

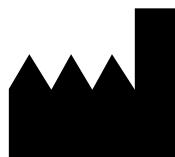
УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 15.05.2012 № 2356-Пр/12

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
2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения
ДНК цитомегаловируса человека (CMV) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL»

АмплиСенс®



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	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	12
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	24

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	– экзогенный внутренний контрольный образец
ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
К-	– отрицательный контроль ПЦР
К+	– положительный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ПК	– положительный контроль экстракции
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
CMV	– цитомегаловирус человека
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL» предназначен для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (CMV) путем амплификации специфического фрагмента ДНК вируса методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смывов и мазков из ротоглотки, мочи, бронхоальвеолярного лаважа, цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление CMV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из плазмы периферической крови,

¹ В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС

амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смызов и мазков из ротоглотки и бронхоальвеолярного лаважа проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК CMV при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется 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 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК, амплификацию и количественное определение ДНК

цитомегаловируса человека (CMV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (CMV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Линейный диапазон измерения набора реагентов: **500 – 10 000 000 копий/мл**. Если результат больше, чем 10.000.000 копий/мл, то он выдается как **результат более 10 000 000 копий ДНК CMV/мл**. Если результат меньше чем, 500 копий/мл, то он выдается как **результат менее 500 копий ДНК CMV/мл**.

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность
Плазма периферической крови, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), слюна, смывы и мазки из ротоглотки, моча, бронхоальвеолярный лаваж	РИБО-преп	400 копий/мл
Цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов	РИБО-преп	5 копий ДНК CMV на 10^5 клеток

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК цитомегаловируса человека. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании референсного штамма AD 169, а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в

отношении ДНК других вирусов (Эпштейн-Барр вирус человека, вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус герпеса 6 и 8 типа, вирус Варицелла-Зостер, *Parvovirus B19* и др.), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и др.) и ДНК человека.

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 односторонним. 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

1. ГЕМОЛИТИК (ТУ 9398-097-01897593-2010) – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), комплект реагентов для выделения ДНК «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 2.
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
5. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции

нуклеиновых кислот.

6. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS® easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axygen, США) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации. (ЗОНА 2):

8. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
9. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
10. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
11. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
12. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми прибором).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.
16. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР

объемом 0,2 мл или 0,1 мл:

- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) - при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – 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.

Материалом для исследования служит цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов, слюна, смывы и мазки из ротоглотки, плазма периферической крови, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), моча, бронхоальвеолярный лаваж.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- цельная периферическая и пуповинная кровь

Перед экстракцией необходимо провести предобработку крови: в 1,5 мл пробирку типа «Эплендорф» внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 минут, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмычки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмычку гемолитиком.

Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

- **белые клетки (лейкоцитарная масса) периферической и/или пуповинной крови**

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку с кровью центрифугировать в течение 20 мин при 800-1600 г (3 тыс об/мин), после этого отобрать белую пленку, образующуюся на поверхности отстоявшейся крови. Далее провести предобработку, описанную выше для цельной периферической и пуповинной крови. Допускается хранение белых клеток периферической и пуповинной крови при температуре не выше минус 68 °С в течение длительного времени.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмычки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмычки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (CMV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL CMV скрин/монитор	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (ТаqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

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

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК СМВ и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (СМВ) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® СМВ-скрин/монитор-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца - ВКО STI-87 (в каждый образец добавляется 10 мкл ВКО STI-87). В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК СМВ и ДНК человека**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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 ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (30 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в качественном формате необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительный (KSG2) и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). А для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации ПЦР: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два повтора и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FL CMV скрин/монитор и заранее подготовленную смесь ПЦР-

ФОРМАТ FRT

смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL CMV скрин/монитор,**
- **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).**

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в Приложении 1.

ВНИМАНИЕ! При одновременном исследовании 60 образцов возможна упрощенная схема приготовления смеси: все содержимое одной пробирки с ПЦР-смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL CMV скрин/монитор.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, полученной в результате экстракции из клинических или контрольных образцов.
6. Для проведения качественного анализа:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) –внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл KSG2.

Для проведения количественного анализа:

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) –внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;
- б) калибраторы KSG1 и KSG2 – внести в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG1 и в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG2.

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

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 1а и 1б).

Таблица 1а
Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа³

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	
	72	15 с	–	

Таблица 1б
Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁴

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE, ROX	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

По каналу – **FAM** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (ВКО Glob)**, по каналу **JOE** – **ДНК CMV (ПКО ДНК CMV и ДНК человека)**, по

³ Например, Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁴ Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

ФОРМАТ FRT

каналу **ROX** – накопление продукта амплификации участка **ДНК ВКО STI-87 (ВКО STI-87)**.

При экстракции тотальной ДНК из сусpenзии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) учитываются результаты по двум каналам: по каналу – **FAM** – регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (ВКО Glob)**, по каналу **JOE** – **ДНК CMV (ПКО ДНК CMV и ДНК человека)**.

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора) мочи, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом учитываются результаты по двум каналам: по каналу **JOE** – **ДНК CMV (ПКО ДНК CMV и ДНК человека)**, по каналу **ROX** – накопление продукта амплификации участка **ДНК ВКО STI-87 (ВКО STI-87)**.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла Ct в соответствующей графе таблицы результатов (см. приложения к инструкции для используемого прибора).

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в «реальном времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.

Результат амплификации по каналу считается **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения Ct).

При экстракции тотальной ДНК из сусpenзии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК CMV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла Ct , не превышающее порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в методических

рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (СМВ) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] CMV-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК CMV не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК ВКО Glob более **2000** копий/реакция.

- 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** для качественного теста значение *Ct* более указанного во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК ВКО Glob менее **2000** копий/реакция. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу **JOE** превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается **сомнительным**.

Для качественного теста в случае, если значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **FAM** превышает указанное во вкладыше, отрицательный **результат считается недостоверным**.

Для количественного теста в случае, если ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакция количественный положительный или отрицательный **результат считается недостоверным**.

