

СОГЛАСОВАНО

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

2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
стандартного образца предприятия № 284 «Положительный
контрольный образец, содержащий ДНК Plasmodium
vivax»
(СОП № 284 ПКО ДНК P.vivax)



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

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 284 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Plasmodium vivax*» (СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*), предназначенного для проведения испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Plasmodium spp.* / *P. falciparum* / *P. Vivax-FL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* и при постановке ПЦР следует соблюдать положения 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:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытуемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытуемого набора реагентов.

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

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* и дать нагреться до комнатной температуры. СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* должен представлять собой прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений и посторонних примесей. Оценивают визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* перемешивают и осаждают капли на вортексе. Открывают пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отбирают необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрывают. СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* используется совместно с СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp* и СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum*.

5.2 Готовят разведения, указанные в ТУ испытуемого набора реагентов с использованием ДНК-буфера с poly(A), приложенного к СОП. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10^7 копий/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10^7 копий/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10^7 копий/мл.

Разведения готовятся по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, разводится N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение проводят согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N=A \quad (2)$$

$$C-A=B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 копий/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления **C** мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ДНК-буфера с poly(A), который необходимо взять для приготовления **C** мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m копий/мл разводится последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ испытуемого набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, готовят последующие разведения, указанные в ТУ, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, из СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* ($4,5 \times 10^6$ коп/мл), СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* (2×10^6 коп/мл) и СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* (1×10^6 коп/мл) необходимо приготовить смешанный СОП *Plasmodium spp./P.falciparum/P.vivax* с концентрацией каждого компонента 5×10^3 , 1×10^3 и 2×10^2 коп/мл:

- маркируют микропробирки вместимостью 1,5 мл « 5×10^5 » « 5×10^3 », « 1×10^3 » и « 2×10^2 ».

- в микропробирку, маркированную « 5×10^5 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 14 мкл ДНК-буфера с poly(A), 11 мкл СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.*, 25 мкл СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* и 50 мкл СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*, тщательно перемешивают и осаждают капли с крышки пробирки на вортексе;

- в микропробирку, маркированную « 5×10^3 » вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером 495 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 5 мкл из микропробирки, маркированной « 5×10^5 », тщательно перемешивают и осаждают капли с крышки пробирки на вортексе;
- в микропробирку, маркированную « 1×10^3 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 450 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 50 мкл из микропробирки маркированной « 5×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.
- в микропробирку, маркированную « 2×10^2 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 450 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 50 мкл из микропробирки маркированной « 1×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

5.3 Далее проводится экстракция ДНК *Plasmodium vivax* из разведений СОП, ПЦР, детекция продуктов ПЦР и учет результатов в соответствии с ТУ испытуемого набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 284 ПКО ДНК <i>P.vivax</i>	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер с poly(A)	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВOK И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
серия лист 2



Руководитель подразделения развития и качества продукции
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 60/20 от 17.04.2020 г.)

« 18 » 06 20 20 г. Е.А. Козлова

М.П.

[Handwritten signature]

СОГЛАСОВАНО

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

« 10 » сентября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
стандартного образца предприятия № 275 «Положительный
контрольный образец, содержащий ДНК Plasmodium
spp.»
(СОП № 275 ПКО ДНК Plasmodium spp.)



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

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 275 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Plasmodium spp.*» (СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.*), предназначенного для проведения испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Plasmodium spp.* / *P. falciparum* / *P. Vivax*-FL методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* и при постановке ПЦР следует соблюдать положения 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:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытуемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытуемого набора реагентов.

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

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* и дать нагреться до комнатной температуры. СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* должен представлять собой прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений и посторонних примесей. Оценивают визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium* spp. перемешивают и осаждают капли на вортексе. Открывают пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отбирают необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрывают. СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium* spp. используется совместно с СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* и СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*.

5.2 Готовят разведения, указанные в ТУ испытуемого набора реагентов с использованием ДНК-буфера с poly(A), приложенного к СОП. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10^7 копий/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10^7 копий/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10^7 копий/мл.

Разведения готовятся по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, разводится N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение проводят согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N=A \quad (2)$$

$$C-A=B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium* spp.,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 копий/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления **C** мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ДНК-буфера с poly(A), который необходимо взять для приготовления **C** мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m копий/мл разводится последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ испытуемого набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, готовят последующие разведения, указанные в ТУ, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, из СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium* spp. ($4,5 \times 10^6$ коп/мл), СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* (2×10^6 коп/мл) и СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* (1×10^6 коп/мл) необходимо приготовить смешанный СОП *Plasmodium* spp./*P.falciparum*/*P.vivax* с концентрацией каждого компонента 5×10^3 , 1×10^3 и 2×10^2 коп/мл:

- маркируют микропробирки вместимостью 1,5 мл « 5×10^5 » « 5×10^3 », « 1×10^3 » и « 2×10^2 ».

