лист 1

Вариант FEP выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50,  
«ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50,  
«ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP  
(пробирки 0,5 мл);

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP  
(пробирки 0,2 мл);

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным  
реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Вариант FRT выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50,  
«ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант  
скрин-титр-FRT;

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

И

Приказом от 18 сентября 2013 года № 5072-Пр/13 о замене допущено к обращению  
на территории Российской Федерации

Врио руководителя Федеральной службы  
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

18 ноября 2011 года

0003181

«УТВЕРЖДАЮ»

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

А.В. Горелов

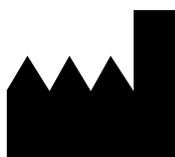
«15» мая 2019 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом  
материале и объектах окружающей среды методом  
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-  
флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL»**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ .....	2
СОСТАВ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	5
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	6
ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	11
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА .....	13
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.....	16
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	18
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР- АМПЛИФИКАЦИИ .....	20
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	24
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	27
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	28

## ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

### Набор реагентов выпускается в двух вариантах

#### Вариант FEP

Для ПЦР-амплификации используется амплификатор, например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия); «Gradient Palm Cyclor» («Corbett Research», Австралия). Для детекции используется флуоресцентный ПЦР-детектор «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия).

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

**Форма 2** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

**Форма 3** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

**Форма 4** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

**ВНИМАНИЕ!** Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3** и **4** гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## **Вариант FRT**

Для ПЦР-анализа используется амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия).

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT;

**Форма 2** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT.

**ВНИМАНИЕ!** Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой 2 гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## **СОСТАВ**

**Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50** – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>1</sup>	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>1</sup>	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

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

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Legionella pneumophila* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» **включает:**

<sup>1</sup> При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

<b>Реактив</b>	<b>Описание</b>	<b>Объем</b>	<b>Кол-во</b>
<b>ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Legionella pneumophila</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
<b>ПЦР-смесь-2-FL</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
<b>ПЦР-смесь-Фон</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
<b>Минеральное масло для ПЦР</b>	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
<b>LS3</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
<b>ДНК-буфер</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

<b>Реактив</b>	<b>Описание</b>	<b>Объем</b>	<b>Кол-во</b>
<b>ОКО</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	2 пробирки
<b>ВКО STI-338</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
<b>ПКО ДНК <i>Legionella pneumophila</i></b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT** – комплект реагентов для ПЦР-амплификации и количественного определения ДНК *Legionella pneumophila* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив		Описание	Объем	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Legionella pneumophila</i>		Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	70 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL		Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	LS1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
	LS2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
	LS3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 70 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив		Описание	Объем	Кол-во
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	2 пробирки
ВКО STI-338		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Legionella pneumophila</i>		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя программное обеспечение в формате Microsoft® Excel для автоматической обработки результатов.

## НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL», предназначенный для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Набор реагентов позволяет обнаруживать ДНК *Legionella pneumophila* в концентрации  $1 \times 10^3$  копий/мл тестируемого биологического материала и концентратов воды.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

**Метод качественного выявления ДНК *Legionella pneumophila* в клиническом материале** основан на одновременной амплификации участка ДНК гена *mir Legionella pneumophila* и участка гена протромбина человека (эндогенный внутренний контроль). Результат амплификации ДНК *Legionella pneumophila* регистрируется по каналу флуоресценции JOE/Yellow/HEX, результат амплификации ДНК внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток в образце (не менее  $10^3$  геномов), учитывая, что искомый возбудитель является внутриклеточным патогеном. Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (выделение ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. В случаях, если в образце присутствует недостаточное количество клеток, сигнал гена протромбина будет слабым или совсем отсутствовать.

**Метод качественного выявления ДНК *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды** основан на одновременной амплификации участка ДНК гена *mir Legionella pneumophila* и участка ДНК неконкурентного внутреннего контроля (ВКО STI-338). Результат амплификации ДНК *Legionella pneumophila* регистрируется по каналу флуоресценции JOE/Yellow/HEX, результат амплификации ДНК внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM/Green.

**Метод количественного выявления ДНК *Legionella pneumophila* в воде (при использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант скрин-титр-FRT)** основан на одновременной амплификации в режиме «реального времени» участка ДНК гена *mir Legionella pneumophila* и участка ДНК неконкурентного количественно охарактеризованного и стандартизованного внутреннего контрольного образца (ВКО STI-338). Результат амплификации ДНК *Legionella pneumophila* регистрируется по каналу флуоресценции JOE/Yellow, результат амплификации

ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО STI-338) регистрируется по каналу FAM/Green.

Для определения количества копий ДНК *Legionella pneumophila* и ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО STI-338) в реакционной пробирке используются количественно охарактеризованные калибраторы.

Учет потерь ДНК внутреннего контрольного образца позволяет рассчитать реальную концентрацию ДНК *Legionella pneumophila* в каждом исследуемом образце воды.

При выполнении расчетов **учитывается степень концентрирования воды**, в связи с этим **предварительную подготовку воды проводить строго по инструкции** к данному набору реагентов.

Расчет концентрации ДНК *Legionella pneumophila* ( $C_{\text{днк Lp}}$ ) в 1 л воды проводится по формуле:

$C_{\text{днк Lp}}$  (копий / л) =  $K_{\text{днк Lp}} / K_{\text{ВКО STI-338}} * C_{\text{ВКО STI-338}} * 2$ , где  
 $C_{\text{днк Lp}}$  (копий / л) = Количество копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 л образца воды,  
 $K_{\text{днк Lp}}$  (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 мл тестируемой пробы,  
 $K_{\text{ВКО STI-338}}$  (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК ВКО STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца в тестируемой пробе,  
 $C_{\text{ВКО STI-338}}$  (копий / мл) = Количество копий ДНК ВКО STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца (значение указано во вкладыше к набору реагентов),  
2 – коэффициент пересчёта, учитывающий изменение объёмов при фильтрации.

**ВНИМАНИЕ!** Для проведения количественного исследования каждый образец воды необходимо тестировать в двух повторах (начиная с этапа экстракции ДНК), при этом результат выдаётся как среднее из двух полученных значений.

## **ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

**Для проведения анализа используется следующий материал**

### **Клинический материал:**

- Мокрота (индуцированная мокрота) или аспират из трахеи в одноразовых контейнерах после предварительной подготовки;
- Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки (в «Транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011)) без предварительной подготовки;
- Промывные воды бронхов (бронхоальвеолярный лаваж) в одноразовых контейнерах после предварительной подготовки;
- Секционный материал (фрагменты пораженной части легких) после предварительной подготовки.

### **Взятие материала со слизистой носоглотки.**

Исследуемый материал из носоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков (либо стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0 (состав:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 3,2 г,  $KH_2PO_4$  – 1,4 г, вода дистиллированная – 1 л)). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, и используют 50 мкл содержимого для последующего анализа.

### Взятие материала со слизистой ротоглотки.

Исследуемый материал из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки после предварительного полоскания полости рта водой.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков (либо стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0). Конец зонда отламывают или отрезают, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, и используют 50 мкл содержимого для последующего анализа.

**ВНИМАНИЕ!** Рекомендуется совмещать исследуемый материал из носоглотки и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мазки со слизистой носоглотки и ротоглотки используются для исследования при легионеллезной инфекции, протекающей в форме ОРЗ (лихорадка Понтиак).

**Культуры микроорганизмов**, подозрительные на *Legionella* spp:

– Колонии ресуспендировать в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном-буфере, pH 7,0. Центрифугируют при 12000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором, осадок ресуспендируют в 50 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида. Для исследования используют 50 мкл суспензии.

Допускается **хранение** вышеперечисленного **материала** до проведения исследования **в течение 1 сут** при температуре **от 2 до 8 °С**, **1 мес** при температуре **не выше минус 16 °С**. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное

замораживание-оттаивание материала.