ФОРМАТ FRT

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К-, К+ (см. табл. 2). Для количественного теста результаты по ПК должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 2

Результаты для контролей ПЦР-исследования при экстракции тотальной ДНК из супензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов)

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM		JOE	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК CMV на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) провести по формуле:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК_CMV_в_ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК_Glob_в_ПЦР-пробе}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right\} = \lg \{ \text{копий ДНК CMV}/10^5 \text{ клеток} \}$$

Для выражения относительной концентрации ДНК CMV в копиях на стандартное количество клеток (например, на 10^5) используется коэффициент пересчета:

$$10^5 \text{ клеток} = 2 \cdot 10^5 \text{ геномов человека}$$

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости или спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смызов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК CMV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (CMV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] CMV-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК CMV не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX** значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE**, и по каналу для флуорофора **ROX** значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает значение, указанное во вкладыше. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу **JOE** превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух

ФОРМАТ FRT

повторах значений – результат считается **сомнительным**.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+ (см. табл. 3). Для количественного теста результаты по ПК должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 3

Результаты для контролей ПЦР-исследования при экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смызов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		JOE		ROX	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации ДНК СМВ на мл образца для плазмы периферической крови, амниотической и спинномозговой жидкости (ликвора), мочи, слюны, смызов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа проводится по формуле:

КП ДНК СМВ = [КдНК СМВ / KSTI-87] x коэффициент ВКО (копий/мл)

ФОРМАТ FRT

**К ДНК CMV - количество копий ДНК CMV в пробе ДНК;
KSTI-87 - количество копий ДНК STI-87 в пробе ДНК;
коэффициент ВКО – соответствует числу копий ВКО ДНК STI-87 в пробе ДНК и указан во вкладыше к каждой серии наборов реагентов и специфичен для каждого лота.**

К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны концентрации ПКО CMV и ДНК человека, ВКО STI-87 и ДНК-калибраторов, необходимые для расчета концентраций исследуемых проб и оценки достоверности полученных результатов, а также значения порогового цикла *Ct*.

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 °C не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °C. ПЦР-смесь-1-FL CMV скрин/монитор, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °C. ПЦР-смесь-1-FL CMV скрин/монитор хранить в защищенном от света месте.

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

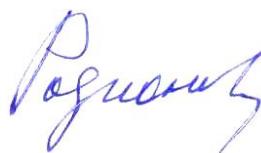
Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail:products@pcr.ru)⁵.

Заведующий НПЛ ОМдиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Н. Родионова



Е.Л. Никонов

⁵ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл, включая объем пробы ДНК - 10 мкл			
объем реагентов на одну реакцию		10,0	5,0
число клинических образцов		ПЦР-смесь-1-FL CMV скрин/монитор*	Смесь ПЦР-смеси-2- FRT и полимеразы (TaqF)*
для количественного определения	для качественного определения		
1	4	70	35
2	5	80	40
3	6	90	45
4	7	100	50
5	8	110	55
6	9	120	60
7	10	130	65
8	11	140	70
9	12	150	75
10	13	160	80
11	14	170	85
12	15	180	90
13	16	190	95
14	17	200	100
15	18	210	105
16	19	220	110
17	20	230	115
18	21	240	120
19	22	250	125
20	23	260	130
21	24	270	135
22	25	280	140
23	26	290	145
24	27	300	150
25	28	310	155
30	33	360	180

* - Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек (2 ДНК-калибратора KSG1, KSG2 (по два повтора) и отрицательный контроль РНК-буфер) для количественного определения ДНК CMV и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК CMV.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации

LOT

Код партии



Максимальное
число тестов

IVD

Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Производитель



Дата
изготовления



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 04 марта 2019 года № ФСР 2010/09504

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (CMV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL"
по ТУ 9398-085-01897593-2012

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-25971/9595 от 21.02.2019

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 04 марта 2019 года № 1721
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

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

Д.Ю. Павлюков

0042547

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 04 марта 2019 года № ФСР 2010/09504

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК цитомегаловируса человека (CMV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® CMV-скрин/монитор-FL" по ТУ 9398-085-01897593-2012:

Набор выпускается в 1 формате:

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 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

0054091





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2010/09506

На медицинское изделие

Набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL" по ТУ 9398-094-01897593-2012

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-26125/11214 от 01.03.2019

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 13 марта 2019 года № 1985
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

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

Д.Ю. Павлюков

0042657



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 13 марта 2019 года № ФСР 2010/09506

Лист 1

На медицинское изделие

Набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» по ТУ 9398-094-01897593-2012:

Набор выпускается в 1 формате:

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 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
0054559

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 15.05.2012 № 2352-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ

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

В.И.Покровский

«15» июня 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и количественного определения

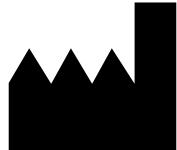
ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL»

АмплиСенс®



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	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

BKO Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
K+	– положительный контроль ПЦР
K-	– отрицательный контроль ПЦР
OK	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
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
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HHV6	– вирус герпеса 6 типа

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-FL» предназначен для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление HHV6 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК

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

генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *HHV6* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется 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 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК, амплификацию и количественное определение ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определение ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-

Формат FRT Форма 1: **[REF]** TR-V10-T(RG,iQ,Mx); **[REF]** HK1-0941-1-1;

Форма 2: **[REF]** R-V10-T(RG,iQ,Mx); **[REF]** H-0942-1-1 / **[VER]** 15.02.12 / стр. 4 из 22

исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность
Спинномозговая жидкость (ликвор), слюна, смывы и мазки из ротоглотки	«РИБО-преп»	400 копий/мл
Цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов	«РИБО-преп»	5 копий ДНК <i>HHV6</i> на 10^5 клеток

Линейный диапазон измерения набора реагентов: 500 – 10 000 000 копий/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК вируса герпеса 6 типа. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других вирусов (вирус простого герпеса 1 и 2 типа, Эпштейн-Барр вирус человека, вирус герпеса 8 типа, вирус Варицелла-Зостер, *Parvovirus B19*, цитомегаловирус человека и др.), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и др.) и ДНК человека.