- в микропробирку, маркированную « 5×10^5 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 14 мкл ДНК-буфера с poly(A), 11 мкл СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium* spp., 25 мкл СОП № 283 ПКО ДНК

P. falciparum и и 50 мкл СОП № 284 ПКО ДНК *P. vivax*, тщательно перемешивают и осаждают капли с крышки пробирки на вортексе;

- в микропробирку, маркированную « 5×10^3 » вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером 495 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 5 мкл из микропробирки, маркированной « 5×10^5 », тщательно перемешивают и осаждают капли с крышки пробирки на вортексе;

- в микропробирку, маркированную « 1×10^3 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 450 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 50 мкл из микропробирки маркированной « 5×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

- в микропробирку, маркированную « 2×10^2 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 450 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 50 мкл из микропробирки маркированной « 1×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

5.3 Далее проводится экстракция ДНК *Plasmodium spp.* из разведений СОП, ПЦР, детекция продуктов ПЦР и учет результатов в соответствии с ТУ испытуемого набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 275 ПКО ДНК <i>Plasmodium spp.</i>	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер с poly(A)	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.*. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВОК И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2
лист 2

Руководитель подразделения развития и качества продукции
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 60/20 от 17.04.2020 г.)

Е.А. Козлова



М.П.

СОГЛАСОВАНО

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

«10» _____ 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
стандартного образца предприятия № 283 «Положительный
контрольный образец, содержащий ДНК Plasmodium
falciparum»
(СОП № 283 ПКО ДНК P.falciparum)



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

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 283 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Plasmodium falciparum*» (СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum*), предназначенного для проведения испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Plasmodium spp. / P. falciparum / P. Vivax-FL* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* и при постановке ПЦР следует соблюдать положения 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:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытуемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытуемого набора реагентов.

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

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* и дать нагреться до комнатной температуры. СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* должен представлять собой прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений и посторонних примесей. Оценивают визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* перемешивают и осаждают капли на вортексе. Открывают пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отбирают необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрывают. СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* используется совместно с СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp* и СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*.

5.2 Готовят разведения, указанные в ТУ испытуемого набора реагентов с использованием ДНК-буфера с poly(A), приложенного к СОП. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 10^7 копий/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 10^7 копий/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 10^7 копий/мл.

Разведения готовятся по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, разводится N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение проводят согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N=A \quad (2)$$

$$C-A=B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum*,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 копий/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ДНК-буфера с poly(A), который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m копий/мл разводится последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ испытуемого набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, готовят последующие разведения, указанные в ТУ, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, из СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.* ($4,5 \times 10^6$ коп/мл), СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* (2×10^6 коп/мл) и СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax* (1×10^6 коп/мл) необходимо приготовить смешанный СОП *Plasmodium spp./P.falciparum/P.vivax* с концентрацией каждого компонента 5×10^3 , 1×10^3 и 2×10^2 коп/мл:

- маркируют микропробирки вместимостью 1,5 мл « 5×10^5 », « 5×10^3 », « 1×10^3 » и « 2×10^2 ».

- в микропробирку, маркированную « 5×10^5 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 14 мкл ДНК-буфера с poly(A), 11 мкл СОП № 275 ПКО ДНК *Plasmodium spp.*, 25 мкл СОП № 283 ПКО ДНК

P.falciparum и и 50 мкл СОП № 284 ПКО ДНК *P.vivax*, тщательно перемешивают и осаждают капли с крышки пробирки на вортексе;

- в микропробирку, маркированную « 5×10^3 » вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером 495 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 5 мкл из микропробирки, маркированной « 5×10^5 », тщательно перемешивают и осаждают капли с крышки пробирки на вортексе;

- в микропробирку, маркированную « 1×10^3 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 450 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 50 мкл из микропробирки маркированной « 5×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

- в микропробирку, маркированную « 2×10^2 », вносят автоматическим дозатором, используя наконечник с аэрозольным барьером, 450 мкл ДНК-буфера с poly(A) и 50 мкл из микропробирки маркированной « 1×10^3 », тщательно перемешивают и осаждают на вортексе.

