

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин
2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*- скрин/монитор-FL

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	15
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	17
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	19
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	23
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)	24
СОСТАВ.....	24
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	24
А. Подготовка проб для амплификации	24
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	25
В. Анализ и интерпретация результатов	26
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	30
СОСТАВ.....	30
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	30
А. Подготовка проб для амплификации	30
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	31
В. Анализ и интерпретация результатов	32
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	36
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	36
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
OK	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL, далее – набор реагентов, предназначен для количественного определения ДНК *Streptococcus pyogenes* в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки ротоглотки, цельная кровь, тканевой (биопсийный, операционный) материал, синовиальная жидкость, отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи, спинномозговая жидкость (ликвор), моча) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которого лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на бактериальную инфекцию (инфекцию, вызываемую *Streptococcus pyogenes*).

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды, которые гибридируются 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».

Количественное определение ДНК *Streptococcus pyogenes* возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, *Ct*). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. ДНК-калибраторы аттестованы по методике Изготовителя в соответствии с пунктом 5.6. ГОСТ ISO17511-2011. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится

калибровочная прямая, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

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

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация ДНК *Streptococcus pyogenes*, а также амплификация последовательности ДНК ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *Streptococcus pyogenes*, а также последовательности ДНК ВКО-FL регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i>
Область амплификации	Искусственная нуклеотидная последовательность	ген эритрогенного токсина В (<i>speB</i>)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Диапазон измерения и предел обнаружения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции и ДНК	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, ГЭ/мл	Диапазон измерения, ГЭ/мл
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN, FRT-L	4×10^2	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
Цельная кровь	—				
Тканевой (биопсийный, операционный) материал	Транспортная среда с муколитиком (TCM)				
Спинномозговая жидкость (ликвор)	—				
Синовиальная жидкость	—				
Отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи	Транспортная среда с муколитиком (TCM)				
Моча	—				

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК *Streptococcus pyogenes* – в штамме *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615™ из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации $\geq 1 \times 10^7$ ГЭ/мл. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также ДНК человека:

- Штаммы *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606™, *Candida albicans* ATCC® 14053™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Haemophilus influenzae* ATCC® 33930™, *Klebsiella oxytoca* ATCC® 49131™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 27736™, *Listeria grayi* ATCC® 25401™, *Listeria innocua* ATCC® 33090™, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 25240™, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 19424™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13102™, *Neisseria meningitidis* ATCC® 13090™, *Proteus mirabilis* ATCC® 12453™, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC®15442™, *Staphylococcus aureus* ATCC®6538P™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC®12228™, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC®29970™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC®49907™, *Streptococcus agalactiae* ATCC®12386™ из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) в концентрации $\geq 1 \cdot 10^7$ ГЭ/мл;

- Штаммы *Human gammaherpesvirus* 4 NIBSC №09/260 в концентрации = $5 \cdot 10^6$ МЕ/мл, *Human polyomavirus* 1 NIBSC №14/212 в концентрации = $2 \cdot 10^7$ МЕ/мл, *Human polyomavirus* 2 NIBSC №14/114 в концентрации = $1 \cdot 10^7$ МЕ/мл, *Primate erythroparvovirus* NIBSC № 99/802 в концентрации = $5 \cdot 10^5$ МЕ/мл, *Human betaherpesvirus* 5 NIBSC № 09/162 в концентрации = $5 \cdot 10^6$ МЕ/мл из коллекции NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, UK);
- Клинические изоляты панели штаммов и изолятов, находящейся в распоряжении ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Enterovirus* spp., *Human alphaherpesvirus* 1, *Human alphaherpesvirus* 2, *Human alphaherpesvirus* 3, *Human betaherpesvirus* 6A, *Human betaherpesvirus* 6B, *Human betaherpesvirus* 7, *Pneumocystis jirovecii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Toxoplasma gondii* в концентрации $\geq 1 \cdot 10^4$ ГЭ/мл;
- ДНК человека, производства Sigma Aldrich, США в концентрации $\geq 1 \cdot 10^6$ ГЭ/мл.