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 односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, 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 разбрзгивание 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

1. ГЕМОЛИТИК (ТУ 9398-097-01897593-2010) – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) – при работе с формой комплектации 2. Для экстракции ДНК из биоптатов рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008).
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации (ЗОНА 2):

5. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
6. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
7. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в

- штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми прибором).
 10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
 11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 12. Емкость для сброса наконечников.
 13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
 14. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – 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.

Материалом для исследования служит цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов, слюна, смывы и мазки из ротоглотки, спинномозговая жидкость (ликвор).

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

– цельная периферическая и пуповинная кровь

Перед экстракцией необходимо провести предобработку крови: в 1,5 мл пробирку типа «Эплендорф» внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмычки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмычку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции при помощи комплекта «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68°C на длительное время.

– белые клетки (лейкоцитарная масса) периферической и/или пуповинной крови

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку с кровью центрифугировать в течение 20 мин при 800-1600 g (3 тыс об/мин), после этого отобрать белую пленку, образующуюся на поверхности отстоявшейся крови. Далее провести предобработку, описанную выше для цельной периферической и пуповинной крови. Допускается хранение белых клеток периферической и пуповинной крови при температуре не выше минус 68 °C в течение длительного времени.

Предобработку биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости (ликвора) проводить в соответствии

с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г. Предобработка для слюны, смывов и мазков из ротоглотки не требуется.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмычки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмычки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>HHV6 / Glob</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

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

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК <i>HHV6</i> и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса герпеса 6 типа (*HHV6*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *HHV6*-скрин-титр-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО ДНК *HHV6* и ДНК человека**.

При использовании формы выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

ФОРМАТ FRT

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

A. 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 ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (30 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 60 реакций, включая контроли. Смесь хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций)

2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в качественном формате необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации: положительный (ДНК-калибратор KSG 2) и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). А для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два

ФОРМАТ FRT

повтора и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FRT HHV6 / Glob** и заранее подготовленную смесь **ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**. Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT HHV6 / Glob**
- **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).**

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в Приложении 1.

ВНИМАНИЕ! При одновременном исследовании 60 образцов возможна упрощенная схема приготовления смеси: все содержимое одной пробирки ПЦР-смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT HHV6 / Glob.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.

5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, выделенной из клинических или контрольных образцов.

6. Для проведения качественного анализа:

- a) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера;**
- b) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-калибратора KSG 2**

Для проведения количественного анализа:

- a) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера;**
- b) **калибраторы KSG1 и KSG2** – внести в две пробирки по **10 мкл** калибратора **KSG1** и в две пробирки по **10 мкл** калибратора **KSG2.**

ФОРМАТ FRT

Б. Проведение амплификации детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 1а и 1б)

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа³

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM, JOE ⁴	
	72	15 с	–	

Таблица 16

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁵

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, JOE ⁴	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

³ Например, Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁴ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов

⁵ Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Формат FRT Форма 1: **[REF]** TR-V10-T(RG,iQ,Mx); **[REF]** НК1-0941-1-1;

Форма 2: **[REF]** R-V10-T(RG,iQ,Mx); **[REF]** Н-0942-1-1 / **[VER]** 15.02.12 / стр. 15 из 22

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

По каналу для флуорофора – **FAM** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β-глобинового гена (ВКО Glob)**, по каналу для флуорофора **JOE–ДНК HHV6 (ПКО ДНК HHV6 + ДНК человека)**

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *C_t* в соответствующей графе таблицы результатов (см. инструкцию для используемого прибора)

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.

Результат амплификации по каналу считается **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *C_t*).

Результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК HHV6 обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *C_t*, не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК HHV6 не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *C_t* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение порогового цикла *C_t* не

превышает указанное во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК ВКО Glob более **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и более **500** для слюны, смыков и мазков из ротоглотки. Для проб спинномозговой жидкости допустимо превышение значения порогового цикла *Ct*, указанного во вкладыше, по каналу для флуорофора **FAM**, а количество ДНК ВКО Glob может быть менее 500 в случае количественного теста, т.к. в пробах спинномозговой жидкости может содержаться очень маленькое количество клеток.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) или выше порогового значение *Ct* по каналу для флуорофора **JOE**, и по каналу для флуорофора **FAM** для качественного теста значение *Ct* более указанного во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК ВКО Glob менее **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, смыков и мазков из ротоглотки. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу для флуорофора **JOE** превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается **сомнительным**.

Для качественного теста в случае, если значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **FAM** превышает указанное во вкладыше, отрицательный **результат считается недостоверным**.

Для количественного теста в случае, если ДНК ВКО Glob менее **2000** копии/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, смыков и мазков из ротоглотки **количественный**

ФОРМАТ FRT

положительный или отрицательный результат считается недостоверным.

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены правильные результаты прохождения контрольных образцов ОК, ПК, К-, К+, KSG1, KSG2 (см. табл. 2). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Для проб спинномозговой жидкости допустимо превышение значения порогового цикла Ct , указанного во вкладыше, по каналу для флуорофора **FAM**, а количество ДНК ВКО Glob может быть менее 500 в случае количественного теста, т.к. в пробах спинномозговой жидкости может содержаться очень маленькое количество клеток.

Таблица 2

Результаты постановки контролей ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналам для флуорофоров			
		FAM		JOE	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация

ФОРМАТ FRT

При экстракции тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК *HHV6* на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах провести по формуле:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК_} HHV6 \text{ в_ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК_} Glob \text{ в_ПЦР-пробе}} \right\} = 2 \cdot 10^5 = \lg \{ \text{копий ДНК } HHV6 / 10^5 \text{ клеток} \}$$

При экстракции тотальной ДНК из слюны, смызов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора) расчет концентрации ДНК *HHV6* на мл образца (КПДНК *HHV6*) проводится по формуле:

$$\text{КП ДНК } HHV6 = \text{КДНК } HHV6 * 100 \text{ (копии/мл)}$$

К ДНК *HHV6*- количество копий ДНК *HHV6* в пробе ДНК.