### **Объекты окружающей среды:**

Отбор проб осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб» и ГОСТ Р 51593-2000 «Вода питьевая. Отбор проб»; МУК 4.2.1018-01 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды»; МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов», **МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды».**

- **Вода** (сточная, из водоема, питьевая) в объеме 0,5 л после предварительной подготовки;
- **Смывы с объектов окружающей среды** берут зондами с тампонами, смоченными стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, остальную часть зонда отламывают и удаляют. Для исследования используется 50 мкл раствора;
- **Соскобы биопленок** с внутренней поверхности водопроводного, промышленного и иного оборудования (например, из поддонов внутри кондиционеров). Соскобы влажных биопленок с поверхности, находящейся под водой или на границе соприкосновения воды и воздуха, берут сухим стерильным зондом (рабочая часть зонда с тампоном помещается в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, остальная часть зонда отламывается и удаляется). Для исследования используется 50 мкл раствора. Соскобы биопленок с высохшей поверхности берут тампонами, смоченными стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Рабочая часть зонда с тампоном помещается в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, остальная часть зонда отламывается и удаляется. Для исследования используется 50 мкл раствора;

– **Почва** в количестве 100 г берётся в местах предполагаемого обсеменения и используется после предварительной подготовки.

Допускается **хранение** вышеперечисленного **материала** до проведения исследования **в течение 1 нед** при температуре не выше плюс 20 °С, **1 мес** при температуре **не выше минус 16 °С**. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала. Температурный режим транспортирования не ограничен.

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием стерильных ступок, пестиков, инструментов (ножниц, пинцетов, скальпелей), дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл и наконечников с фильтром. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т, и утилизироваться в соответствии с вышеуказанными документами.

**Промывные воды бронхов (бронхоальвеолярный лаваж).** Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 100 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (50 мкл) используют для последующей работы.

**Мокрота.** Дополнительно требуется реагент «Муколизин» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Сбор и предобработка материала выполняется по инструкции к реагенту «Муколизин». Подготовленную мокроту (50 мкл) используют для последующей работы. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают при температуре **не выше минус 16 °С**.

**Секционный материал** гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,0. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и позволяют отстояться осадку в течение 1-3 мин. Надосадочную жидкость (50 мкл) используют для последующей работы. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают при температуре **не выше минус 16 °С**.

Подготовка проб объектов окружающей среды проводится согласно **МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды»**.

#### **Подготовка образцов воды:**

Воду (0,5 л) предварительно фильтруют с помощью стеклянной воронки через бумажный фильтр. После предварительной фильтрации воду пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. После окончания фильтрации мембранный фильтр измельчают стерильными (обожжёнными в пламени горелки) ножницами (в одноразовую чашку Петри) и помещают стерильным (обожжённым в пламени горелки) пинцетом в пробирки объемом 1,5 мл с 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирку инкубируют при комнатной температуре в течение 15-20 мин, периодически перемешивая на вортексе, чтобы обеспечить переход микрофлоры в раствор. Раствор (50 мкл) используют для последующей работы. Фильтрат хранят при температуре **от 2 до 8 °С в течение 1 нед**. При необходимости более длительного хранения фильтрат замораживают при температуре **не выше минус 16 °С**.

#### **Подготовка проб почвы:**

В пробирки на 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой отдельным шпателем (или одноразовыми лопатками) внести по 0,4–1,0 г (около 1,0 мл) земли. В каждую пробирку внести по 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают и декантируют 5 мин. Надосадочная жидкость (50 мкл) используется для последующей работы.

## **ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА**

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

1. Лизирующий раствор из комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. К 50 мкл подготовленных образцов (см. раздел «Подготовка исследуемого материала») добавляют 50 мкл ОКО (отрицательного контрольного образца), тщательно перемешивают и добавляют в них отдельным наконечником 300 мкл лизирующего раствора, прогревают при температуре (65±1) °С в течение 15 мин.

Дальнейшие исследования проб проводить как с обеззараженным материалом по порядку процедур, описанных в разделе «Выделение ДНК из исследуемого материала».

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ**

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

2. Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
3. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
4. Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
5. Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку<sup>2</sup>, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»

**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.

6. Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>3</sup>. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских ОТХОДОВ.

---

<sup>2</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

<sup>3</sup> Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

7. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
8. Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
9. Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
10. К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
11. Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
12. Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
13. Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
14. 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.
15. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
16. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
17. Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «ДНК-сорб-В»).

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

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «ДНК-сорб-В»).

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА**

**(с указанием фирм изготовителей/поставщиков):**

### **ЗОНА 1**

**Для выделения ДНК из исследуемого материала  
требуются:**

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
4. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г.

- Ульяновск, Россия).
5. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
  6. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
  7. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
  8. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
  9. Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
  10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
  11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
  12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
  13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

## **ЗОНА 2**

**Для проведения ПЦР-амплификации и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:**

**(с указанием фирм изготовителей / поставщиков):**

**Вариант FEP:** амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный); для микропробирок 0,2 мл (например, «Gradient Palm Cycler», «Corbett Research», Австралия или эквивалентный). Флуоресцентный ПЦР-детектор, например, «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентный.

**Вариант FRT:** амплификатор роторного типа, например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия) или эквивалентный.

1. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Для приборов для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»).

Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок.

Для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл («Gradient Palm Cyclor», «GeneAmp PCR System 2700» и др.). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Ахуген», США).

Для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.). Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл (плоская крышка, нестрипованные) (например, «Ахуген», США).

3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 (0,5) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость с дезинфицирующим раствором.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА**

**ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**  
(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала)

### **Порядок работы**

1. Подготовить пробирку **отрицательный контроль выделения ДНК (ОК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести **300 мкл лизирующего раствора и 100 мкл ОК** и **10 мкл ВКО STI-338**.
2. Подготовить пробирку **положительный контроль выделения ДНК (ПК)**. В пробирку объемом 1,5 мл внести

**300 мкл лизирующего раствора, 50 мкл ОКО, 10 мкл ВКО STI-338 и 50 мкл ПКО ДНК *Legionella pneumophila*.**

3. В подготовленные пробы из объектов окружающей среды и культур микроорганизмов (см. раздел «Обеззараживание материала») отдельными наконечниками с фильтром внести по **10 мкл ВКО-STI-338**. В подготовленные пробы клинического материала (см. раздел «Обеззараживание материала») реагент ВКО не добавлять. Промаркировать пробирки. Перемешивают содержимое микропробирок на вортексе и центрифугируют при 2000-3000 об/мин, чтобы удалить капли с крышек микропробирок.
4. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал) то необходимо процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.
5. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**,

перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировать 30 с при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Повторить отмывку еще раз, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.
10. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
11. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
12. Центрифугировать пробирки при 8-10 тыс об/мин (10-13 тыс об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

**Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.**

## **ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ**

**(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации)**

**Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы - 10 мкл.**

**ВНИМАНИЕ!** Перед работой необходимо ознакомиться с инструкциями к соответствующим приборам и «Методическими Рекомендациями по применению набора реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL», утвержденные директором ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора».

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

## Вариант FEP

### Порядок работы

#### А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Legionella pneumophila* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

**ВНИМАНИЕ! Выбор пробирок для амплификации зависит от используемых приборов:**

– пробирки объемом **0,2 мл** для амплификаторов «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «Uno-2» («Biometra»).

– пробирки объемом **0,5 мл** для амплификаторов «Терцик» («ДНК-Технология»), «Uno-2» («Biometra»).

2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Legionella pneumophila*.

3. Сверху добавить по капле **минерального масла для ПЦР<sup>4</sup>** (примерно 25 мкл).

4. Приготовить 2 контрольных образца «Фон». Для этого в две пробирки с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Legionella pneumophila*** на поверхность воска внести **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Legionella pneumophila*. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР**.

#### Б. Проведение амплификации

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести отдельными наконечниками с фильтром по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа

---

<sup>4</sup> При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло для ПЦР можно не применять.

выделения ДНК.

2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
  - а) **отрицательный контроль (К-)** – в подготовленную для ПЦР пробирку внести **10 мкл ДНК-буфера**.
  - б) **положительный контроль (К+)** – в подготовленную для ПЦР пробирку внести **10 мкл LS3**.
3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1).  
Программы амплификации для приборов разных изготовителей см. также в «Методических Рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL», утвержденными директором ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», в которых уточняются параметры программирования соответствующего амплификатора и проведения детекции с использованием программного обеспечения флуоресцентного ПЦР-детектора.
4. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

**Таблица 1**

**Программа амплификации ДНК *Legionella pneumophila***

Амплификатор с активным регулированием (по раствору в пробирке) <sup>5</sup>			
цикл	температура, °С	время	циклы
0	95	пауза	
1	95	2 мин	1
2	95	10 с	10
	60	20 с	
	72	10 с	
3	95	10 с	35
	56	20 с	
	72	10 с	
4	10	хранение	

<sup>5</sup> Например, «Терцик» («ДНК-Технология»).