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

Информация об известных интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования стандартного образца предприятия (СОП ПКО ДНК *Streptococcus pyogenes*) с концентрациями $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^5$ и $1 \cdot 10^4$ ГЭ/мл, находящимися в пределах диапазона измерения.

Таблица 3

Воспроизводимость

Комплект для амплификации	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN	1x10 ⁶	80	6,07	0,05	0,83
	1x10 ⁵	80	5,12	0,05	1,01
	1x10 ⁴	80	4,12	0,06	1,45
«ПЦР-комплект» вариант FRT-L	1x10 ⁶	80	6,11	0,08	1,29
	1x10 ⁵	80	5,16	0,09	1,71
	1x10 ⁴	80	4,13	0,09	2,21

Таблица 4

Повторяемость

Комплект для амплификации	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN	1x10 ⁶	40	6,05	0,03	0,48
	1x10 ⁵	40	5,03	0,04	0,84
	1x10 ⁴	40	4,05	0,05	1,14
«ПЦР-комплект» вариант FRT-L	1x10 ⁶	40	6,07	0,03	0,54
	1x10 ⁵	40	5,07	0,05	0,89
	1x10 ⁴	40	4,09	0,06	1,39

Правильность была определена путем тестирования стандартного образца предприятия (СОП ПК ДНК *Streptococcus pyogenes*) с известной концентрацией.

Таблица 5

Правильность

Комплект для амплификации	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение, lg	Систематическая погрешность (B), %
ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN	100	6,78	6,78	0,00
«ПЦР-комплект» вариант FRT-L	100	6,72	6,78	0,91

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для подтверждения диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL были использованы образцы биологического материала (мазки со слизистой оболочки ротоглотки, цельная кровь, тканевой материал, синовиальная жидкость, отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи, спинномозговая жидкость (ликвор), моча), полученные от 550

пациентов со стрептококковой инфекцией и от 210 пациентов без стрептококковой инфекции.

Таблица 6

**Результаты тестирования набора реагентов для диагностики in vitro
АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL**

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® <i>Streptococcus pyogenes</i> -скрин/монитор-FL		Результаты применения метода сравнения ¹	
			Положительных	Отрицательных
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	Всего исследовано 230 образцов	положительных	134	0
		отрицательных	0	96
Цельная кровь	Всего исследовано 80 образцов	положительных	31	0
		отрицательных	0	49
Тканевой (биопсийный, операционный) материал	Всего исследовано 80 образцов	положительных	29	0
		отрицательных	0	51
Синовиальная жидкость	Всего исследовано 80 образцов	положительных	33	0
		отрицательных	0	47
Отделяемое эрозивно- язвенных поражений кожи	Всего исследовано 80 образцов	положительных	28	0
		отрицательных	0	52
Спинномозговая жидкость (ликвор)	Всего исследовано 80 образцов	положительных	26	0
		отрицательных	0	54
Моча	Всего исследовано 130 образцов	положительных	63	0
		отрицательных	0	67

¹ Бактериологический посев на питательную среду «PYR агар для выделения и идентификации *S.pyogenes* (PYR Agar)», РУ № ФСЗ 2009/03709.

**Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro
АмплиСенс® *Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале%	Диагностическая специфичность, (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале%
Мазок со слизистой оболочки ротоглотки	97,2 - 100	96,2-100
Цельная кровь	88,7-100	92,7-100
Тканевой (биопсийный, операционный) материал	88,0-100	93,0-100
Синовиальная жидкость	89,4-100	92,4-100
Отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи	87,6-100	93,1-100
Спинальная жидкость (ликвор)	86,7-100	93,4-100
Моча	94,3-100	94,6-100

Корреляция значений концентрации ДНК *Streptococcus pyogenes* со значениями, полученными с помощью референтного метода².

Было проанализировано 344 образца различных видов биологического материала, содержащих ДНК *Streptococcus pyogenes* в концентрации от 400 до $9,9 \times 10^6$ ГЭ/мл.

Величина достоверности аппроксимации (R^2) для каждого вида биологического материала составила выше 80%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до 28 °С, относительная влажность – от 15 до 75%.

² Система QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР (QX100 droplet digital PCR), РУ № ФСЗ 2012/13278.