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 °C не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °C. ПЦР-смесь-1-FRT *HHV6 / Glob*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) (из комплекта «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °C. ПЦР-смесь-1-FRT *HHV6 / Glob* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс® HHV6-скрин-титр-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) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁶.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Л. Никонов

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Формат FRT Форма 1: **[REF]** TR-V10-T(RG,iQ,Mx); **[REF]** HK1-0941-1-1;

Форма 2: **[REF]** R-V10-T(RG,iQ,Mx); **[REF]** H-0942-1-1 / **[VER]** 15.02.12 / стр. 20 из 22

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл			
объем реагентов на одну реакцию		10,0	5,0
число клинических образцов для количественного определения	для качественного определения	ПЦР-смесь-1-FRT <i>HHV6 / Glob</i> *	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и Полимеразы (TaqF) *
1	4	70	35
2	5	80	40
3	6	90	45
4	7	100	50
5	8	110	55
6	9	120	60
7	10	130	65
8	11	140	70
9	12	150	75
10	13	160	80
11	14	170	85
12	15	180	90
13	16	190	95
14	17	200	100
15	18	210	105
16	19	220	110
17	20	230	115
18	21	240	120
19	22	250	125
20	23	260	130
21	24	270	135
22	25	280	140
23	26	290	145
24	27	300	150
25	28	310	155
30	33	360	180

* - Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек ((2 ДНК-калибратора KSG1, KSG2 (по два повтора) и отрицательный контроль РНК-буфер) для количественного определения ДНК *HHV6* и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК *HHV6*.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации

LOT

Код партии



Максимальное число тестов

IVD

Изделие для in vitro диагностики



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от 15.05.2012 № 2353-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ

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

В.И.Покровский
«15» июня 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения
ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL»

АмплиСенс®



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	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	9
ФОРМАТ FRT	11
СОСТАВ.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	– экзогенный внутренний контрольный образец
ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
K+	– положительный контроль ПЦР
K-	– отрицательный контроль ПЦР
OK	– отрицательный контрол экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПКО	– положительный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
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
EBV	– вирус Эпштейна-Барр
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL» предназначен для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) путем амплификации специфического фрагмента ДНК вируса методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смызов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа, цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов).

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление EBV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

¹ В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

Экстракция ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смызов и мазков из ротоглотки и бронхоальвеолярный лаважа проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракция ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *EBV* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется 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 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК, амплификацию и количественное определение ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Линейный диапазон измерения набора реагентов: **500 – 10 000 000 копий/мл**. Если результат больше, чем 10 000 000 копий/мл, то он выдается как **результат более 10 000 000 копий ДНК EBV /мл**. Если результат меньше чем, 500 копий/мл, то он выдается как **результат менее 500 копий ДНК EBV /мл**.

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность
Плазма периферической крови, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), слюна, смывы и мазки из ротовоглотки, бронхоальвеолярный лаваж	РИБО-преп	400 копий/мл
Цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов	РИБО-преп	5 копий ДНК EBV на 10^5 клеток

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*). Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании панели QCMD, а также при исследовании клинического материала с последующим

подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других вирусов (цитомегаловирус человека, вирус простого герпеса 1 и 2 типа, вирус герпеса 6 и 8 типа, вирус Варицелла-Зостер, *Parvovirus B19* и др.), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* и др.) и ДНК человека.

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 односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

1. ГЕМОЛИТИК (ТУ 9398-097-01897593-2010) – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 2.
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для

выделения ДНК.

5. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
6. Набор реагентов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 2,0 мл (например, Axygen, США) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации. (ЗОНА 2):

8. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
9. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
- 10.Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
- 11.Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
- 12.Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в зависимости от используемого прибора).
- 13.Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C для выделенных проб ДНК.
- 14.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
- 15.Емкость для сброса наконечников.
- 16.Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ

- Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
17. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – 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.

Материалом для исследования служит цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов, слюна, смывы и мазки из ротоглотки, плазма периферической крови, амниотическая жидкость, спинномозговая жидкость (ликвор), бронхоальвеолярный лаваж.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- цельная периферическая и пуповинная кровь

Перед экстракцией необходимо провести предобработку крови: в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» внести отдельным наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмычки осадок клеток должен быть белым, допускается

наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции с помощью комплекта «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к набору реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68°C на длительное время.

- **белые клетки (лейкоцитарная масса) периферической и/или пуповинной крови**

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку с кровью центрифугировать в течение 20 мин при 800-1600 г (3 тыс об/мин), после этого отобрать белую пленку, образующуюся на поверхности отстоявшейся крови. Далее провести предобработку, описанную выше для цельной периферической и пуповинной крови. Допускается хранение белых клеток периферической и пуповинной крови при температуре не выше минус 68 °C в течение длительного времени.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмычки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмычки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL EBV скрин/монитор	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

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

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК <i>EBV</i> и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *EBV*-скрин/монитор-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87 (в каждый образец добавляется 10 мкл ВКО STI-87). В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

A. 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 ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (30 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 60 образцов. Смесь хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций)

2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в качественном формате необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительный (KSG2) и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). А для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации ПЦР: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два повтора и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер).

ФОРМАТ FRT

Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FL EBV скрин/монитор и заранее подготовленную смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**. Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
 - **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL EBV скрин/монитор,**
 - **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).**

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в Приложении 1.

ВНИМАНИЕ! При одновременном исследовании 60 образцов возможна упрощенная схема приготовления смеси: все содержимое одной пробирки с ПЦР-смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL EBV скрин/монитор.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, выделенной из клинических или контрольных образцов.
6. Для проведения качественного анализа:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера;**
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл KSG2.**

Для проведения количественного анализа:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл РНК-буфера;**
- б) **калибраторы KSG1 и KSG2** – внести в две пробирки по **10 мкл** калибратора **KSG1** и в две пробирки по **10 мкл** калибратора **KSG2.**

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

1. Установить пробирки в реакционный модуль.