## Вариант FRT

### Порядок работы

#### **А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Legionella pneumophila*** для амплификации ДНК исследуемых, контрольных проб и калибраторов.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Legionella pneumophila*.

#### **Б. Проведение амплификации**

1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.

2. Поставить **контрольные реакции амплификации:**

**При проведении качественного анализа:**

**а) отрицательный контроль (К-) –** в подготовленную для ПЦР пробирку внести **10 мкл ДНК-буфера**.

**б) положительный контроль (К+) –** в подготовленную для ПЦР пробирку внести **10 мкл LS3**.

**При проведении количественного анализа:**

**а) отрицательный контроль (К-) –** в подготовленную для ПЦР пробирку внести **10 мкл ДНК-буфера**.

**б) калибраторы –** в подготовленные для ПЦР три пробирки внести по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора (**LS1, LS2** или **LS3**).

3. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 2).

**Программирование амплификатора** см. также в «Методических Рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора».

Таблица 2

Программа амплификации для приборов роторного типа<sup>6</sup>

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	–	1
2	95	10 с	–	10
	60	20 с	–	
	72	10 с	–	
3	95	10 с	–	35
	56	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты интерпретируются в соответствии с «Методическими Рекомендациями по применению набора реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора».

**Качественный анализ (вариант FEP)**

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала в исследуемых образцах относительно уровня сигнала в образцах «фон». Интерпретация происходит автоматически с помощью программного обеспечения используемого флуоресцентного ПЦР-детектора. Для интерпретации результата по каждому каналу детекции используются установленные пороговые значения. Детекция ДНК *Legionella pneumophila* проводится по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора). Детекция ДНК ВКО проводится по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора). Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей выделения ДНК и амплификации.

<sup>6</sup> Например, «Rotor-Gene» 3000 и «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия).

Образцы, для которых получен отрицательный результат по всем каналам (кроме К-), требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае если данный результат получен повторно, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения. Для образца «К-» отрицательный результат по всем каналам является нормой.

Образцы, для которых ВКО положительный, а значения специфического сигнала лежат в диапазоне значений выше отрицательного порога, но не превышают положительного порога для данного канала, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае повторения аналогичного результата образцы считать положительными. При получении при повторной постановке отрицательного результата образец считать сомнительным и рекомендовать повторный забор материала для анализа.

Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.

Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

### **Качественный анализ (вариант FRT)**

Полученные результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла ( $C_t$ ) в соответствующей графе в таблице результатов).

Детекция ДНК *Legionella pneumophila* проводится по каналу Yellow (JOE или аналогичному, в зависимости от модели прибора). Детекция ДНК ВКО проводится по каналу Green (FAM или аналогичному, в зависимости от модели прибора).

Результат считается достоверным только в случае

прохождения положительных и отрицательных контролей выделения ДНК и амплификации. Результаты анализа не подлежат учету, если в таблице результатов для отрицательного контроля выделения на канале Yellow и для отрицательного контроля ПЦР на любом из каналов появляется любое значение (Ct), что свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

### Количественный анализ (вариант FRT)

При проведении количественного анализа используют значения концентраций калибраторов ДНК *Legionella pneumophila* и калибраторов ДНК ВКО-STI-338 указанные во вкладыше к набору реагентов. Расчет количества копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 мл тестируемой пробы проводится автоматически программой прибора по заданным значениям калибраторов, и полученное значение появляется в соответствующей графе в таблице результатов.

Расчет концентрации ДНК *Legionella pneumophila* в 1 л воды ( $C_{\text{днк Лр}}$  (копий / л)) проводят вручную или с использованием программного обеспечения, прилагающегося к комплекту реагентов, по следующей формуле:

$C_{\text{днк Лр}}$  (копий / л) =  $K_{\text{днк Лр}} / K_{\text{вко-сти-338}} * C_{\text{вко-сти-338}} * 2$ , где

$K_{\text{днк Лр}}$  (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 мл тестируемой пробы,

$K_{\text{вко-сти-338}}$  (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца в тестируемой пробе,

$C_{\text{вко-сти-338}}$  (копий / мл) = Количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца (значение указано во вкладыше к набору реагентов),

2 – коэффициент пересчёта.

Количественный анализ является достоверным, если полученное значение расчетной концентрации контрольной пробы «ПК» *Legionella pneumophila*, укладывается в пределы диапазона заданного во вкладыше к набору реагентов.

Результаты анализа образца являются недействительными, если количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл тестируемой пробы, ниже среднего значения концентрации ДНК препарата ВКО-STI-338, указанного во вкладыше к набору реагентов, более чем в 5 раз. Это свидетельствует о низкой эффективности выделения ДНК из данного образца или о неэффективной очистке от ингибиторов – необходимо протестировать образец повторно, начиная с этапа выделения ДНК.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

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

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: [cs@pcr.ru](mailto:cs@pcr.ru)<sup>7</sup>.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач  
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

<sup>7</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).



Management Systems Certification Body  
Institut pro testování a certifikaci, a.s.  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic  
[www.itczlin.cz](http://www.itczlin.cz)

# CERTIFICATE

No. 18 0028 SJ

We confirm on the basis of a performed audit that company

**Federal Budget Institute of Science “Central  
Research Institute for Epidemiology“**

3a, Novogireevskaya str., 111123 Moscow, Russian Federation

has implemented and documented a functional quality management system  
in compliance with the requirements of the standard

**EN ISO 13485:2016**

Covering the following activities:

Design and development, manufacturing and final control of *in vitro* diagnostic  
medical devices

The Certificate is issued on the basis of the results mentioned in Audit Report No. 233404641/2018.  
The Certificate validity is conditioned by positive results of surveillance audits, which the certified  
company committed to undergo.

During use of the Certificate the Certificate Holder undertakes to follow the Rules of Use of the Certificate. This  
document is publicly available on [www.itczlin.cz](http://www.itczlin.cz)



Date of Issue: 07. 05. 2018

Valid until: 07. 05. 2021

Date of the first certification awarding: 20. 05. 2015

Ing. Pavel Vaněk  
Head of Certification Body



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

## EC Certificate - Full Quality Assurance System No. 11 0040 QS/NB

The quality system of manufacturer

### **Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”**

3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

has been certified as meeting the requirements of

### **Directive 98/79/EC**

**on in vitro diagnostic medical devices, Annex IV excluding (4, 6)**

for the following product category(ies):

### **AmpliSens® PCR kits**

The Notified Body No. 1023 declares that the aforementioned manufacturer has implemented a quality assurance system for design, manufacture and final inspection of the respective devices / device categories in accordance with IVDD Annex IV. This quality assurance system conforms to the requirements of this Directive and is subjected to periodical surveillance. For placing on the market of List A devices covered by this certificate, an EC Design-Examination Certificate according to Annex IV (Section 4) is required.