- 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, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁴. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) 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.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять

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

⁴ Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

набор реагентов строго по назначению.

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Реагент для транспортировки и хранения биологического материала «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ПУ № ФСР 2009/05514) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Реагент для взятия, транспортировки и хранения мазков из верхних дыхательных путей «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
3. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, ООО «Юникорнмед», Россия, или аналогичный).
4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
5. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
6. Вакуумная пробирка и устройство для переноса мочи (например, BD Vacutainer Plus Urine Tube и BD Vacutainer Urine Transfer Straw, Becton Dickinson and Company («Бектон Дикинсон энд Компани»), США или аналогичные).
7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Ахуген, Инк. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

8. Реагент «ГЕМОЛИТИК» (ПУ № ФСР 2010/09505) для предобработки цельной периферической и пуповинной крови.
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Ахуген, Инк. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, Инк. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Инк. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
13. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing

Corporation («Эппендорф Мануфактуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

14. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

15. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).

16. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

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

18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

19. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

20. Комплект реагентов для экстракции ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.

21. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

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

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

23. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

24. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
25. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
26. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
27. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
28. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
29. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
30. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
31. Емкость для сброса наконечников.
32. ПО для автоматической обработки результатов, зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки ротоглотки,
- цельная кровь,
- тканевой (биопсийный, операционный) материал,
- синовиальная жидкость,
- отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи,
- спинномозговая жидкость (ликвор),
- моча.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие мазков производят при помощи сухого стерильного зонда-тампона вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия мазка рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставляют рабочую часть зонда с материалом в

пробирке. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Цельная кровь

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку (специальная вакуумная система типа «Vacuette®» (сиреневые крышки – 6% EDTA)) с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (В противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Тканевой (биопсийный, операционный) материал

Материал следует забирать из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка.

Кусочки ткани диаметром не более 5 мм следует поместить в одноразовые пробирки объемом 2,0 мл с 500 мкл Транспортной среды с муколитиком (ТСМ).

Кусочки ткани диаметром более 5 мм помещают в одноразовые пластиковые контейнеры с широким горлом объемом не менее 50 мл.

Синовиальная жидкость

Синовиальную жидкость следует забирать с помощью одноразовых игл в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые пробирки объемом 2,0 мл.

Отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи

Образцы отделяемого эрозивно-язвенных поражений кожи получают при помощи сухого стерильного зонда-тампона вращательными движениями с эрозивно-язвенного поражения кожи.

После взятия мазка рабочую часть зонда помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды с муколитиком (ТСМ). Аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставляют рабочую часть зонда с материалом в пробирке. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Спинномозговая жидкость (ликвор)

Спинномозговую жидкость (ликвор) получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Забор спинномозговой жидкости (ликвора) в количестве не менее 1 мл проводят в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2,0 мл.

Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не более 15 мл в вакуумную пробирку с помощью набора Вакутейнер. Допускается забор мочи в пластиковые стерильный контейнеры объемом 60 мл.

Допускается хранение образцов вышеперечисленного материала до проведения предобработки/ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 8 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года (кроме образцов цельной крови и мочи). Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови и мочи!

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы мазков со слизистой оболочки ротоглотки и отделяемого эрозивно-язвенных поражений кожи не требуют предварительной подготовки.

Цельная кровь, тканевой (биопсийный, операционный) материал, синовиальная жидкость, отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи, спинномозговая жидкость (ликвор), моча требуют предварительной подготовки.

Образцы цельной крови

Отобрать 1,0 мл цельной крови в одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8-9 тыс g (например, 12-13 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Отобрать плазму. К осадку добавить 1 мл «Гемолитика». Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 15 мин при комнатной температуре (от 18 до 25°С), периодически перемешивая на вортексе. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 4 тыс g (8 тыс об/мин) в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, оставив 100 мкл осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку «Гемолитиком». Полученный осадок должен быть немедленно лизирован (в случае экстракции комплектом «РИБО-преп» добавить 300 мкл раствора для лизиса и в последующем экстрагировать ДНК в соответствии с

инструкцией к комплекту реагентов «РИБО-преп», не добавляя раствор для лизиса повторно).