5.3 Далее проводится экстракция ДНК *Plasmodium falciparum* из разведений СОП, ПЦР, детекция продуктов ПЦР и учет результатов в соответствии с ТУ испытываемого набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
СОП № 283 ПКО ДНК <i>P.falciparum</i>	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер с poly(A)	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum*. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП № 283 ПКО ДНК *P.falciparum* соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВOK И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
2019 лист 2

Руководитель подразделения развития и качества продук-
ции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 60/20 от 17.04.2020 г.)

Е.А. Козлова



06 20 20 г.

[Handwritten signature]



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



Краткое руководство

набор реагентов
АмплиСенс® Plasmodium spp. /
P.falciparum / *P.vivax*-FL

Форма 1: REF Н-3981-1
Форма 2: REF Н-3982-1-4



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



VER 14.08.20

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

Комплекты для экстракции:
«РИБО-преп» для экстракции ДНК из цельной крови и комаров;
«МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из цельной крови.
Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.
Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контролей и элюции		
и экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:		
О-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Цельная кровь	50 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
Сплензия комаров	100 мкл	
ВКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Из образцы	50 мкл	в каждую пробирку (для формы 1)
	100 мкл	в каждую пробирку (для формы 2)
и экстракции с помощью «МАГНО-сорб» добавить:		
О-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Цельная кровь	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ВКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Из образцы	100 мкл	в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 FN

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

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.

Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-FL *Plasmodium* spp. и ПЦР-буфером-Н.

В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

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

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

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

Знести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
Знести по 10 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК <i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
+ <i>Plasmodium</i> spp.	в пробирку для К+
-	в пробирку для К-

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы / контролей.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

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

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *Plasmodium* spp.-Lyo для амплификации исследуемых и контрольных образцов.

Знести по 25 мкл	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК <i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
+ <i>Plasmodium</i> spp.	в пробирку для К+
-	в пробирку для К-

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

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы / контролей.

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 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 возбудителей, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. 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, ROX, Cy5	

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

Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. 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

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>Plasmodium</i> spp.	ДНК <i>P.falciparum</i>	ДНК <i>P.vivax</i>	ДНК ВКО-FL

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (*Ct*), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3

ЛИСТ 2

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 60/20 от 17.04.2020г.)

Е.А. Козлова

« 30 » 08 2020 г.

М.П.

«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. Акимкин
« 20 » г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

**АмплиСенс® *Plasmodium* spp. / *P.falciparum* /
P.vivax-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.....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	15
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)	17
СОСТАВ	17
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	17
А. Подготовка проб для амплификации	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	19
В. Анализ и интерпретация результатов	20
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L).....	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
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	30
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	32
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
ТЦПД ₅₀	- титр вируса, выраженный в тканевых цитопатических дозах
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
FL	- ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® *Plasmodium* spp. / *P.falciparum* / *P.vivax*-FL предназначен для качественного определения ДНК всех видов малярийных плазмодиев (*Plasmodium* spp.) и дифференциации ДНК возбудителей тропической (*P.falciparum*) и трехдневной (*P.vivax*) малярии в биологическом материале (цельная кровь, комары) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на заболевания, вызванные группой малярийных плазмодиев вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

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 клинико-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 *Plasmodium* spp., *P.falciparum*, *P.vivax* 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.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация четырех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК <i>Plasmodium</i> spp.	ДНК <i>P.falciparum</i>	ДНК <i>P.vivax</i>	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	Нетранскрибируемая область между <i>cox3</i> и <i>cox1</i>	<i>Cox1</i>	<i>Cox 1</i>	Искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 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 качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Форма 2 рассчитана на проведение 48 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл ¹
Цельная кровь	50	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	2×10^3
Цельная кровь	100	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10^3
Комары	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора

¹ Количество копий микроорганизма в 1 мл образца исследуемого материала.

реагентов доказана при исследовании следующих микроорганизмов/штаммов:

Таблица 3

Возбудитель	Штамм	Концентрация
<i>Japanese encephalitis virus (JEV)</i>	Pekin-1	Титр 10^6 ТЦПД50/мл
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Приморье-25/81	Не менее 10^5 коп/мл
<i>Dengue virus (DENV)</i>	DENV-1/8/Taiand/01/2013	Не менее 10^5 ГЭ/мл
<i>Leptospira</i> spp. (серогруппа <i>Icterohaemorrhagiae</i>)	M20 (Copenhageni)	Не менее 10^7 микр/мл
<i>Leptospira</i> spp. (серогруппа <i>Javanica</i>)	Poi	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Madrid-E	
<i>Rickettsia raoultii</i>	DnS-14-Шайман	
<i>Chikungunya virus (CHIKV)</i>	Ross late	
<i>Tick-borne encephalitis virus (TBEV)</i>	Комарово	10^7 У/мл
<i>Zika virus (ZIKV)</i>	MRS-Opy Martinique-PaPi 2015	
<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	Баево-105-87	не менее 10^8 коп/мл
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	M1	
<i>Borrelia miyamotoi</i>	Izh-4	
<i>Yellow fever virus (YFV)</i>	17D	
<i>West Nile virus (WNV)</i>	Leiv-VLG99-27889 human	

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК цельной крови людей, не бывавших в эндемичных по малярии регионах, ДНК комаров, неспецифических реакций выявлено не было.