**Valid from:** 2018-10-31  
**Valid until:** 2021-06-16  
**First Issued:** 2011-01-24  
**Revision:** h



Date: 2018-10-31

Mgr. Jiří Heš  
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

## Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**

**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

### Product(s):

**Name:** AmpliSens® Rubella virus-FRT PCR kit

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT-50 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 30793

**Name:** AmpliSens® Toxoplasma gondii-FRT PCR kit

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT-50 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 52428

**Name:** AmpliSens® CMV-FEP PCR kit

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5-ml tubes), variant FEP (0.2-ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 30798

**Name:** AmpliSens® CMV-FRT PCR kit

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 30798

Date: 2018-10-31

Revision: h



Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name:** **AmpliSens® HSV / CMV-MULTIPRIME-FEP  
PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5-ml tubes), variant FEP (0.2-ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 61348

**Name:** **AmpliSens® HSV / CMV-MULTIPRIME-FRT  
PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 61348

**Name:** **AmpliSens® CMV-screen/monitor-FRT PCR  
kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 30798

Date: 2018-10-31

Revision: h



Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute  
for Epidemiology”**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name: AmpliSens® EBV / CMV / HHV6-screen-FRT  
PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 61348

**Name: AmpliSens® Chlamydia trachomatis-FEP  
PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5-ml tubes), variant FEP (0.2-ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 30677

**Name: AmpliSens® Chlamydia trachomatis-FRT  
PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 30677



Date: 2018-10-31  
Revision: h

Mgr. Jiří Heš  
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma-  
MULTIPRIME-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / M.genitalium  
MULTIPRIME-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma /  
M.genitalium-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409



Date: 2018-10-31

Revision: h

Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute  
for Epidemiology”**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma /  
M.genitalium-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma / M.  
hominis-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma /  
M.hominis-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409



Date: 2018-10-31  
Revision: h

Mgr. Jiří Heš  
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name:** **AmpliSens® C.trachomatis / Ureaplasma /  
M.genitalium / M.hominis-MULTIPRIME-FRT  
PCR kit**

**Trade name(s):** -  
**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F  
**Classification:** List B  
**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® N.gonorrhoeae / C.trachomatis /  
M.genitalium / T.vaginalis-MULTIPRIME-FRT  
PCR kit**

**Trade name(s):** -  
**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F  
**Classification:** List B  
**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® N.gonorrhoeae / C.trachomatis /  
M.genitalium-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -  
**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)  
**Classification:** List B  
**GMDN:** 50409

Date: 2018-10-31  
Revision: h



Mgr. Jiří Heš  
Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name:** **AmpliSens® N.gonorrhoeae / C.trachomatis /  
M.genitalium-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 50409

**Name:** **AmpliSens® Genoscreen HLA B\*5701-FRT  
PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT

**Classification:** List B

**GMDN:** 56403

**Name:** **AmpliSens® Mycoplasma pneumoniae /  
Chlamydomphila pneumoniae-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 58957

Date: 2018-10-31

Revision: h



Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

## Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB

issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**

**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Name: AmpliSens® Mycoplasma pneumoniae /  
Chlamydomydia pneumoniae-FRT PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 58957

**Name: AmpliSens® T.vaginalis / N.gonorrhoeae /  
C.trachomatis-MULTIPRIME-FEP PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FEP (0.5 ml tubes), variant FEP (0.2 ml tubes)

**Classification:** List B

**GMDN:** 61144

**Name: AmpliSens® T.vaginalis / N.gonorrhoeae /  
C.trachomatis-MULTIPRIME-FRT PCR kit**

**Trade name(s):** -

**Model(s):** variant FRT, variant FRT-100 F

**Classification:** List B

**GMDN:** 61144

Date: 2018-10-31

Revision: h



Mgr. Jiří Heš

Representative of the Notified Body No. 1023



Notified Body 1023  
**INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.**,  
třída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

**Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB**  
issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute  
for Epidemiology”**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

**Facility(ies):**

Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”  
3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia



Date: 2018-10-31  
Revision: h

**Mgr. Jiří Heš**  
Representative of the Notified Body No. 1023



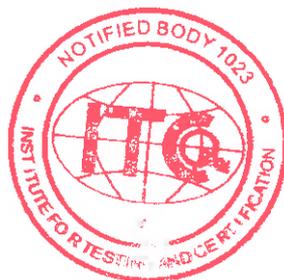
Notified Body 1023  
INSTITUTE FOR TESTING AND CERTIFICATION, Inc.,  
trída Tomáše Bati 299, Louky, 763 02 Zlín, Czech Republic

## Annex to EC Certificate No. 11 0040 QS/NB issued for manufacturer:

**Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute  
for Epidemiology"**  
**3A Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia**

### Certificate History:

Revision	Date	Reference Number	Action
	2011-01-24	813600111	Certification
a	2011-07-21	813600161	Change of manufacturer name
b	2012-02-13	343601304	Product scope extension
c	2014-05-13	343602568	Product scope extension
d	2016-01-15	813600504a	Prolongation of certificate validity
e	2016-06-17	813600504	Re-certification process
f	2016-08-29	343603690	Change of manufacturer facility address
g	2017-11-30	343603888	Changes of product compositions, packaging and quality system documentation
h	2018-10-31	813600754	Change of product labelling, shelf life extension and quality system documentation



Date: 2018-10-31  
Revision: h

Mgr. Jiří Heš  
Representative of the Notified Body No. 1023

FEDERAL SERVICE FOR SUPERVISION OF CONSUMER RIGHTS PROTECTION AND HUMAN WELFARE

FEDERAL BUDGET INSTITUTE OF SCIENCE  
«CENTRAL RESEARCH INSTITUTE FOR EPIDEMIOLOGY»

111123, Moscow, 3A Novogireevskaya street, Tel.: +7 495 974 96 42, Fax: +7 495 305 54 23,  
e-mail: obtk@pcr.ru



**EC DECLARATION OF CONFORMITY**

Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27<sup>th</sup> of October 1998 on  
*In Vitro* Diagnostic Medical Devices

Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology” hereby under own responsibility declares that the products covered by the declaration conform with Essential Requirements listed in Annex I of EC Directive 98/79/EC (IVD Directive). Supporting documentation is retained under the premises of the manufacturer.

The quality management system meets the requirements of the standard EN ISO 13485 “Medical devices – Quality management systems – Requirements for regulatory purposes” and is certified by Institute for testing and certification, Inc. (certificate No. 15 0125 SJ/a, valid until 2018.05.20).

<b>Manufacturer:</b>	Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”
<b>Authorized Representative:</b>	Ecoli s.r.o. Studenohorska 12 841 03 Bratislava 47 Slovak Republic tel.: (+421) 02/64 789 336 fax: (+421) 02/64 789 040 email: ecoli@ecoli.sk
<b>Product Name:</b>	Annex for this Declaration
<b>Description:</b>	Reagent kits for qualitative detection and quantification of DNA (RNA) of different infectious agents or HLA B*5701 DNA in human specimens
<b>Classification:</b>	Article 9, paragraph 3 of EC Council Directive 98/79/EC on <i>in Vitro</i> Diagnostic Devices Annex II List B IVDs (According to EC Declaration of Conformity List)
<b>Conformity Assessment Route:</b>	Annex IV (IVDD) Full QA System
<b>Notified Body:</b>	Institute for testing and certification, Inc. třída Tomáše Bati 299 Louky, 763 02 Zlin, Czech Republic e-mail: itc@itczlin.cz Notified Body No. 1023
<b>EC Certificate:</b>	No. 11 0040 QS/NB revision g, valid until 2021.06.16
<b>Place, Date of Issue:</b>	Zlin, Czech Republic, 2017.11.30