Допускается хранение предобработанных с помощью раствора для лизиса образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 6 часов;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Образцы тканевого материала (биопсийный, операционный)

Тканевой материал (биопсийный, операционный) диаметром 5-10 мм поместить в стерильную фарфоровую ступу и измельчить пестиком. В полученный гомогенат добавить 1 мл транспортной среды с муколитиком (ТСМ) и тщательно перемешать пестиком. 100 мкл полученной суспензии используют для экстракции ДНК.

Тканевой материал (биопсийный, операционный) диаметром менее 5 мм поместить в стерильную фарфоровую ступу и измельчить пестиком. В полученный гомогенат добавить 0,5 мл транспортной среды с муколитиком (ТСМ) и тщательно перемешать пестиком. 100 мкл полученной суспензии используют для экстракции ДНК.

Образцы синовиальной жидкости

В одноразовую пробирку объемом 1,5 мл отобрать 1 мл синовиальной жидкости. Центрифугировать в течение 5 мин при 8-9 тыс g (например, 12-13 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Отобрать надосадочную жидкость, оставив 100 мкл осадка для последующей экстракции ДНК.

Образцы спинномозговой жидкости (ликвора)

В одноразовую пробирку объемом 1,5 мл отобрать 1 мл спинномозговой жидкости (ликвора). Центрифугировать в течение 5 мин при 8-9 тыс g (например, 12-13 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Отобрать надосадочную жидкость, оставив 100 мкл осадка для последующей экстракции ДНК.

Образцы мочи

В одноразовую пробирку объемом 1,5 мл отобрать 1 мл мочи. Центрифугировать в течение 5 мин при 8-9 тыс g (например, 12-13 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Отобрать надосадочную жидкость, оставив 100 мкл осадка. Добавить к осадку 100 мкл транспортной среды с муколитиком (ТСМ) и тщательно перемешать на вортексе. Экстракцию проводить из 100 мкл образца.

Допускается хранение предобработанных образцов вышеперечисленного

материала (кроме образцов крови) до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года;
- при температуре не выше 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются:

- образцы биологического материала собранные более чем за 48 часов до момента доставки в лабораторию;
- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта;
- образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

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

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки ротоглотки, цельная кровь, тканевой (биопсийный, операционный) материал, синовиальная жидкость, отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи, спинномозговая жидкость (ликвор), моча), используемом для исследования.

Цельная кровь

Были протестированы образцы цельной венозной крови, взятые в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта без добавления и с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, превышающих верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ в цельной крови (см.табл. 8).

Для оценки влияния экзогенных веществ (антикоагулянтов), были протестированы образцы цельной венозной крови, взятые в пробирки с гепарином и в пробирки с ЭДТА

в качестве антикоагулянтов (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах цельной крови с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторях.

Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Были протестированы мазки со слизистой оболочки ротоглотки без добавления и с добавлением экзогенных потенциально интерферирующих веществ, таких как хлоргексидин (раствор для местного и наружного применения, 5 %), Стоматофит® (раствор для местного применения, 15 %) и Мирамистин® (раствор для местного применения, 0,01 %). Концентрация хлоргексидина в образце составила 0,5 %, Стоматофита® – 1,5 %, Мирамистина® – 0,001 % (см. табл. 8).

Тестирование проводили на мазках со слизистой оболочки ротоглотки с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторях.

Моча

Для оценки влияния высоких концентраций эндогенных веществ были протестированы образцы мочи с повышенным содержанием альбумина (500 мг/л). Также были протестированы образцы мочи с кислотностью выше и ниже нормы (pH 4,0; pH 9,0) (см. табл. 8).

Для оценки влияния экзогенного потенциально интерферирующего вещества – азитромицина, были протестированы образцы мочи, с добавлением препарата. Концентрация вещества в образце составила 0,8 мг/мл (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах мочи с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторях.

Отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи

Были протестированы образцы отделяемого эрозивно-язвенных поражений кожи без добавления и с добавлением экзогенного потенциально интерферирующего вещества, такого как йод (раствор для наружного применения, 5%). Концентрация препарата в образце составила 0,5% (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах отделяемого эрозивно-язвенных поражений кожи с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторях.