ФОРМАТ FRT

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора (см. табл. 1а и 1б).

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа³

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темперы	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

Таблица 1б

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁴

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, HEX/ JOE, ROX	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного

³ Например, Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов

⁴ Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

ФОРМАТ FRT

сигнала по двум каналам – анализируются с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

По каналу – **FAM/Green** регистрируется накопление продукта амплификации участка ДНК *β-глобинового гена* (ВКО Glob), по каналу **JOE/HEX/Yellow** – ДНК *EBV* (ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека), по каналу **ROX/Orange** – накопление продукта амплификации участка ДНК ВКО STI-87 (ВКО STI-87).

При экстракции тотальной ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) учитываются результаты по двум каналам: по каналу – **FAM/Green** – регистрируется накопление продукта амплификации участка ДНК *β-глобинового гена* (ВКО Glob), по каналу **JOE/HEX/Yellow** – ДНК *EBV* (ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека).

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, слюны, смывов и мазков из ротоглотки, спинномозговой жидкости (ликвора), бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контролльным образцом учитываются результаты по двум каналам: по каналу **JOE/HEX/Yellow** – ДНК *EBV* (ПКО ДНК *EBV* и ДНК человека), по каналу **ROX/Orange** – накопление продукта амплификации участка ДНК ВКО STI-87 (ВКО STI-87).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов (см. приложения к инструкции для используемого прибора).

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.

Результат амплификации по каналу считается **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct*).

При экстракции тотальной ДНК из суспензии клеток (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК *EBV* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] *EBV*-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *EBV* не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше, а для количественного теста – количество ДНК ВКО Glob более **2000** копий/реакция.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow**, и по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение *Ct* более указанного во вкладыше, а для количественного теста - количество геномов человека на реакцию не превышает **2000** копий/реакция. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу **JOE/Yellow/HEX** превышают порог, указанный во вкладыше,

ФОРМАТ FRT

результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизведимого положительного значения Ct – результат считать положительным. При получении невоспроизведимых в двух повторах значений – результат считается **сомнительным**.

Для качественного теста в случае, если значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора **FAM/Green** превышает указанное во вкладыше, отрицательный **результат считается недостоверным**.

Для количественного теста в случае, если ДНК ВКО Glob менее 2000 копий/реакция количественный положительный или отрицательный **результат считается недостоверным**.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+ (см. табл. 2). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 2

**Результаты постановки контролей ПЦР-исследования
при экстракции тотальной ДНК из суспензии клеток
(цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних
органов)**

Конт- роль	Контроли- руемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green		JOE/HEX/Yellow	
		Качествен- ный формат	Количествен- ный формат	Качествен- ный формат	Количествен- ный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше границного	Определено значение меньше границного	Определено значение меньше границного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше границного	-	Определено значение меньше границного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК *EBV* на стандартное количество клеток (10^5) в контрольных и исследуемых образцах (цельная кровь, лейкоциты крови, биоптаты внутренних органов) провести по формуле:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК } EBV \text{ в ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК Glob в ПЦР-пробе}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right\} = \lg \{ \text{копий ДНК } EBV / 10^5 \text{ клеток} \}$$

Для выражения относительной концентрации ДНК *EBV* в копиях на стандартное количество клеток (например, на 10^5) используется коэффициент пересчета:

$$10^5 \text{ клеток} = 2 \cdot 10^5 \text{ геномов человека}$$

При экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости или спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смызов и мазков из ротовоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним

контрольным образом результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК *EBV* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее значение порогового цикла положительного результата (определение порогового цикла положительного результата описано в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (*EBV*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *EBV*-скрин/монитор-FL»). При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *EBV* не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX/Orange** значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow**, и по каналу для флуорофора **ROX/Orange** значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает значение, указанное во вкладыше. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу **JOE/Yellow/HEX** превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух

повторах значений – результат считается **сомнительным**.

Результаты всего эксперимента считаются достоверными только в том случае, когда получены удовлетворительные результаты прохождения контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+ (см. табл. 3). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 3

Результаты постановки контролей ПЦР- исследований при экстракции ДНК из плазмы периферической крови, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смызов и мазков из ротоглотки, бронхоальвеолярного лаважа совместно с внутренним контрольным образцом

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		JOE/HEX/Yellow		ROX/Orange	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
KSG1, KSG2	ПЦР	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация	-	Определено значение Ct и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации ДНК EBV на мл образца для плазмы периферической крови, амниотической и спинномозговой жидкости (ликвора), слюны, смызов и мазков из ротоглотки,

ФОРМАТ FRT

бронхоальвеолярного лаважа проводится по формуле:

$$\text{КП ДНК } EBV = [\text{КДНК } EBV / \text{KSTI-87}] \times \text{коэффициент ВКО (копий/мл)}$$

К ДНК *EBV* - количество копий ДНК *EBV* в пробе ДНК;
KSTI-87 - количество копий ДНК STI-87 в пробе ДНК;
коэффициент ВКО – соответствует числу копий ВКО ДНК STI-87 в пробе ДНК и указан во вкладыше к каждой серии наборов реагентов и специфичен для каждого лота.

К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны концентрации ПКО *EBV* и ДНК человека, ВКО *STI-87* и ДНК-калибраторов, необходимые для расчета концентраций исследуемых проб и оценки достоверности полученных результатов, а также значения порогового цикла *Ct*.

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 °C не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °C. ПЦР-смесь-1-FL *EBV* скрин/монитор, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °C. ПЦР-смесь-1-FL *EBV* скрин/монитор хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-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) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁵.