Signed \_\_\_\_\_



Valid from 2018.01.26  
Valid until 2021.06.16

Full name: Vasiliy G. Akimkin  
Title: Interim Director

№№	Description	Product Code
1.	AmpliSens® <i>Rubella virus</i> -FRT PCR kit	R-V24-S(RG,iQ,Mx)-CE
2.	AmpliSens® <i>Toxoplasma gondii</i> -FRT PCR kit	R-P1(RG,iQ,Mx)-CE
3.	AmpliSens® CMV-FEP PCR kit	V7-100-R0,2-FEP-CE V7-100-R0,5-FEP-CE
4.	AmpliSens® CMV-FRT PCR kit	R-V7(RG)-CE R-V7-F(RG,iQ)-CE
5.	AmpliSens® HSV / CMV-MULTIPRIME-FEP PCR kit	V60-100-R0,5-FEP-CE V60-100-R0,2-FEP-CE
6.	AmpliSens® HSV / CMV-MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-V60(RG)-CE R-V60-F(RG,iQ)-CE
7.	AmpliSens® CMV-screen/monitor-FRT PCR kit	R-V7-100-S(RG,iQ,Mx)-CE
8.	AmpliSens® EBV / CMV / HHV6-screen-FRT PCR kit	R-V48(RG,iQ,Mx)-CE
9.	AmpliSens® <i>Chlamydia trachomatis</i> -FEP PCR kit	B1-100-R0,2-FEP-CE B1-100-R0,5-FEP-CE
10.	AmpliSens® <i>Chlamydia trachomatis</i> -FRT PCR kit	R-B1(RG)-CE R-B1-F(RG,iQ)-CE
11.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma</i> -MULTIPRIME-FEP PCR kit	B47-100-R0,2-FEP-CE B47-100-R0,5-FEP-CE
12.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>M.genitalium</i> -MULTIPRIME-FEP PCR kit	B66-100-R0,5-FEP-CE B66-100-R0,2-FEP-CE
13.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma</i> / <i>M.genitalium</i> -MULTIPRIME-FEP PCR kit	B46-100-R0,2-FEP-CE B46-100-R0,5-FEP-CE
14.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma</i> / <i>M.genitalium</i> -MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-B46(RG)-CE R-B46-F(RG,iQ)-CE
15.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma</i> / <i>M.hominis</i> -MULTIPRIME-FEP PCR kit	B43-100-R0,2-FEP-CE B43-100-R0,5-FEP-CE
16.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma</i> / <i>M.hominis</i> -MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-B43(RG)-CE R-B43-F(RG,iQ)-CE
17.	AmpliSens® <i>C.trachomatis</i> / <i>Ureaplasma</i> / <i>M.genitalium</i> / <i>M.hominis</i> -MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-B60(RG)-CE R-B60-F(RG)-CE
18.	AmpliSens® <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> / <i>M.genitalium</i> / <i>T.vaginalis</i> -MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-B61(RG)-CE R-B61-F(RG)-CE
19.	AmpliSens® <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> / <i>M.genitalium</i> -MULTIPRIME-FEP PCR kit	B67-100-R0,5-FEP-CE B67-100-R0,2-FEP-CE
20.	AmpliSens® <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> / <i>M.genitalium</i> -MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-B67(RG)-CE R-B67-F(RG,iQ)-CE
21.	AmpliSens® Genoscreen HLA B*5701-FRT PCR kit	R-O2(RG,iQ)-CE
22.	AmpliSens® <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i> -FEP PCR kit	B42-50-R0,5-FEP-CE B42-50-R0,2-FEP-CE B42-Mod-50-R0,2-FEP-CE; B42-Mod-50-R0,5-FEP-CE
23.	AmpliSens® <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i> -FRT PCR kit	R-B42-4x(RG)-CE R-B42-100-F-CE
24.	AmpliSens® <i>T.vaginalis</i> / <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> -MULTIPRIME-FEP PCR kit	B83-100-R0,5-FEP-CE B83-100-R0,2-FEP-CE
25.	AmpliSens® <i>T.vaginalis</i> / <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> -MULTIPRIME-FRT PCR kit	R-B83(RG)-CE R-B83-F(RG,iQ)-CE

FEDERAL SERVICE FOR SUPERVISION OF CONSUMER RIGHTS PROTECTION AND HUMAN WELFARE

FEDERAL BUDGET INSTITUTE OF SCIENCE  
«CENTRAL RESEARCH INSTITUTE FOR EPIDEMIOLOGY»

111123, Moscow, 3A, Novogireevskaya street, Tel.: +7 495 974 96 42, Fax: +7 495 305 54 23,  
e-mail: obtk@pcr.ru



**EC DECLARATION OF CONFORMITY**

Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27<sup>th</sup> of October 1998 on  
In Vitro Diagnostic Medical Devices

Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology” hereby under own responsibility declares that the products covered by the declaration conform with Essential Requirements listed in Annex I of EC Directive 98/79/EC (IVD Directive). Supporting documentation is retained under the premises of the manufacturer.

The quality management system meets the requirements of the standard EN ISO 13485 “Medical devices – Quality management systems – Requirements for regulatory purposes” and is certified by Institute for testing and certification, Inc. (certificate No. 18 0028 SJ, valid until 2021.05.07).

<b>Manufacturer:</b>	Federal Budget Institute of Science “Central Research Institute for Epidemiology”
<b>Authorized Representative:</b>	Ecoli s.r.o. Studenohorska 12 841 03 Bratislava 47 Slovak Republic Tel.: +421 264 789 336 Fax: +421 264 789 040
<b>Product Name:</b>	Annex for this Declaration
<b>Description:</b>	Reagent kits for qualitative detection and quantification of DNA (RNA) of different infectious agents
<b>Classification:</b>	Article 9, paragraph 1 of EC Council Directive 98/79/EC on <i>in Vitro</i> Diagnostic Devices
<b>Conformity Assessment Route:</b>	Annex III (IVDD)

Signed \_\_\_\_\_

Valid from 2018.10.05

Full name: Vasily G. Akimkin  
Title: Director



№№	Description	Product Code
1.	<b>Hemolytic</b>	137-CE
2.	<b>Mucolysin</b> reagent for sputum preliminary treatment	180-CE
3.	<b>RNA-medium</b>	981-CE
4.	<b>Transport Medium for Storage and Transportation of Respiratory Swabs</b>	957-CE 958-CE 959-CE
5.	<b>Transport Medium with Mucolytic Agent</b>	952-CE 953-CE
6.	<b>Transport medium TM-EDEM</b>	1533-CE
7.	<b>Citolizin</b> nucleic acid extraction kit	K1-3-100-CE
8.	<b>AmpliSens® DNA-sorb-D</b> nucleic acid extraction kit	K8-2331-100-CE
9.	<b>AmpliSens® MAGNO-sorb-URO</b> nucleic acid extraction kit	K4-2181-100-CE
10.	<b>DNA-sorb-AM</b> nucleic acid extraction kit	K1-11-50-CE K1-11-100-CE K1-12-100-CE
11.	<b>DNA-sorb-B</b> nucleic acid extraction kit	K1-2-50-CE K1-2-100-CE
12.	<b>DNA-sorb-C</b> nucleic acid extraction kit	K1-6-50-CE
13.	<b>EDEM</b> reagents kit for extraction of DNA by express method	K2-17-100-CE
14.	<b>MAGNO-sorb</b> Nucleic Acid Extraction Kit	K2-16-200-CE K2-16-1000-CE
15.	<b>RIBO-prep</b> nucleic acid extraction kit	K2-9-Et-50-CE K2-9-Et-100-CE
16.	<b>RIBO-sorb</b> nucleic acid extraction kit	K2-1-Et-50-CE K2-1-Et-100-CE
17.	<b>RIBO-zol-B</b> nucleic acid extraction kit	K2-3-50-CE K2-3-100-CE
18.	<b>RIBO-zol-C</b> nucleic acid extraction kit	K2-13-50-CE K2-13-100-CE
19.	<b>REVERTA-L</b> RT reagents kit	K3-4-50-CE K3-4-100-CE
20.	<b>EPh</b> detection agarose kit	K5-200-CE K5-300-CE K6-200-CE K6-300-CE
21.	<b>AmpliSens® Adenovirus-EPh</b> PCR kit	V23-50-R0,2-CE V23-50-R0,5-CE
22.	<b>AmpliSens® All-screen-FEP</b> PCR kit	B45-FEP-CE
23.	<b>AmpliSens® All-screen-FRT</b> PCR kit	R-B45(RG,iQ)-CE
24.	<b>AmpliSens® ARVI-screen-FRT</b> PCR kit	R-V57-100-F(RG,iQ,Dt)-CE
25.	<b>AmpliSens® Astrovirus-EPh</b> PCR kit	V19-50-R0,2-CE V19-50-R0,5-CE
26.	<b>AmpliSens® Bacillus anthracis-FRT</b> PCR kit	R-B41(RG)-CE
27.	<b>AmpliSens® Bordetella multi-FRT</b> PCR kit	R-B84-100-F(RG,iQ,Dt)-CE
28.	<b>AmpliSens® Borrelia burgdorferi sensu lato-EPh</b> PCR kit	B37-50-R0,2-CE B37-50-R0,5-CE