Спинномозговая жидкость

Для оценки влияния высоких концентраций эндогенных веществ / компонентов были протестированы образцы спинномозговой жидкости (ликвора) с повышенным содержанием глюкозы (10 ммоль/л) и с повышенным содержанием лейкоцитов (500 /мм³) (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах ликвора с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторах.

Синовиальная жидкость

Были протестированы образцы синовиальной жидкости без добавления и с добавлением экзогенного потенциально интерферирующего вещества, такого как цефазолина натриевая соль. Концентрация препарата в образце составила 64 мкг/мл (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах синовиальной жидкости с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторах.

Тканевой (биопсийный, операционный) материал

Были протестированы образцы тканевого материала без добавления и с добавлением экзогенного потенциально интерферирующего вещества, такого как цефтриаксон. Концентрация препарата в образце составила 257 мкг/мл (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах тканевого материала с добавлением штамма *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615™ в двух концентрациях – 1×10^5 и 4×10^2 ГЭ/мл. Каждый образец исследовался в двух повторах.

Таблица 8

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Цельная кровь	Эндогенные вещества	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Общий холестерин	78 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	Не обнаружено
		Триглицериды	37,0 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Не обнаружено
		Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества ⁵	Калия ЭДТА	до 2,0 мг/мл	Не обнаружено
		Лития гепарин	от 12 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	Экзогенные вещества	Хлоргексидин	0,5 %	Не обнаружено
		Стоматофит®	1,5 %	Не обнаружено
		Мирамистин®	0,001 %	Не обнаружено
Моча	Эндогенные вещества	Защеление мочи	pH 4,0 (значение pH в норме 5,0 - 7,0)	Не обнаружено
		Ощелачивание мочи	pH 9,0 (значение pH в норме 5,0 - 7,0)	Не обнаружено
		Альбумин	500 мг/л (верхняя граница нормы – 20 мг/л)	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Азитромицин	0,8 мг/мл	Не обнаружено
Отделяемое эрозивно-язвенных поражений кожи	Экзогенные вещества	Йод (калия йодид)	0,5%	Не обнаружено
Спинномозговая жидкость	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,89 ммоль/л)	Не обнаружено
		Лейкоциты	500 /мм ³ (верхняя граница нормы – 20 /мм ³)	Не обнаружено
Синовиальная жидкость	Экзогенные вещества	Цефазолина натрия соль	64 мкг/мл	Не обнаружено
Тканевой (биопсийный, операционный) материал	Экзогенные вещества	Цефтриаксон	257 мкг/мл	Не обнаружено

⁵ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем. Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

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

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

Объем ВКО – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

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

В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 10 мкл ПКО *Streptococcus pyogenes* и 90 мкл ОКО.

Объем элюции – 50 мкл.

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Streptococcus pyogenes* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Streptococcus pyogenes</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 SP	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 SP	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
BKO-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО <i>Streptococcus pyogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

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

плюс запас на несколько реакций.

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

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Streptococcus pyogenes* и ПЦР-буфером-Н. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-FL *Streptococcus pyogenes*, ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL *Streptococcus pyogenes* и ПЦР-буфера-Н, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **ДНК-калибратор К1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К1 SP**.
 - б) **ДНК-калибратор К2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К2 SP**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
 - г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ПКО *Streptococcus pyogenes*.

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 9

**Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«АмплиСенс» для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типа**

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

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

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

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

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

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁷ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

«реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i>

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

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений ГЭ *Streptococcus pyogenes* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> не выявлена	Значение Ct для ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> отсутствует или превышает пороговое значение, а по каналу для флуорофора FAM определено значение Ct меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> не выявлена .
менее 1×10^3 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как менее 1×10^3 ГЭ <i>Streptococcus pyogenes</i>/мл .
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> выявлена в концентрации $X.XX \times 10^y$ ГЭ/мл .
более 1×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как более 1×10^7 ГЭ <i>Streptococcus pyogenes</i>/мл . Если требуется получение точного количественного

	результата, необходимо развести реагентом К– экстрагированный образец ДНК (например, в 100 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца.
--	---

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

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

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного	значение C_t отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного	<u>определено</u> значение C_t меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон
К–	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение C_t и расчетная концентрация

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t и диапазон концентрации ПКО *Streptococcus pyogenes* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

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

повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Streptococcus pyogenes* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в количественном формате. Комплект реагентов включает:

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

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

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

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

3. Поставить контрольные реакции:

а) ДНК-калибратор K1 – в две пробирки с реакционной смесью внести по 25 мкл

K1 SP в каждую.