Заведующий НПЛ ОМдиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Городская поликлиника № 1»



Е.Л.Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

⁵ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» можно оставить, заполнив анкету потребителя на сайте www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл		10,0	5,0
Число клинических образцов		ПЦР-смесь-1-FL <i>EBV</i> скрин/монитор*	Смесь ПЦР- смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
для количественного определения	для качественного определения		
1	4	70	35
2	5	80	40
3	6	90	45
4	7	100	50
5	8	110	55
6	9	120	60
7	10	130	65
8	11	140	70
9	12	150	75
10	13	160	80
11	14	170	85
12	15	180	90
13	16	190	95
14	17	200	100
15	18	210	105
16	19	220	110
17	20	230	115
18	21	240	120
19	22	250	125
20	23	260	130
21	24	270	135
22	25	280	140
23	26	290	145
24	27	300	150
25	28	310	155
30	33	360	180

* - Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек (2 ДНК-калибратора KSG1, KSG2 (по два повтора) и отрицательный контроль РНК-буфер) для количественного определения ДНК *EBV* и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК *EBV*.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации

LOT

Код партии



Максимальное
число тестов

IVD

Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до

VER

Дата изменения



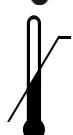
Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



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 27 февраля 2019 года № ФСР 2010/09503

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL" по ТУ 9398-086-01897593-2012

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-25886/8151 от 14.02.2019

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 27 февраля 2019 года № 1464
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

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



Д.Ю. Павлюков

0042493

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 27 февраля 2019 года № ФСР 2010/09503

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL» по ТУ 9398-086-01897593-2012:

Набор выпускается в 1 формате:

Формат FRT.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 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
0054007



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
от 27 февраля 2019 года № ФСР 2012/13957

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL"
по ТУ 9398-176-01897593-2012

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-25876/8158 от 13.02.2019

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 27 февраля 2019 года № 1489
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

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



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

ПРИЛОЖЕНИЕ
К РЕГИСТРАЦИОННОМУ УДОСТОВЕРЕНИЮ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ
от 27 февраля 2019 года № ФСР 2012/13957

Лист 1

На медицинское изделие

Набор реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL" по ТУ 9398-176-01897593-2012:

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

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

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора)

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 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
0058257

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 12.10.12 № 1890-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

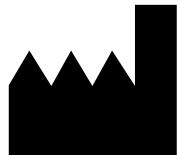
В.И.Покровский
«16.10.» 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-
флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* /
Chlamydophila pneumoniae-FL»**

АмплиСенс®



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	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК.....	13
ФОРМАТ FEP	15
СОСТАВ	15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	17
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	17
Б. Проведение амплификации.....	18
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	19
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	20
ФОРМАТ FRT	23
СОСТАВ	23
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	25
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	26
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	26
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	26
А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT	26
А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	27
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	28
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»	34
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из проб при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG	38
Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора.....	38
Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе.....	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

В-	- Отрицательный контроль экстракции (выделения) ДНК
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- Положительный контроль ПЦР
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
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
ФЕР	- Флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae-FL*» предназначен для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные из образцов следующего материала: мокроты (либо аспираторов из трахеи), промывных вод бронхов, бронхо-альвеолярного лаважа, мазков со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки, секционного материала.

Набор также может использоваться при изучении роли *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в патогенезе неинфекционных хронических заболеваний, например, сердечно - сосудистой системы путем обнаружения ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в цельной крови при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «РИБО-сорб».

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – включает в себя

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС

два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию участков генов «*putative lipoprotein*» *Mycoplasma pneumoniae* и «*ompA*» *Chlamydophila pneumoniae* в присутствии флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). В анализе используется принцип эндогенного внутреннего контроля - амплификация участка гена протромбина человека, что позволяет контролировать присутствие в образце клеток и ДНК человека в достаточном количестве. Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

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

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом преципитации и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке»

Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 4 из 41

Формы комплектации 3, 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке»

Формы комплектации 5, 6 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК/РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора)

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом преципитации и

Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 5 из 41

амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 3, 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 5, 6 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплексы реагентов для экстракции ДНК/РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Возбудитель	Объем материала, мкл	Комплект для экстракции ДНК/РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²
Слизистая нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки и мокрота, обработанные муколизином	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	100	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FEP	1×10^3
			«РИБО-преп»		5×10^2
			NucliSENS easyMAG		5×10^2
			«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F	1×10^3
			«РИБО-преп»		5×10^2
			NucliSENS easyMAG		5×10^2

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных возбудителей. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis*,

² Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

Формат FEP Форма 5: [REF] B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF] H-1765-2-5; Форма 6: [REF] B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF] H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF] R-B42-4x-Mod; [REF] H-1765-1-2; Форма 6: [REF] H-1766-1 / [VER] 15.06.12 / стр. 6 из 41

Staphilococcus aureus, *Staphilococcus saprophyticus*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacteria tuberculosis* 27294 105, *Neisseria flava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *E. coli* ATCC, NCTC, *Enterococcus faecalis*, *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, а также геномной ДНК человека. Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении родственных микроорганизмов: *Chlamydophila arginini*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia suis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma mycoides* (подвид *capri*), *Mycoplasma hyorinis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovine*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma faecium*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma sinoviae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*.

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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однона правленным. 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.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой

и обратиться за медицинской помощью.

- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-2009).
2. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
3. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (503CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
4. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (300202, Deltalab, Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых.
5. Муколизин (ТУ 9398-159-01897593-2011) - реагент для проведения предварительной подготовки мокроты и аспираторов вязкой консистенции.
6. Стерильный физиологический раствор или фосфатный буферный раствор – для предварительной подготовки секционного материала.
7. Фарфоровые ступки с пестиками для гомогенизации секционного материала.
8. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эплендорф» до 12 тыс г.

ЗОНА 1 Экстракция ДНК из исследуемого материала

1. Комплект реагентов для выделения – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора - при работе с формами комплектации 5 и 6 (вариант FEP и вариант FRT).
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
3. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК
Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 9 из 41

(например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

4. Набор реагентов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации.