29.	<b>AmpliSens® <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>-FEP PCR kit</b>	B37-FEP-CE
30.	<b>AmpliSens® <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>-FRT PCR kit</b>	R-B37(RG)-CE
31.	<b>AmpliSens® <i>Borrelia miyamotoi</i>-FRT PCR kit</b>	H-2791-1-CE H-2792-1-4-CE
32.	<b>AmpliSens® <i>Brucella</i> spp.-FEP PCR kit</b>	B10-50-R0,2-FEP-CE B10-50-R0,5-FEP-CE
33.	<b>AmpliSens® <i>Brucella</i> spp.-FRT PCR kit</b>	R-B10(RG)-CE
34.	<b>AmpliSens® <i>C.albicans</i> / <i>C.glabrata</i> / <i>C.krusei</i>-MULTIPRIME-FRT PCR kit</b>	R-F3-F(RG,iQ)-CE R-F3(RG)-CE
35.	<b>AmpliSens® <i>Campylobacter</i> spp.-EPh PCR kit</b>	B35-50-R0,2-CE B35-50-R0,5-CE
36.	<b>AmpliSens® <i>Candida albicans</i>-EPh PCR kit</b>	F1-100-R0,2-CE F1-100-R0,5-CE
37.	<b>AmpliSens® <i>Candida albicans</i>-FEP PCR kit</b>	F1-100-R0,2-FEP-CE F1-100-R0,5-FEP-CE
38.	<b>AmpliSens® <i>Candida albicans</i>-FRT PCR kit</b>	R-F1-F(RG,iQ)-CE R-F1(RG)-CE
39.	<b>AmpliSens® CCHFV-FRT PCR Kit</b>	R-V22-50-F(RG,iQ,Mx,Dt)-CE
40.	<b>AmpliSens® <i>Corynebacterium diphtheriae</i>-EPh PCR kit</b>	B8-50-R0,2-CE B8-50-R0,5-CE
41.	<b>AmpliSens® <i>Corynebacterium diphtheriae</i> / <i>tox-genes</i>-FRT PCR kit</b>	H-2842-1-CE H-2843-1-4-CE
42.	<b>AmpliSens® Cov-Bat-FRT PCR kit</b>	R-V65-F-CE
43.	<b>AmpliSens® <i>Coxiella burnetii</i>-FRT PCR kit</b>	R-B85-50-F(RG,iQ,Mx,Dt)-CE
44.	<b>AmpliSens® <i>Cronobacter sakazakii</i>-FEP PCR kit</b>	B58-FEP-CE
45.	<b>AmpliSens® <i>Cronobacter sakazakii</i>-FRT PCR kit</b>	R-B58(RG,iQ)-CE
46.	<b>AmpliSens® <i>Cryptococcus neoformans</i>-FRT PCR kit</b>	R-F4-F(RG,iQ)-CE
47.	<b>AmpliSens® <i>Dengue virus</i> type-FRT PCR kit</b>	R-V63(RG,CFX)-CE
48.	<b>AmpliSens® <i>Dengue virus</i>-FRT PCR kit</b>	H-2391-1-CE H-2392-1-4-CE
49.	<b>AmpliSens® EBOV Zaire-FRT PCR kit</b>	R-V69-50-F-CE
50.	<b>AmpliSens® EBV-EPh PCR kit</b>	V9-100-R0,2-CE V9-100-R0,5-CE
51.	<b>AmpliSens® EBV-screen/monitor-FRT PCR kit</b>	R-V9-100-S(RG,iQ,Mx)-CE
52.	<b>AmpliSens® EHEC-FEP PCR kit</b>	B59-FEP-CE
53.	<b>AmpliSens® EHEC-FRT PCR kit</b>	R-B59(RG,iQ)-CE
54.	<b>AmpliSens® Enterovirus 71-FRT PCR kit</b>	R-V64-F-CE
55.	<b>AmpliSens® Enterovirus-EPh PCR kit</b>	V16-50-CE V16-50-R0,2-CE V16-50-R0,5-CE
56.	<b>AmpliSens® Enterovirus-FEP PCR kit</b>	V16-50-R0,2-FEP-CE V16-50-R0,5-FEP-CE
57.	<b>AmpliSens® Enterovirus-FRT PCR kit</b>	R-V16(RG)-CE R-V16-F(RG)-CE R-V16-F-CE
58.	<b>AmpliSens® Escherichioses-FEP PCR kit</b>	B62-FEP-CE
59.	<b>AmpliSens® Escherichioses-FRT PCR kit</b>	R-B62(RG,iQ)-CE

60.	<b>AmpliSens® FiloA-screen-FRT PCR kit</b>	H-2781-1-4-CE
61.	<b>AmpliSens® Florocenosis / Aerobes-FRT PCR kit</b>	R-B88-100-FT-CE
62.	<b>AmpliSens® Florocenosis / Bacterial vaginosis-FRT PCR kit</b>	R-B74-100-FT(RG)-CE
63.	<b>AmpliSens® Florocenosis / Candida-FRT PCR kit</b>	R-F5-100-FT(RG,CFX)-CE
64.	<b>AmpliSens® Florocenosis / Mycoplasma-FRT PCR kit</b>	R-B75-100-FT(RG,iQ,Mx)-CE
65.	<b>AmpliSens® Gardnerella vaginalis-EPh PCR kit</b>	B7-100-R0,2-CE B7-100-R0,5-CE
66.	<b>AmpliSens® Gardnerella vaginalis-FEP PCR kit</b>	B7-100-R0,2-FEP-CE B7-100-R0,5-FEP-CE
67.	<b>AmpliSens® Gardnerella vaginalis-FRT PCR kit</b>	R-B7-F(RG,iQ)-CE R-B7(RG)-CE
68.	<b>AmpliSens® Genoscreen-IL28B-FRT PCR kit</b>	R-O5-100-F(RG,iQ,Dt,CFX)-CE
69.	<b>AmpliSens® Hantavirus-EPh PCR kit</b>	V39-50-R0,2-CE V39-50-R0,5-CE
70.	<b>AmpliSens® HAV-EPh PCR kit</b>	V4-50-R0,2-CE V4-50-R0,5-CE
71.	<b>AmpliSens® HAV-FEP PCR kit</b>	V4-FEP-CE
72.	<b>AmpliSens® HAV-FRT PCR kit</b>	R-V4(RG,iQ)-CE
73.	<b>AmpliSens® Helicobacter pylori-EPh PCR kit</b>	B9-50-R0,2-CE B9-50-R0,5-CE
74.	<b>AmpliSens® Helicobacter pylori-FEP PCR kit</b>	B9-FEP-CE
75.	<b>AmpliSens® Helicobacter pylori-FRT PCR kit</b>	R-B9(RG,iQ)-CE
76.	<b>AmpliSens® HGV-EPh PCR kit</b>	V2-100-R0,2-CE V2-100-R0,5-CE
77.	<b>AmpliSens® HGV-FRT PCR kit</b>	R-V2-50-F(RG,iQ,Mx,Dt)-CE
78.	<b>AmpliSens® HHV6-EPh PCR kit</b>	V10-100-R0,2-CE V10-100-R0,5-CE
79.	<b>AmpliSens® HHV6-screen-titre-FRT PCR kit</b>	R-V10-T(RG,iQ,Mx)-CE
80.	<b>AmpliSens® HHV7-screen/monitor-FRT PCR kit</b>	H-2431-1-1-CE
81.	<b>AmpliSens® HPV 16/18-EPh PCR kit</b>	V12-100-R0,2-CE V12-100-R0,5-CE
82.	<b>AmpliSens® HPV 16/18-FEP PCR kit</b>	V12-FEP-CE V12-100-R0,5-FEP-CE V12-100-R0,2-FEP-CE V12-Mod-FEP-CE
83.	<b>AmpliSens® HPV 16/18-FRT PCR kit</b>	R-V12(RG,iQ,Mx)-CE R-V12-100(RG)-CE R-V12-100(iQ,Mx,Dt)-CE R-V12-Mod(RG,iQ,Mx)-CE
84.	<b>AmpliSens® HPV 31/33-EPh PCR kit</b>	V13-100-R0,2-CE V13-100-R0,5-CE
85.	<b>AmpliSens® HPV 35/45-EPh PCR kit</b>	V14-100-R0,2-CE V14-100-R0,5-CE
86.	<b>AmpliSens® HPV 6/11-EPh PCR kit</b>	V11-50F-CE
87.	<b>AmpliSens® HPV 6/11-FEP PCR kit</b>	V11-FEP-CE V11-100-R0,5-FEP-CE V11-100-R0,2-FEP-CE V11-Mod-FEP-CE