б) **ДНК-калибратор K2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **25 мкл K2 SP** в каждую.

а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

б) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Streptococcus pyogenes***.

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

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 13

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁸ и планшетного⁹ типа

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

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

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

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

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

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

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

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i>

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений ГЭ *Streptococcus pyogenes* в 1

мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 15

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении ПЦР-исследования**

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> отсутствует или превышает пороговое значение, а по каналу для флуорофора FAM определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> не выявлена .
менее 1×10^3 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как менее 1×10^3 ГЭ <i>Streptococcus pyogenes</i>/мл .
$X \times 10^Y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> выявлена в концентрации $X.XX \times 10^Y$ ГЭ/мл .
более 1×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как более 1×10^7 ГЭ <i>Streptococcus pyogenes</i>/мл . Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести реагентом К– экстрагированный образец ДНК (например, в 100 раз) и повторить тестирование с этапа амплификации. Полученный при повторном тестировании результат необходимо умножить на коэффициент разведения образца.

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

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 15 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	значение <i>Ct</i> отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон
К–	ПЦР	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
2. Рассчитанная концентрация ПКО *Streptococcus pyogenes* не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена

специфическая ДНК.

5. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствует значение порогового цикла (C_t) и расчетная концентрация по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 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 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL *Streptococcus pyogenes* и ПЦР-буфера-Н. ПЦР-смесь-FL *Streptococcus pyogenes* и ПЦР-буфер-Н хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Streptococcus pyogenes* хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *Streptococcus pyogenes*-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

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

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется

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

направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

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



Е.В. Ржевская

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 38 лист 06

Директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



В.Е. Акимкин



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



Краткое руководство

набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Streptococcus* *pyogenes*-скрин/монитор-FL

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L



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

IVD

VER 03.12.18

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Рекомендуемые комплекты:

- «РИБО-преп» и другие, рекомендованные Изготовителем;

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

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

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
ОКО + ПК <i>Streptococcus pyogenes</i>	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля экстракции)
Элюция		
Все образцы	50 мкл	в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-100FN

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

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

Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.

Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *Streptococcus pyogenes* и ПЦР-буфером-Н**.

В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смеси-FL <i>Streptococcus pyogenes</i>	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-Н	$5 \cdot (N+K+1)$	

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

Внести по 15 мкл

Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
----------------------------------	-------------------

Внести по 10 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
--	-------------------------------------

Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК
-----------------------------------	-------------------

Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК
-----------------------------------	-------------------

K1 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K1
-------	-------------------------------------

K2 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K2
-------	-------------------------------------

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

ПОДГОТОВКА ПРОБИРОК ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

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

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

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью *Streptococcus pyogenes*-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов
--	-------------------------------------

Пробы ДНК, экстрагированной из ОК	в пробирку для ОК
-----------------------------------	-------------------

Пробы ДНК, экстрагированной из ПК	в пробирку для ПК
-----------------------------------	-------------------

K1 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K1
-------	-------------------------------------

K2 SP	в 2 пробирки для ДНК-калибратора K2
-------	-------------------------------------

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

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			Кол-во циклов
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE	

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

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

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

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Streptococcus pyogenes</i>

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

На основании полученных значений порогового цикла (C_t) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений ГЭ ДНК *Streptococcus pyogenes* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

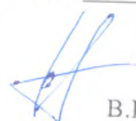
ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны значения концентраций калибраторов, диапазон концентраций ПКО *Streptococcus pyogenes* и граничные значения C_t , необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: _____
Трч лист а

Директор ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии
Роспотребнадзора

« 03 » декабря 20 18 г.



В.Г. Акимкин