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

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой смесь стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *Plasmodium* spp., *P.falciparum*, *P.vivax* с концентрацией 1×10^4 ГЭ/мл каждого, в качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах

короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов.

Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

АмплиСенс® <i>Plasmodium</i> spp. / <i>P.falciparum</i> / <i>P.vivax</i> -FL	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Форма 1	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
Форма 2	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы следующие образцы (см. табл. 5):

Таблица 5

Вид исследуемого материала	Количество проб
Кровь от пациентов с подозрением на малярию	489
Кровь от пациентов с клиническим диагнозом «Малярия», подтвержденным методом микроскопии тонкого мазка крови или толстой капли крови	88
Всего	577

В качестве референтного метода использовался набор реагентов «SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan (Standart Diagnostics, Inc. («Стандарт Диагностика, Инк.»), Корея) (Иммунохроматография (тест-кассеты))» (ПУ № ФСЗ 2009/05702 от 27.02.2014).

Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® *Plasmodium* spp. / *P.falciparum* / *P.vivax*-FL в
сравнении с референтным методом

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® <i>Plasmodium</i> spp. / <i>P.falciparum</i> / <i>P.vivax</i> -FL	Результаты применения референтного метода	
		положительных	отрицательных
Цельная кровь	Всего исследовано 577 образцов	положительных	311
		отрицательных	3
			262

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® *Plasmodium* spp. / *P.falciparum* / *P.vivax*-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)
Цельная кровь	99,7% (98,2-99,9 %)	98,9% (97,6-99,8 %)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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».

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 набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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 вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, 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.

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

3. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буфер (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и комаров (например, Tissue Lyser LT (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), или аналогичный).
9. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
10. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
11. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).

12. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

16. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ ФСР 2010/07265) или другие, рекомендованные Изготовителем.
17. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

18. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария, Tecan Schweiz AG («Тикан Швейц АГ»), Швейцария) и другие, рекомендованные Изготовителем).
19. Комплект реагентов для экстракции ДНК (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)) и набор расходных материалов к автоматической станции.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

20. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-50 FN:
 - а) закручивающиеся 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 крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, 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.

21. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
22. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
23. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
24. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
25. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
26. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 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).
27. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
28. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
29. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь,
- комары.

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) с ЭДТА или

цитратом натрия 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.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения предобработки:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 часов;
- при температуре не выше 16 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Комары

Собранный материал разбирают в лаборатории по видам, полу, местам и датам сбора и помещают в сухие чистые пробирки объемом 2,0 мл. При объединении комаров в пулы число особей в одном пуле не должно превышать 50.

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Комары (суспензия)

Комаров, для приготовления суспензии объединить в пулы не более 50 особей перенести в стерильную фарфоровую чашу, добавить 0,9% раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) из расчета 1 комар - 30 мкл раствора и гомогенизировать пробу стерильным пестиком. При наличии автоматического гомогенизатора применяют следующие параметры для гомогенизации комаров: диаметр шариков – 5 мм, частота – 50 Гц/с, время гомогенизации 5 мин, объем буфера – 700 мкл (пул

из 25 комаров), 1500 мкл (пул из 50 комаров). Наконечником с фильтром перенести пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировать в течение 1 мин при 10 тыс g (12 тыс об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф»). Для экстракции ДНК отобрать 100 мкл надосадочной жидкости.

Допускается хранение предварительно обработанных комаров до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом, предварительно разделив на пулы по 50 особей – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Непригодными для исследования являются образцы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

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 экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (цельная кровь), используемом для исследования.

Были протестированы модельные образцы цельной крови без добавления и с добавлением эндогенных и экзогенных потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 8.

Модельные образцы цельной крови содержали ДНК

Plasmodium spp., *P.falciparum*, *P.vivax* в концентрациях 1×10^4 копий/мл.

Таблица 8

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	Не обнаружено
	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
Экзогенные вещества	Литий гепарин	От 12 МЕ/мл до 30 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА	2,0 мкг/мл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из цельной крови и комаров в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из цельной крови в соответствии с Приложением 1.

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-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 50 мкл цельной крови. При исследовании суспензии комаров – 100 мкл суспензии.

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

Объем элюции:

- **50 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 FN);
- **100 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

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

Объем ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл** цельной крови.

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

Объем элюции – **100 мкл**.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Plasmodium* spp., *P. falciparum*, *P. vivax* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Plasmodium</i> spp.	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
К+ <i>Plasmodium</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 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 *Plasmodium spp.*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Разморозить пробирки с **ПЦР-смесью-FL *Plasmodium spp.*** и **ПЦР-буфером-Н**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *Plasmodium spp.*** 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.

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

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K+ *Plasmodium spp.***
- б) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей.

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).

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного³ и планшетного⁴ 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, ROX, Cy5	

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 возбудителей, 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 рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

³ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁴ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

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 четырем каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>Plasmodium</i> spp.	ДНК <i>P.falciparum</i>	ДНК <i>P.vivax</i>	ДНК ВКО-FL

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:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	определено или отсутствует	ДНК <i>Plasmodium</i> spp. обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	определено или отсутствует	ДНК <i>P.falciparum</i> обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>P.vivax</i> обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>P.falciparum</i> и ДНК <i>P.vivax</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>Plasmodium</i> spp., <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> НЕ обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный**
отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	отсутствует	определено или отсутствует	Сомнительный**
отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный**
<u>определено</u> больше граничного	отсутствует	отсутствует	определено или отсутствует	Сомнительный**
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата

образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируе- мый этап ПЦР- исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX 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.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для любых флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 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.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), 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 участков ДНК *Plasmodium* spp. / *P.falciparum* / *P.vivax* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>Plasmodium</i> spp.-Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
K+ <i>Plasmodium</i> spp.	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 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 *Plasmodium* spp.-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

3. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K+ *Plasmodium spp.***
- б) **отрицательный контроль ПЦР (K–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K–**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (OK)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

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

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей.

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).

Таблица 13

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁵ и планшетного⁶ 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, ROX, Cy5	

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

⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителей, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 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 рекомендуется 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! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

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 четырем каналам:

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>Plasmodium</i> spp.	ДНК <i>P.falciparum</i>	ДНК <i>P.vivax</i>	ДНК ВКО-FL

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:

Таблица 15

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Sy5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	определено или отсутствует	ДНК <i>Plasmodium</i> spp. обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	определено или отсутствует	ДНК <i>P.falciparum</i> обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>P.vivax</i> обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК <i>P.falciparum</i> и ДНК <i>P.vivax</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>Plasmodium</i> spp., <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> НЕ обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный**
отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	отсутствует	определено или отсутствует	Сомнительный**
отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный**
<u>определено</u> больше граничного	отсутствует	отсутствует	определено или отсутствует	Сомнительный**
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> больше граничного	<u>определено</u> больше граничного	определено или отсутствует	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата

образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 16 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 16

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
K–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX 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.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для любых флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 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.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла (C_t), 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. 15 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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °C не более 3 сут.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °C, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *Plasmodium* spp.

ПЦР-буфер-Н, ПЦР-смесь-FL *Plasmodium* spp. хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °C. ПЦР-смесь-FL *Plasmodium* spp. хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °C. ПЦР-смесь *Plasmodium* spp.-Lyо хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

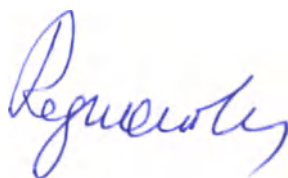
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

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: obtk@pcr.ru⁷.

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 набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую 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

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно
для проведения п-
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



Осторожно! Обратитесь к
инструкции по
применению

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из 100 мкл образца цельной крови с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5** прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО-FL, компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку **10 мкл ВКО-FL, 10 мкл компонента А и 20 мкл магнетизированной силики**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО-FL, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной смеси **ВКО-FL, компонента А и магнетизированной силики**.
5. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **100 мкл исследуемого образца** и перемешать на вортексе.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мкл ОКО**, перемешать на вортексе.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на **10 мин**.
9. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.

11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.
12. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
13. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**.
14. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.
15. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 11-14).
16. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.
17. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.
18. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.
19. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.
20. Добавить **100 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.
21. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на **5 мин**, через **2 мин** перемешать на вортексе.
22. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив. Инкубировать **2 мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для внесения в ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 6 мес, при температуре не выше минус 68 °C – в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в чистые пробирки.

Прогорито, пронумеровано и скреплено печатом: 34
тридцать четвёрте лист 2

Руководитель подразделения развития и качества продукции
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 60/20 от 17.04.2020 г.)

 Е.А. Козлова

« 23 » 10 20 20 г.



Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 34 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.