88.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV 6/11-FRT PCR kit</b>	R-V11(RG,iQ,Mx)-CE R-V11-100(RG)-CE R-V11-100(iQ,Mx,Dt)-CE R-V11-Mod(RG,iQ,Mx)-CE
89.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR genotype-EPh PCR kit</b>	V25-50F-CE
90.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR genotype-FRT PCR kit</b>	R-V25(RG,iQ,Mx)-CE
91.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR genotype-titre-FRT PCR kit</b>	R-V67-F-CE R-V71-F-CE
92.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR screen-EPh PCR kit</b>	V31-100F-CE
93.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR screen-FEP PCR kit</b>	V31-3x-FEP-CE V31-FEP-CE
94.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR screen-titre-14-FRT PCR kit</b>	H-2311-1-13-CE
95.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HPV HCR screen-titre-FRT PCR kit</b>	R-V31-T-2x(RG,iQ,SC)-CE R-V31-T-4x(RG,iQ,Mx)-CE R-V31-F-CE
96.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HSV I, II-EPh PCR kit</b>	V8-100-R0,2-CE V8-100-R0,5-CE
97.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HSV I, II-EPh-M PCR kit</b>	V8-100-R0,2-Mod-CE V8-100-R0,5-Mod-CE
98.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HSV I, II-FRT PCR kit</b>	R-V8-F(RG,iQ)-CE R-V8(RG)-CE
99.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HSV-typing-FEP PCR kit</b>	V38-100-R0,2-FEP-CE V38-100-R0,5-FEP-CE
100.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> HSV-typing-FRT PCR kit</b>	R-V38-F(RG,iQ)-CE R-V38(RG)-CE
101.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Human enterovirus-FEP PCR kit</b>	H-2771-2-2-CE H-2772-2-5-CE H-2773-2-CE
102.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Human enterovirus-FRT PCR kit</b>	H-2771-1-2-CE H-2773-1-CE
103.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A/B-EPh PCR kit</b>	V36-50-R0,2-CE V36-50-R0,5-CE
104.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A/H1-swine-FEP PCR kit</b>	V55-50-R0,5-FEP-CE V55-50-R0,2-FEP-CE
105.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A/H1-swine-FRT PCR kit</b>	R-V55(RG)-CE R-V55-F(RG,iQ,Dt,SC)-CE R-V55-F(SC)-CE
106.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A-type-FEP PCR kit</b>	V54-50-R0,5-FEP-CE V54-50-R0,2-FEP-CE
107.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A-type-FRT PCR kit</b>	R-V54(RG)-CE R-V54(iQ,Dt)-CE R-V54-100-F(RG,iQ,Dt,SC)-CE
108.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A-type-H5, H7, H9-FRT PCR kit</b>	R-V66-F-CE
109.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A H5N1-FEP PCR kit</b>	V33-50-R0,2-FEP-CE V33-50-R0,5-FEP-CE
110.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A H5N1-FRT PCR kit</b>	R-V33(RG)-CE R-V33(SC)-CE
111.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A/B-FEP PCR kit</b>	V36-Mod-50-R0,2-FEP-CE V36-Mod-50-R0,5-FEP-CE
112.	<b>AmpliSens<sup>®</sup> Influenza virus A/B-FRT PCR kit</b>	R-V36-50-Mod-CE R-V36-100-F-Mod(RG,iQ,Dt,CFX,SC)-CE

113.	<b>AmpliSens® JCV-BKV screen-monitor-FRT</b> PCR kit	H-2441-1-1-CE
114.	<b>AmpliSens® Legionella pneumophila-FEP</b> PCR kit	B50-R0,2-FEP-CE B50-50-R0,5-FEP-CE
115.	<b>AmpliSens® Legionella pneumophila-FRT</b> PCR kit	R-B50(RG)-CE
116.	<b>AmpliSens® Leptospira-FRT</b> PCR kit	R-B49(RG,iQ)-CE
117.	<b>AmpliSens® Leucosis Quantum M-bcr-FRT</b> PCR kit	TR-O1(RG,iQ,Mx,A)-CE
118.	<b>AmpliSens® Leucosis Quantum M-bcr- FRT-M</b> PCR kit	SK9-3651-1-1-CE
119.	<b>AmpliSens® Listeria monocytogenes-EPh</b> PCR kit	B14-50-R0,2-CE B14-50-R0,5-CE
120.	<b>AmpliSens® Listeria monocytogenes- screen-titre-FRT</b> PCR kit	R-B14-100-FT(RG,iQ)-CE
121.	<b>AmpliSens® Listeria monocytogenes- screen/monitor-FRT</b> PCR kit	H-2161-1-1-CE
122.	<b>AmpliSens® M.genitalium-screen-titre-FRT</b> PCR kit	R-B4-100-FT(RG,iQ,Mx)-CE
123.	<b>AmpliSens® M.hominis / G.vaginalis- MULTIPRIME-FEP</b> PCR kit	B48-100-R0,2-FEP-CE B48-100-R0,5-FEP-CE
124.	<b>AmpliSens® M.hominis-screen-titre-FRT</b> PCR kit	R-B3-100-FT(RG,iQ,Mx)-CE
125.	<b>AmpliSens® MBT-EPh</b> PCR kit	B15-100-R0,2-CE B15-100-R0,5-CE
126.	<b>AmpliSens® MDR KPC/OXA-48-FRT</b> PCR kit	R-C2(RG,CFX)-CE
127.	<b>AmpliSens® MDR MBL-FRT</b> PCR kit	R-C1(RG,CFX)-CE
128.	<b>AmpliSens® MRSA-screen-titre-FRT</b> PCR kit	R-B78-100-FT(RG,iQ)-CE
129.	<b>AmpliSens® MTC-diff-FRT</b> PCR kit	R-B80(RG,iQ,Dt,SC)-CE
130.	<b>AmpliSens® MTC-FEP</b> PCR kit	B57-FEP-CE
131.	<b>AmpliSens® MTC-FRT</b> PCR kit	R-B57(RG,iQ,SC,Dt)-CE
132.	<b>AmpliSens® Mycoplasma genitalium-EPh</b> PCR kit	B4-100-R0,2-CE B4-100-R0,5-CE
133.	<b>AmpliSens® Mycoplasma genitalium-FEP</b> PCR kit	B4-100-R0,2-FEP-CE B4-100-R0,5-FEP-CE
134.	<b>AmpliSens® Mycoplasma genitalium-FRT</b> PCR kit	R-B4-F(RG,iQ)-CE R-B4(RG)-CE
135.	<b>AmpliSens® Mycoplasma hominis-EPh</b> PCR kit	B3-100-R0,2-CE B3-100-R0,5-CE
136.	<b>AmpliSens® Mycoplasma hominis-FEP</b> PCR kit	B3-100-R0,2-FEP-CE B3-100-R0,5-FEP-CE
137.	<b>AmpliSens® Mycoplasma hominis-FRT</b> PCR kit	R-B3-F(RG,iQ)-CE R-B3(RG)-CE
138.	<b>AmpliSens® Mycoplasma pneumoniae-EPh</b> PCR kit	B40-50-R0,2-CE B40-50-R0,5-CE
139.	<b>AmpliSens® N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumonia-FEP</b> PCR kit	B25-FEP-CE
140.	<b>AmpliSens® N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumonia-FRT</b> PCR kit	R-B25(RG,iQ)-CE
141.	<b>AmpliSens® Neisseria gonorrhoeae-EPh</b> PCR kit	B5-100-R0,2-CE B5-100-R0,5-CE B24-100-R0,2-CE B24-100-R0,5-CE
142.	<b>AmpliSens® Neisseria gonorrhoeae- screen-FEP</b> PCR kit	B51-100-R0,2-FEP-CE B51-100-R0,5-FEP-CE