1. Бокс бактериальной воздушной среды ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия)
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и 200 мкл в штативах (например, Axygen, США).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например «ИнтерЛабСервис», Россия)
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплектом» вариант FEP:

1. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).
2. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

При работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT:

1. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
2. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – 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.

Материалом для исследования служат: мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки, мокрота (либо аспираты из трахеи), бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ), секционный материал (фрагменты пораженной части легких), цельная кровь.

Взятие мазков со слизистой нижнего носового хода

Мазки берут сухим стерильным назофарингеальным велур-тампоном на пластиковом аппликаторе. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд

Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 11 из 41

слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Взятие мазков из ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с вискозными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вискозным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

ВНИМАНИЕ! При взятии мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого сначала берут мазки разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Допускается хранение клинического материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °C или 1 нед при температуре не выше минус 16 °C.

Мокрота или аспират из трахеи

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры, после предварительного полоскания полости рта водой. Аспираты из трахеи получают традиционным способом и помещают в стерильные

герметичные одноразовые пластиковые контейнеры.
Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ) собирают в одноразовые плотно завинчивающиеся емкости из полипропилена (во избежание адгезии клеток на внутренней поверхности емкости) объемом не менее 5 мл.

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия либо исследуют в течение 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Цельную кровь собирают в пробирки типа Vacuette® с раствором или напылением ЭДТА. Закрытую пробирку с материалом несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. Для анализа используют цельную кровь, собранную у пациента утром натощак, без предварительной подготовки. Допускается хранение в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Данный материал не используется для диагностики ОРЗ. Для экстракции ДНК рекомендуется использовать только комплект реагентов «РИБО-сорб».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами и др. материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

Мазки из респираторного тракта. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции ДНК отбирают 100 мкл образца.

Мокрота или аспират из трахеи. Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости,

работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Промывные воды бронхов или бронхо-альвеолярный 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 10 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспенсируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

Секционный материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

ФОРМАТ FEP

ФОРМАТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ³	22,5	1 флакон
Раствор для отмычки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ³	20	1 флакон
Раствор для отмычки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмычки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

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

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

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

³ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмычки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

ФОРМАТ FEP

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae</i> расkapана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок вместимостью 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	4,0	1 флакон
ПКО ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae / Prothrombin</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов
- Амплификация
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- 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 ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae-FL*»,

Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 16 из 41

ФОРМАТ ФЕР

разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», автоматической станцией NucliSENS easyMAG (производства bioMérieux, Франция) и набором реактивов и расходных материалов NucliSENS easyMAG описан в приложениях 1, 2, 3.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

ВНИМАНИЕ! На этапе амплификации для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae* используются 2 пробирки «Фон», положительный контроль амплификации и отрицательный контроль амплификации, предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора при каждой постановке эксперимента. Кроме того, на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции ДНК (В–).

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae* на поверхность застывшего воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться

ФОРМАТ FEP

с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* /
Chlamydophila pneumoniae.

3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без терmostатируемой крышки).
4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* на поверхность застывшего воска внести по **17 мкл ПЦР-смеси-Фон**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР**.
5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* / *Prothrombin***.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из образца **ОКО**.

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

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования / амплификации (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae*

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):						
	«Терцик» («ДНК-технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cycler (Corbett Research), MaxyGene (Axygen)			
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	
0	95 °C	пауза		95 °C	пауза		
1	95 °C	5 мин	1	95 °C	5 мин	1	
2	95 °C	10 с	42	95 °C	10 с	42	
	63 °C	20 с		63 °C	25 с		
	72 °C	20 с		72 °C	25 с		
3	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1	
4	4 °C	хранение		4 °C	хранение		

Примечание – Программы термоциклирования для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по трем каналам для флуорофоров, указанным в табл. 2.

Таблица 2

Соответствие мишеней и каналов детекции

Наименование ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Детекция по каналу для флуорофора		
	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ДНК человека	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к набору реагентов, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae*-FL».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора в соответствии с табл. 2. Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК возбудителя **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу для флуорофора выше установленного порогового значения положительного результата, указанного во вкладыше к набору.
- ДНК возбудителя **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу для флуорофора JOE (ВКО – ДНК человека) выше установленного порогового значения.

ФОРМАТ ФЕР

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу для детекции данной мишени (см. табл. 2) ниже установленного порогового значения и сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже установленного порогового значения. Для образцов «К–» и «В–» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по каналу для детекции ДНК возбудителя выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями), а сигнал по каналу для флуорофора JOE (ВКО – ДНК человека) выше установленного порогового значения. Если для пробы получен **сомнительный** результат, требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторении **сомнительного** результата рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3
Результаты анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
		Детекция <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Детекция ДНК человека	Детекция <i>Chlamydophila pneumoniae</i>
В–	Экстракция НК	<u>Ниже</u> порогового значения* отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
К–	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
К+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата

ФОРМАТ FEP

* - Пороговые значения указаны во вкладыше к набору реагентов

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение уровня флуоресценции ниже порогового значения положительного результата по соответствующему каналу детекции, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных по данному каналу клинических образцов и положительного контроля ПЦР.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу детекции какой-либо мишени выше граничного значения отрицательного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена данная мишень, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить последствия возможной контаминации.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	<i>Вариант 50</i>		<i>Вариант 100</i>	
		<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁵	22,5	1 флакон	45	1 флакон
Раствор для отмычки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ³	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмычки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
Раствор для отмычки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка	1,25	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок	0,5	10 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

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

Реактив	Описание	<i>Вариант 50</i>		<i>Вариант 100</i>	
		<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁶	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмычки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон	50	1 флакон

⁵ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмычки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

⁶ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Раствор для отмычки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i> / <i>Prothrombin</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT (F) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i> / Prothrombin	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация 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 ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», автоматической станцией NucliSENS easyMAG (производства bioMérieux, Франция) и набором реактивов и расходных материалов NucliSENS easyMAG описан в приложениях 1, 2, 3.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! На этапе амплификации при каждой постановке реакции используются положительный контроль амплификации и отрицательный контроль амплификации, предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора. Кроме того, на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции ДНК (В–).