143.	<b>AmpliSens® <i>Neisseria gonorrhoeae</i>-screen-FRT PCR kit</b>	R-B51-F(RG,iQ)-CE R-B51(RG)-CE
144.	<b>AmpliSens® <i>Neisseria gonorrhoeae</i>-test-FEP PCR kit</b>	B56-100-R0,2-FEP-CE B56-100-R0,5-FEP-CE
145.	<b>AmpliSens® <i>Neisseria gonorrhoeae</i>-test-FRT PCR kit</b>	R-B56(RG)-CE R-B56-F(RG,iQ)-CE
146.	<b>AmpliSens® <i>Neisseria meningitidis</i> A, B, C-EPh PCR kit</b>	B26-50-R0,2-CE B26-50-R0,5-CE
147.	<b>AmpliSens® <i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.-EPh PCR kit</b>	B25-50-R0,2-CE B25-50-R0,5-CE
148.	<b>AmpliSens® <i>Norovirus</i> GI / GII-FRT PCR kit</b>	H-2751-1-3-CE
149.	<b>AmpliSens® <i>Norovirus</i> genotypes 1, 2-EPh PCR kit</b>	V27-50-R0,2-CE V27-50-R0,5-CE
150.	<b>AmpliSens® <i>Parvovirus</i> B19-FRT PCR kit</b>	R-V49(RG,iQ,Mx)-CE
151.	<b>AmpliSens® <i>Pneumocystis jirovecii</i> (<i>carinii</i>)-FRT PCR kit</b>	R-F2(RG,iQ,Mx)-CE R-F2-Mod(RG,iQ,Mx)-CE
152.	<b>AmpliSens® <i>Poliovirus</i>-FEP PCR kit</b>	V58-FEP-CE
153.	<b>AmpliSens® <i>Poliovirus</i>-FRT PCR kit</b>	R-V58(RG,iQ)-CE
154.	<b>AmpliSens® <i>Pseudomonas aeruginosa</i>-screen-titre-FRT PCR kit</b>	R-B76-50-FT(RG,iQ)-CE
155.	<b>AmpliSens® <i>Rickettsia conorii</i>-FRT PCR kit</b>	H-2741-1-CE H-2742-1-4-CE
156.	<b>AmpliSens® <i>Rotavirus</i> / <i>Norovirus</i> / <i>Astrovirus</i>-FEP PCR kit</b>	V40-FEP-CE
157.	<b>AmpliSens® <i>Rotavirus</i> / <i>Norovirus</i> / <i>Astrovirus</i>-FRT PCR kit</b>	R-V40(RG,iQ)-CE
158.	<b>AmpliSens® <i>Rotavirus</i>-EPh PCR kit</b>	V15-50-R0,2-CE V15-50-R0,5-CE
159.	<b>AmpliSens® <i>Salmonella</i> spp.-EPh PCR kit</b>	B11-50-R0,2-CE B11-50-R0,5-CE
160.	<b>AmpliSens® <i>Salmonella</i> spp.-FEP PCR kit</b>	B11-FEP-CE
161.	<b>AmpliSens® <i>Salmonella</i> spp.-FRT PCR kit</b>	R-B11(RG,iQ)-CE
162.	<b>AmpliSens® <i>Salmonella typhi</i>-FEP PCR kit</b>	B63-FEP-CE
163.	<b>AmpliSens® <i>Salmonella typhi</i>-FRT PCR kit</b>	R-B63(RG,iQ)-CE
164.	<b>AmpliSens® <i>Shigella</i> spp. and <i>EIEC</i> / <i>Salmonella</i> spp. / <i>Campylobacter</i> spp.-FRT PCR kit</b>	R-B44(RG,iQ)-CE
165.	<b>AmpliSens® <i>Shigella</i> spp. and <i>EIEC</i> / <i>Salmonella</i> spp. / <i>Campylobacter</i> spp.-FEP PCR kit</b>	B44-FEP-CE
166.	<b>AmpliSens® <i>Shigella</i> spp. and <i>EIEC</i>-EPh PCR kit</b>	B12-50-R0,2-CE B12-50-R0,5-CE
167.	<b>AmpliSens® <i>Shigella</i> spp. and <i>EIEC</i>-FEP PCR kit</b>	B12-FEP-CE
168.	<b>AmpliSens® <i>Shigella</i> spp. and <i>EIEC</i>-FRT PCR kit</b>	R-B12(RG,iQ)-CE
169.	<b>AmpliSens® <i>Streptococcus agalactiae</i>-screen-titre-FRT PCR kit</b>	R-B77-100-FT(RG,iQ)-CE
170.	<b>AmpliSens® <i>Streptococcus pyogenes</i>-screen-titre-FRT PCR kit</b>	R-B82-100-FT(RG,iQ)-CE
171.	<b>AmpliSens® <i>Streptococcus pyogenes</i>-screen/monitor-FRT PCR kit</b>	H-2171-1-1-CE H-2172-1-14-CE
172.	<b>AmpliSens® <i>Streptococcus</i> spp.-EPh PCR kit</b>	B18-50-R0,2-CE B18-50-R0,5-CE

173.	<b>AmpliSens® <i>T.vaginalis</i> / <i>N.gonorrhoeae</i>-MULTIPRIME-FEP</b> PCR kit	B65-100-R0,5-FEP-CE B65-100-R0,2-FEP-CE
174.	<b>AmpliSens® <i>T.vaginalis</i> / <i>N.gonorrhoeae</i>-MULTIPRIME-FRT</b> PCR kit	R-B65(RG)-CE R-B65-F(RG,iQ)-CE
175.	<b>AmpliSens® TBE-FRT</b> PCR kit	R-V52(RG)-CE
176.	<b>AmpliSens® TBEV, <i>B.burgdorferi</i> sl, <i>A.phagocytophilum</i>, <i>E.chaffeensis</i> / <i>E.muris</i>-FRT</b> PCR kit	R-V59(RG,iQ,Mx,Dt)-CE R-V59-50-F(RG,iQ,Mx,Dt)-CE
177.	<b>AmpliSens® <i>Treponema pallidum</i>-FEP</b> PCR kit	B20-100-R0,2-FEP-CE B20-100-R0,5-FEP-CE
178.	<b>AmpliSens® <i>Treponema pallidum</i>-FRT</b> PCR kit	R-B20-F(RG,iQ)-CE R-B20(RG)-CE
179.	<b>AmpliSens® <i>Trichomonas vaginalis</i>-EPh</b> PCR kit	B6-100-R0,2-CE B6-100-R0,5-CE
180.	<b>AmpliSens® <i>Trichomonas vaginalis</i>-FEP</b> PCR kit	B6-100-R0,2-FEP-CE B6-100-R0,5-FEP-CE
181.	<b>AmpliSens® <i>Trichomonas vaginalis</i>-FRT</b> PCR kit	R-B6-F(RG,iQ)-CE R-B6(RG)-CE
182.	<b>AmpliSens® <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>-EPh</b> PCR kit	B19-100-R0,2-CE B19-100-R0,5-CE
183.	<b>AmpliSens® <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>-FEP</b> PCR kit	B19-100-R0,2-FEP-CE B19-100-R0,5-FEP-CE
184.	<b>AmpliSens® <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>-FRT</b> PCR kit	R-B19-F(RG,iQ)-CE R-B19(RG)-CE
185.	<b>AmpliSens® <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>-screen-titre-FRT</b> PCR kit	R-B19-100-FT(RG,iQ,Mx)-CE
186.	<b>AmpliSens® <i>Ureaplasma</i> spp.-EPh</b> PCR kit	B2-100-R0,2-CE B2-100-R0,5-CE
187.	<b>AmpliSens® <i>Ureaplasma</i> spp.-FEP</b> PCR kit	B2-100-R0,2-FEP-CE B2-100-R0,5-FEP-CE
188.	<b>AmpliSens® <i>Ureaplasma</i> spp.-FRT</b> PCR kit	R-B2-F(RG,iQ)-CE R-B2(RG)-CE
189.	<b>AmpliSens® <i>Ureaplasma</i> spp.-screen-titre-FRT</b> PCR kit	R-B2-100-FT(RG,iQ,Mx)-CE
190.	<b>AmpliSens® <i>Vibrio cholerae</i>-FRT</b> PCR kit	R-B53(RG)-CE
191.	<b>AmpliSens® VZV-FRT</b> PCR kit	R-V61-50-F(RG)-CE
192.	<b>AmpliSens® WNV-FRT</b> PCR kit	R-V53(RG,iQ,Mx)-CE
193.	<b>AmpliSens® Yellow fever virus-FRT</b> PCR kit	H-2461-1-CE H-2462-1-4-CE
194.	<b>AmpliSens® <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>Y.pseudotuberculosis</i>-FEP</b> PCR kit	B64-FEP-CE
195.	<b>AmpliSens® <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>Y.pseudotuberculosis</i>-FRT</b> PCR kit	R-B64(RG,iQ)-CE
196.	<b>AmpliSens® <i>Yersinia pestis</i>-FRT</b> PCR kit	R-B79(RG,iQ,Dt)-CE
197.	<b>AmpliSens® Zika virus-FRT</b> PCR kit	H-2411-1-CE
198.	<b>BRCA-screen</b> kit	S-1619-6-CE
199.	<b>PEERO-prep</b> reagent kit for sample preparation	K15-1611-40-CE