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

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

A. Подготовка пробирок для амплификации

A1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
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 *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae***.

ФОРМАТ FRT

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл** проб **ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae / Prothrombin***.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из образца **В–**.
5. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки кратким центрифугированием (1–2 с) с помощью центрифуги/вортекса (для приборов планшетного типа).

A2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

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

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae***, **ПЦР-смесью-2-FRT** и **полимеразой (TaqF)**. Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смесью-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae***, **ПЦР-смесью-2-FRT** и **полимераза (TaqF)** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР) смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смесью-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae***, **5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT** и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**.
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.

ФОРМАТ FRT

6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae/ Prothrombin***.
8. **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из образца **В–**. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки кратким центрифугированием (1–2 с) с помощью центрифуги/вортекса (для приборов планшетного типа).

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 4.).

Таблица 4.

Программа амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* вариант FRT

Приборы роторного типа ⁷				Приборы планшетного типа ⁸		
Цикл	Темпера-тура, °C	Время	Кол-во циклов	Темпера-тура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин (для формата FRT) или 15 мин (для формата FRT-100 F)	1	95	5 мин (для формата FRT) или 15 мин (для формата FRT-100 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	60	20 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
		10 с			72	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX.

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

Примечание – Программа термоциклирования для конкретной модели амплификатора описана в методических рекомендациях «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL».

⁷ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁸ Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов в соответствии с табл. 5 с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла Ct в соответствующей граfe в таблице результатов.

Таблица 5

Соответствие мишеней и каналов детекции

Наименование ПЦР-смеси-1	Детекция по каналу для флуорофора		
	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ДНК человека	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
ПЦР-смесь-1-FRT (F) <i>Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ДНК человека	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК возбудителя **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу (см. табл. 5) определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК возбудителя **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу (см. табл. 5) отсутствует значение порогового цикла Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), или превышает указанное во вкладыше граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** (ВКО –

ФОРМАТ FRT

ДНК человека) определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное граничное значение.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналам для флуорофоров (**FAM** или **ROX**) или превышает указанное граничное значение (см. табл. 6), и по каналу для флуорофора для ВКО (**JOE**) значение Ct также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше к набору реагентов и в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] *Mycoplasma pneumoniae / Chlamydophila pneumoniae*-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 6).

Таблица 6
Результаты анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
		Детекция <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Детекция ДНК человека	Детекция <i>Chlamydophila pneumoniae</i>
В-	Экстракция РНК	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
К+	ПЦР	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения	<u>Меньше</u> порогового значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу детекции какого-либо гена-мишени отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных по данному каналу клинических образцов и положительного контроля ПЦР.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу детекции какой-либо мишени меньше граничного значения, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена данная мишень, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить последствия возможной контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Для всех форм комплектации варианта FEP – 9 мес. Для форм комплектации 1, 2, 5 (формат FRT) – 9 мес. Для форм комплектации 3, 4, 6 (формат FRT-100 F) – 12 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 °C не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °C. ПЦР-смесь-2-FRT, реагенты ПЦР-смесь-1-FRT (F), полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °C. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* и ПЦР-смесь-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-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) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁹.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации

Е.Н. Родионова

Е.Л.Никонов



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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмычки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре от 60 до 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с фильтрами. Перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре от 3 до 5 мин.
4. В пробирку отрицательного контроля (В–) выделения внести **100 мкл ОКО**.
5. Плотно закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
6. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
7. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмычки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость,

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмычки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Повторить отмычку **раствором для отмычки 3**, следуя п. 9.
11. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмычки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °C на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
13. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтрами, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °C на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12–13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке амплификации.
Отбирать раствор ДНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.
Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C, более длительно при температуре не выше минус 68 °C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы:

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтрами. В пробирку отрицательного контроля (В-) выделения внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °C** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмычки** 3, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.

Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 36 из 41

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

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

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C, более длительно при температуре не выше минус 68 °C.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из проб при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG

Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора

Данный метод выделения позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

Порядок работы:

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения ДНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – 25 mkl, тип образца (*Type*) – Lysed, очередьность выделения ДНК в образцах (*priority*) – normal.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: *On-board Lysis Buffer Dispensing - No, On-board Lysis Incubation - No*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объёмом 1,5 мл. После окончания инкубации (см. п. 8) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с раствором для лизиса внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 38 из 41

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

аэрозольным барьером и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)

7. В пробирку отрицательного контроля выделения (В-) выделения внести **100 мкл ОКО**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспензировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения ДНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
11. После окончания выделения ДНК, извлечь пробирки из прибора.

При необходимости хранения очищенные ДНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после экстракции. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C, более длительно при температуре не выше минус 68 °C.

Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе.

Порядок работы:

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению ДНК, следя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения ДНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **25 mkl**, тип образца (*Type*) – Primary, очередность выделения ДНК в образцах (*priority*) - normal.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing* – Yes,

Формат FEP Форма 5: **[REF]** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **[REF]** H-1765-2-5; Форма 6: **[REF]** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **[REF]** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **[REF]** R-B42-4x-Mod; **[REF]** H-1765-1-2; Форма 6: **[REF]** H-1766-1 / **[VER]** 15.06.12 / стр. 39 из 41

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

On-board Lysis Incubation – Yes.

4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения).
6. В пробирки внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (В–) внести **100 мкл ОКО**.
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения ДНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении *Instrument State – Idle*.
10. Ресуспендировать пробирку **с магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу выделения ДНК.
12. После окончания выделения ДНК, извлечь пробирки из прибора.

При необходимости хранения очищенные ДНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после экстракции. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C, более длительно при температуре не выше минус 68 °C.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации

LOT

Код партии



Максимальное число тестов

IVD

Изделие для *in vitro* диагностики



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель