

«УТВЕРЖДАЮ»

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



В.Г. Акимкин

« 15 »

сентября

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для количественного определения ДНК

Streptococcus pneumoniae и *Haemophilus influenzae*

методом ПЦР

АмплиСенс® Пневмо-квант-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.....	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	12
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	21
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	23
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	25
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	25
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F; программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1)	27
СОСТАВ	27
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	28
А. Подготовка проб для амплификации	28
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	29
В. Анализ и интерпретация результатов.....	30
ФОРМА 2 («ПЦР-КОМПЛЕКТ» ВАРИАНТ FRT-L; ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ АМПЛИСЕНС® ПНЕВМО-КВАНТ ВЕРСИЯ 1.1).....	35
СОСТАВ	35
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	35
А. Подготовка проб для амплификации	36
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	36
В. Анализ и интерпретация результатов.....	38
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	42
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	43
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	44
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	45

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
OK	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец экстракции
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
FL	- ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® Пневмо-квант-FL, предназначен для количественного определения ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носоглотки, мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ), жидкость из полости среднего уха, спинномозговая жидкость (ликвор), цельная венозная кровь, тканевой (аутопсийный) материал) человека методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике.

Ограничения по применению медицинского изделия в различных популяционных и демографических группах отсутствуют.

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц, больных

пневмонией (и другими острыми заболеваниями дыхательных путей), воспалением придаточных пазух носа, острым отитом среднего уха, менингитом и другими клиническими формами с возможной пневмококковой этиологией или инфекцией, вызываемой гемофильной палочкой (палочкой Пфайфера), вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для посмертной идентификации ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в аутопсийном материале.

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

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО STI-87) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО STI-87 с гибридационно-флуоресцентной детекцией. ВКО STI-87 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-меченные 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».

Количественное определение ДНК выявляемых микроорганизмов основывается на существовании линейной зависимости между логарифмом исходной концентрации ДНК-

мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известными концентрациями ДНК-мишеней, аттестованными по методике Изготовителя. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная прямая, по которой происходит расчет концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

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 трех ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i>	ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	локус Spn9802	ген hpd

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F; программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L; программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1

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.

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	Микроорганизм	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Предел обнаружения, ГЭ/мл	Диапазон измерения, ГЭ/мл
Мокрота	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F, FRT-L	1x10 ³	1x10 ⁴ –1x10 ⁸
Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ)					
Жидкость из полости среднего уха					
Мазки со слизистой оболочки носоглотки					
Спинномозговая жидкость (ликвор)					
Цельная венозная кровь					
Тканевой (аутопсийный) материал					

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

Экспериментально доказано, что набор реагентов выявляет участки ДНК заявленных микроорганизмов при исследовании следующих штаммов из коллекций ATCC (American Type Culture Collection, США) и ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов): *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus pneumoniae* 11/56, *Streptococcus*

pneumoniae 74/64, *Haemophilus influenzae* 423 в концентрации не менее 1×10^3 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов, а также геномной ДНК человека:

- штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США) *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813™, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 15305™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 8193™, *Neisseria flava* ATCC® 14221™, *Neisseria mucosa* ATCC® 19693™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 19433™, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ATCC® 090282™, *Streptococcus salivarius* ATCC® 13419™, *Haemophilus parainfluenzae* ATCC® 7901™ в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл и не более 1×10^8 ГЭ/мл;
- штаммы из коллекции ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов) *Streptococcus pyogenes* Dick – I, *Proteus mirabilis* 3177, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Neisseria sicca* 5, *Escherichia coli* M 17, *Salmonella enteritidis* 5765, *Salmonella typhimurium* 79, *Yersinia enterocolitica* 134, *Bordetella pertussis* 703 L 6, *Mycobacterium Bovis* Ravenel №700204 в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл и не более 1×10^8 ГЭ/мл;
- ДНК человека в концентрации 1 мг/мл.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было. Специфичность тестирования подтверждалась методом секвенирования детектируемых фрагментов амплификации.

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

Повторяемость и воспроизводимость

Повторяемость и воспроизводимость были определены путем тестирования образцов мокроты, в которых предварительно не была выявлена ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae*, а затем были добавлены стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae*,

до конечных концентраций 1×10^4 и 1×10^6 ГЭ/мл – при этом каждый образец содержал одинаковую концентрацию ДНК возбудителей.

Таблица 3

Повторяемость

АмплиСенс® Пневмо- квант-FL	Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма 1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1×10^4	10	4,23	0,16	3,85
		1×10^6	10	5,81	0,02	0,36
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1×10^4	10	4,12	0,10	2,85
		1×10^6	10	5,82	0,00	0,45
Форма 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1×10^4	10	4,15	0,08	2,02
		1×10^6	10	5,83	0,02	0,43
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1×10^4	10	4,10	0,05	1,27
		1×10^6	10	5,72	0,03	0,45

Таблица 4

Воспроизводимость

АмплиСенс® Пневмо- квант-FL	Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
Форма 1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1×10^4	40	4,00	0,24	6,00
		1×10^6	40	5,85	0,08	1,34
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1×10^4	40	3,97	0,17	4,35
		1×10^6	40	5,86	0,21	3,51
Форма 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1×10^4	40	4,22	0,15	3,48
		1×10^6	40	5,81	0,03	0,58
	<i>Haemophilus influenzae</i>	1×10^4	40	4,06	0,09	2,13
		1×10^6	40	5,91	0,25	4,27

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 двух независимых лабораториях, разными операторами, на различных приборах, на разных сериях набора реагентов.

Правильность

Правильность была определена путем тестирования образцов мокроты, в которой предварительно не была выявлена ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae*, а затем были добавлены стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК *Streptococcus pneumoniae* и

ДНК *Haemophilus influenzae*, до конечной концентрации 5×10^5 ГЭ/мл каждого.

Таблица 5

Правильность

АмплиСенс® Пневмо-квант-FL	Микроорганизм	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение, lg	Систематическая погрешность (В), %
Форма 1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100	5,66	5,67	0,20
	<i>Haemophilus influenzae</i>	100	5,72	5,58	2,51
Форма 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100	5,57	5,67	2,23
	<i>Haemophilus influenzae</i>	100	5,46	5,58	4,15

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для подтверждения диагностических характеристик набора реагентов АмплиСенс® Пневмо-квант-FL были использованы образцы биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ), жидкость из полости среднего уха, спинномозговая жидкость (ликвор), цельная венозная кровь, тканевой (аутопсийный) материал), полученные от 380 пациентов с пневмококковой инфекцией, содержащие ДНК *Streptococcus pneumoniae* в концентрации от $1,02 \times 10^4$ до $3,78 \times 10^7$ ГЭ/мл, и от 380 пациентов с гемофильной инфекцией, содержащие ДНК *Haemophilus influenzae* в концентрации от $1,01 \times 10^4$ до $4,58 \times 10^7$ ГЭ/мл, а также от 380 пациентов без пневмококковой и гемофильной инфекции (контрольная группа).

Результаты представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

**Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® Пневмо-квант-FL
в сравнении с референтным методом**

Возбудитель	Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® Пневмо-квант-FL		Результаты применения референтного метода ¹	
				положительных	отрицательных
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	мокрота	Всего исследовано 180 образцов	положительных	60	0
			отрицательных	0	120
	бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ)	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60
	жидкость из полости среднего уха	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60
	мазки со слизистой оболочки носоглотки	Всего исследовано 300 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	200
	спинномозговая жидкость (ликвор)	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60
	цельная венозная кровь	Всего исследовано 300 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	200
<i>Haemophilus influenzae</i>	мокрота	Всего исследовано 180 образцов	положительных	60	0
			отрицательных	0	120
	бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ)	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60
	жидкость из полости среднего уха	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60
	мазки со слизистой оболочки носоглотки	Всего исследовано 300 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	200
	спинномозговая жидкость (ликвор)	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60
	цельная венозная кровь	Всего исследовано 300 образцов	положительных	100	0
			отрицательных	0	200
	тканевой (аутопсийный) материал	Всего исследовано 90 образцов	положительных	30	0
			отрицательных	0	60

¹ В качестве референтного метода использовались культуральные методы исследования и секвенирование участков генома *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*.

Таблица 7

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® Пневмо-квант-FL**

Возбудитель	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	мокрота	100 (94-100) %	100 (97-100) %
	бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ)	100 (88-100) %	100 (94-100) %
	жидкость из полости среднего уха	100 (88-100) %	100 (94-100) %
	мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100 (96-100) %	100 (98-100) %
	спинномозговая жидкость (ликвор)	100 (88-100) %	100 (94-100) %
	цельная венозная кровь	100 (96-100) %	100 (98-100) %
	тканевой (аутопсийный) материал	100 (88-100) %	100 (94-100) %
<i>Haemophilus influenzae</i>	мокрота	100 (94-100) %	100 (97-100) %
	бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ)	100 (88-100) %	100 (94-100) %
	жидкость из полости среднего уха	100 (88-100) %	100 (94-100) %
	мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	100 (96-100) %	100 (98-100) %
	спинномозговая жидкость (ликвор)	100 (88-100) %	100 (94-100) %
	цельная венозная кровь	100 (96-100) %	100 (98-100) %
	тканевой (аутопсийный) материал	100 (88-100) %	100 (94-100) %

Корреляция значений концентрации ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* со значениями, полученными с помощью референтного метода⁴

Было проанализировано 380 образцов различных видов биологического материала, содержащих ДНК *Streptococcus pneumoniae* в концентрации от $1,02 \times 10^4$ до $3,78 \times 10^7$ ГЭ/мл, и 380 образцов различных видов биологического материала, содержащих ДНК *Haemophilus influenzae* в концентрации от $1,01 \times 10^4$ до $4,58 \times 10^7$ ГЭ/мл.

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ В качестве референтного метода использовалась система QX100 для проведения капельной цифровой ПЦР (QX100 droplet digital PCR), РУ № ФСЗ 2012/13278).

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и 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 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, использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. Вакуумная система забора крови типа Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).
3. Иглы пункционные (например, Gebruder Martin GmbH & Co. KG («Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ») Германия, или аналогичные).
4. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
5. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
6. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки и жидкости из полости среднего уха у детей и взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).
7. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», или аналогичный).
8. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

9. Реагент «МУКОЛИЗИН» (РУ № ФСР 2011/12082) для предварительной обработки мокроты.
10. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный

физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).

11. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) для проведения пробоподготовки тканевого материала.
16. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

21. Комплект реагентов для экстракции ДНК – комплект реагентов выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008 (ПУ № ФСР 2008/03147).
22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

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

- 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 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.

24. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

26. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

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

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

29. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)) и «ДТ-96» / «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-

Технология», Россия (ПУ № ФСР 2011/10229)).

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

31. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

32. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб биологического материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими указаниями МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний».

Материалом для исследования при внебольничной пневмонии (и других острых заболеваний дыхательных путей) служат:

- мокрота,
- бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ),
- цельная венозная кровь,
- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки только в случае невозможности получения материала из нижних дыхательных путей,
- тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты пораженной части легких, бронхов).

Материалом для исследования при отитах среднего уха служат:

- жидкость из полости среднего уха, собранная с помощью мазка с барабанной перепонки после проведения процедуры тимпаноцентеза или после спонтанного прорыва барабанной перепонки,
- мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки.

Материалом для исследования при подозрении на бактериальный менингит служат:

- спинномозговая жидкость (ликвор),

- цельная венозная кровь,
- тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты пораженной части мозговых оболочек).

При септицемии исследуется цельная венозная кровь.

Мокрота

Мокроту или аспират из трахеи (получаемые согласно МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний») собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры после предварительного полоскания полости рта водой.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) собирают в одноразовые плотно закрывающиеся емкости из полипропилена объемом не менее 5 мл.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Мазки берут разными зондами со слизистой оболочки нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мазки со слизистой нижнего носового хода берут сухим

стерильным назофарингеальным вельюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают вниз, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3-4 см для детей и 5-6 см для взрослых).

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда герметично закрывают и маркируют.

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

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

Допускается хранение исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

Цельная венозная кровь

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно 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 исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 6 часов с момента взятия материала для количественного определения нуклеиновых кислот.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 6 часов.

Спинномозговая жидкость (ликвор)

Спинномозговую жидкость (ликвор) следует получать с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 2,0 мл в количестве не менее 1,0 мл. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Допускается хранение исследуемого материала до ПЦР-проведения исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

Жидкость из полости среднего уха

Сбор материала проводит отоларинголог: после очистки и обработки наружного слухового канала раствором лидокаина с этиловым спиртом (с экспозицией в течение одной минуты) делается прокол барабанной перепонки с целью извлечения жидкости из барабанной полости, которую собирают с помощью зонда из полистирола с вязким тампоном. Конец зонда с тампоном отламывается в пробирку с транспортной средой (0,5 мл стерильного физиологического раствора или 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков). При самопроизвольной перфорации барабанной перепонки жидкость из барабанной полости собирают аналогичным способом, за исключением того, что прокол барабанной перепонки не проводится.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °C в течение 3 суток.

Тканевой (аутопсийный) материал

Материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и исследуют в течение 1 ч либо замораживают сразу после взятия.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – не более 7 суток;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование предварительно замороженного материала при температуре от 2 до 8 °C в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Цельная венозная кровь, спинномозговая жидкость (ликвор),

жидкость из полости среднего уха, мазки со слизистой носо- и ротоглотки не требуют предварительной подготовки.

Мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ), тканевой (аутопсийный) материал требуют предварительной подготовки.

Мокрота

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Бронхо-альвеолярный лаваж

Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Тканевой (аутопсийный) материал

Материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию в 0,9 % растворе натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатном буферном растворе (PBS). Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение предобработанных образцов до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – не более

- 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Взятие венозной крови следует производить в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором К2/К3 ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Непригодными для исследования являются образцы цельной венозной 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 STI-87), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО STI-87, 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 (мокрота, цельная венозная кровь, жидкость из полости среднего уха, мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, спинномозговая жидкость, тканевой (аутопсийный) материал), используемом для исследования (см. табл. 8).

Были протестированы модельные образцы:

- мокроты, мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, тканевого (аутопсийного) материала без добавления и с добавлением эндогенных и экзогенных потенциально интерферирующих веществ;
- цельной венозной крови, взятые в пробирки с К2/К3 ЭДТА в качестве антикоагулянта, без добавления и с добавлением эндогенных потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, которые на порядок превышали верхнюю границу нормальной концентрации этих веществ в цельной венозной крови;

- жидкости из полости среднего уха с высоким содержанием лейкоцитов и добавлением экзогенных потенциально интерферирующих веществ. Лейкоциты рассматривали как эндогенные потенциально интерферирующие вещества. Также исследовали образцы жидкости из полости среднего уха, не содержащие эндогенных и экзогенных потенциально интерферирующих веществ.
- спинномозговой жидкости (ликвора) с повышенным содержанием глюкозы, лейкоцитов и добавлением экзогенных потенциально интерферирующих веществ. Глюкозу и лейкоциты рассматривали как эндогенные потенциально интерферирующие вещества. Также исследовали образцы ликвора, не содержащие эндогенных и экзогенных потенциально интерферирующих веществ.

Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 8.

Модельные образцы мокроты, цельной венозной крови, мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, жидкости из полости среднего уха, тканевого (аутопсийного) материала, спинномозговой жидкости (ликвора) содержали штаммы *Streptococcus pneumoniae* ATCC №49619 и *Haemophilus influenzae* ATCC №13813, в конечной концентрации каждого - 1×10^4 и 1×10^6 ГЭ/мл.

Таблица 8

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мокрота	Эндогенные вещества	Муцин	0,75 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Гипертонический раствор хлорида натрия	5% (v/v)	Не обнаружено
		Амоксициллин* + клавулановая кислота*	1125 мкг/мл + 281 мкг/мл	Не обнаружено
		Цефтриаксон*	1500 мкг/мл	Не обнаружено
Цельная венозная кровь	Эндогенные вещества	Общий билирубин*	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
		Общий холестерин*	7,6 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	Не обнаружено
		Триглицериды*	3,6 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Не обнаружено

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	Эндогенные вещества	Муцин	0,15 мг/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено
		Раствор Люголя с глицерином	0,5 %	Не обнаружено
жидкость из полости среднего уха	Эндогенные вещества	Лейкоциты*	10 ⁶ клеток/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Амоксициллин + клавулановая кислота*	1125 мкг/мл + 281 мкг/мл	Не обнаружено
Спинномозговая жидкость	Эндогенные вещества	Глюкоза	10 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,89 ммоль/л)	Не обнаружено
		Лейкоциты*	500 клеток/мм ³	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Амоксициллин + клавулановая кислота*	1125 мкг/мл + 281 мкг/мл	Не обнаружено
Тканевой (аутопсийный) материал	Экзогенные вещества	Ванкомицин	1500 мкг/мл	Не обнаружено

*вещества были объединены в рамках тестирования одного вида клинического материала.

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 используется комплект реагентов «РИБО-преп». Порядок работы с комплектом реагентов «РИБО-преп» смотрите в инструкции к 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 STI-87**.

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 *S.pneumoniae* / *H.influenzae*** и **90 мкл ОКО.**

Объем элюции – **100 мкл.**

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F; программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>S.pneumoniae</i> / <i>H.influenzae</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
K1 SH	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 SH	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО <i>S.pneumoniae</i> / <i>H.influenzae</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.

Программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1 и руководство оператора реагентов – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

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 *S.pneumoniae* / *H.influenzae***, **5 мкл ПЦР-буфера-В** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**, (расчетную таблицу приготовления реакционных смесей см. в Приложении 1). 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 *S.pneumoniae* / *H.influenzae***. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *S.pneumoniae* / *H.influenzae***, **ПЦР-буфера-В**, полимеразы (**TaqF**), 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 K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 SH**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 SH**.
- 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 *S.pneumoniae* / *H.influenzae***.
- д) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – 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).

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, ROX	

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

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

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

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 (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.
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.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трём каналам (см. табл. 10):

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i>	ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», с помощью приведенного ниже алгоритма или ПО АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1. Порядок работы с ПО АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1. описан в руководстве оператора.

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (*Ct*), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции

S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Для проведения количественного исследования, исходя из заданных значений концентрации ДНК-калибраторов K1 и K2 и полученных значений C_t , проводят построение калибровочной прямой. Полученные значения используют для расчета концентрации геномных эквивалентов ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов, согласно формуле:

$$\frac{\text{число копий ДНК Streptococcus pneumoniae в 1 мл}}{\text{число копий ДНК ВКО STI-87 в 1 мл}} \times \text{коэффициент В} = \text{ГЭ/мл}$$

И

$$\frac{\text{число копий ДНК Haemophilus influenzae в 1 мл}}{\text{число копий ДНК ВКО STI-87 в 1 мл}} \times \text{коэффициент В} = \text{ГЭ/мл}$$

где:

В – число ГЭ в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

Примечание – один геномный эквивалент (геном) соответствует одному микроорганизму.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента В указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> не обнаружено	Значение C_t для ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> отсутствует или превышает граничное значение, а по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t
ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> не обнаружено	Значение C_t для ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> отсутствует или превышает граничное значение, а по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t

Результат	Интерпретация
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации менее 1×10^4 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации более 1×10^8 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов

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. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К–	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t

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

Возможные ошибки:

1. Рассчитанная концентрация ПКО *S.pneumoniae* / *H.influenzae* не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше,

- необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров 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 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. Показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. 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; программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>S. pneumoniae</i> / <i>H. influenzae</i> -Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл
K1 SH	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K2 SH	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО <i>S.pneumoniae</i> / <i>H.influenzae</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

Программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1 и руководство оператора реагентов – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

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 *S.pneumoniae* / *H.influenzae*-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.
3. Поставить контрольные реакции:
 - а) ДНК-калибратор К1 – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл К1 SH.
 - б) ДНК-калибратор К2 – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл К2 SH.
 - в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.
 - г) положительный контроль экстракции (ПК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ПКО *S.pneumoniae* / *H.influenzae*.
 - д) отрицательный контроль ПЦР (К–) – 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).

Таблица 13

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
ротаторного⁸ 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, ROX	

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 (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.

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

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

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

В. Анализ и интерпретация результатов

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

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по трём каналам (см. табл. 14):

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Продукт амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i>	ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», с помощью приведенного ниже алгоритма или ПО АмплиСенс® Пневмоквант версия 1.1. Порядок работы с ПО АмплиСенс® Пневмоквант версия 1.1. описан в руководстве оператора.

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (C_t), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Для проведения количественного исследования, исходя из заданных значений концентрации ДНК-калибраторов K1 и K2 и полученных значений C_t , проводят построение калибровочной прямой. Полученные значения используют для расчета концентрации геномных эквивалентов ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ДНК *Haemophilus influenzae* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов, согласно формуле:

$$\frac{\text{число копий ДНК Streptococcus pneumoniae в 1 мл}}{\text{число копий ДНК ВКО STI-87 в 1 мл}} \times \text{коэффициент В} = \text{ГЭ/мл}$$

и

$$\frac{\text{число копий ДНК Haemophilus influenzae в 1 мл}}{\text{число копий ДНК ВКО STI-87 в 1 мл}} \times \text{коэффициент В} = \text{ГЭ/мл}$$

где:

В – число ГЭ в 1 мл исследуемого материала. Коэффициент учитывает потери ДНК в процессе экстракции.

Примечание – один геномный эквивалент (геном)

соответствует одному микроорганизму.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов и коэффициента В указаны во вкладыше к данной серии набора реагентов и не могут быть использованы для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

Таблица 15

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
Невалидный	Значение C_t по каналу для флуорофора FAM отсутствует. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> не обнаружено	Значение C_t для ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> отсутствует или превышает граничное значение, а по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t
ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> не обнаружено	Значение C_t для ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> отсутствует или превышает граничное значение, а по каналу для флуорофора FAM определено значение C_t
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации менее 1×10^4 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации меньше нижнего предела диапазона измерения набора реагентов
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации в пределах диапазона измерения набора реагентов
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации более 1×10^8 ГЭ/мл	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружена в концентрации выше верхнего предела диапазона измерения набора реагентов

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

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t	значение концентрации укладывается в диапазон	значение концентрации укладывается в диапазон
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение C_t	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К–	ПЦР	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует	значение C_t отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t	<u>определено</u> значение C_t

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

Возможные ошибки:

1. Рассчитанная концентрация ПКО *S.pneumoniae* / *H.influenzae* не укладываются в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров 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 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 амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для ДНК-калибраторов K1 и K2 отсутствуют значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 16). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 5. Показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. 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.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-В, полимеразы (TaqF) и ПЦР-смеси-FL *S.pneumoniae* / *H.influenzae*. ПЦР-буфер-В, полимеразу (TaqF) и ПЦР-смесь-FL *S.pneumoniae* / *H.influenzae* хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *S.pneumoniae* / *H.influenzae* 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 *S.pneumoniae* / *H.influenzae*-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь *S.pneumoniae* / *H.influenzae*-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

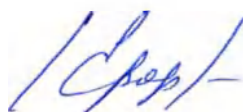
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

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.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 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.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

¹⁰ 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 тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Предел температуры



Беречь от влаги



Изготовитель



Осторожно!



Дата изготовления

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

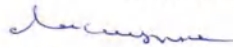
Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

		Объем реактивов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,0	5,0	0,5
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ¹¹	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
2	8	80	40	4,0
4	10	100	50	5,0
6	12	120	60	6,0
8	14	140	70	7,0
10	16	160	80	8,0
12	18	180	90	9,0
14	20	200	100	10,0
16	22	220	110	11,0
18	24	240	120	12,0
20	26	260	130	13,0
22	28	280	140	14,0
24	30	300	150	15,0
26	32	320	160	16,0
28	34	340	170	17,0
30	36	360	180	18,0
66	72	720	360	36,0
90	96	960	480	48,0

¹¹ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапов экстракции ДНК (ОК, ПК) и ПЦР (калибратор К1, калибратор К1, К-) + запас на один образец.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 45
СОЮЗ НОР лист 02

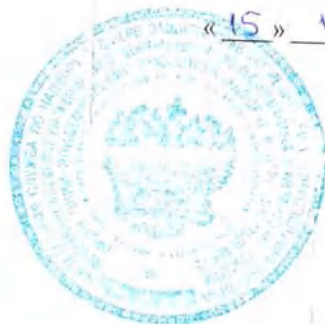
Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 178/21 от 16.11.2021 г.)



А.О.Лисицына

« 15 » 12 2021 г.

М.п.



Всего пронумеровано,
прошито и скреплено
печатью 45 лист(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.



«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

2020 г.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения
АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА.....	3
ПРИНЦИП РАБОТЫ.....	3
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ	4
ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ	5
ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ	6
СООБЩЕНИЯ ОБ ОШИБКАХ ОПЕРАТОРА ПО.....	10

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПК	- положительный контроль экстракции
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение АмплиСенс® Пневмо-квант версия 1.1, предназначено для автоматической обработки результатов при использовании набора реагентов АмплиСенс® Пневмо-квант-FL. ПО представляет собой шаблон расчета результатов в формате Microsoft® Excel.

Дата выпуска: 22.11.18

Класс безопасности: Класс А (невозможны никакие травмы и ущерб здоровью) в соответствии с п.4.3 ГОСТ Р МЭК 62304.

ПО АмплиСенс® Пневмо-квант и руководство оператора представлены пользователю на электронном носителе информации или на сайте Изготовителя.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Персональный компьютер с предустановленным пакетом приложений Microsoft® Office 2003 и выше. Системные требования приведены на официальном сайте <http://technet.microsoft.com/ru-ru/library/ee624351.aspx>

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Для работы ПО АмплиСенс® Пневмо-квант необходима программа Microsoft® Excel. Программа использует встроенный язык программирования Microsoft® Visual Basic for Applications (MS VBA).

В качестве исходных данных ПО АмплиСенс® Пневмо-квант использует значения пороговых циклов (C_t), полученные ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», для исследуемых образцов, контролей и калибраторов.

ПО АмплиСенс® Пневмо-квант проводит автоматическое построение графиков калибровки, расчет концентраций и анализ достоверности результатов.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для автоматической обработки результатов необходимо соблюдать следующие условия:

- 1) Необходимо убедиться, что система безопасности Microsoft® Excel позволяет использовать макросы. В меню **Сервис>Макрос>Безопасность** установите **Средний уровень защиты**.
- 2) Исходные данные должны быть получены ПО используемого прибора, в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов. Данные могут быть перенесены непосредственно из ПО прибора, либо из файла экспорта данных в Excel.
- 3) Ячейки раздела **Данные прибора** должны быть заполнены без ошибок: значения **Сг** должны соответствовать образцу и каналу детекции.
- 4) Таблицы **Нижняя граница ПК, ГЭ/мл, Верхняя граница ПК, ГЭ/мл** и **Коэффициенты** раздела **Параметры** должны быть заполнены в строгом соответствии с вкладышем к используемой серии набора реагентов.
- 5) Контрольные образцы в столбце **Обозначение образца** должны быть подписаны в соответствии с таблицей **Обозначение контрольных образцов** (вкладка **Инструкция**). Регистр букв значения не имеет.

ИЗОБРАЖЕНИЯ НА ЭКРАНЕ МОНИТОРА КОМПЬЮТЕРА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАМНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Вкладка **Инструкция:**

АмплиСенс® Пневмо-квант

Назначение

Шаблон предназначен для автоматической обработки результатов при использовании набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® Пневмо-квант-FL.

Описание результатов

Статус	Описание
Невалидный. Сбой ВКО. Требуется повторить анализ.	В исследуемом образце или в образце ПК значение Ct по каналу для флуорофора FAM отсутствует. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
Обнаружена ДНК: <i>S.pneumoniae</i> и/или <i>H.influenzae</i>	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов (менее 1×10^5 ГЭ/мл). Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов (от 1×10^4 до 1×10^6 ГЭ/мл). ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов (более 1×10^6 ГЭ/мл).
Не обнаружено	Значения Ct для ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> отсутствуют или превышает граничное значение, а по каналу для ВКО определено значение Ct.
ОК	Получены правильные результаты для контролей этапов экстракции (ПК, ОК) и амплификации (калибраторы K1 и K2, K-) ДНК.
Ошибка. Выходит за границу допустимых значений.	Для образца ПК значение концентрации выше и/или ниже диапазона, указанного во вкладыше к данному набору реагентов.
Контаминация?	Для образца K- присутствует Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX. Для образца ОК присутствует Ct по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX.
Сбой ВКО!	Для образца ОК отсутствует Ct по каналу для флуорофора FAM.
Сбой!	Для образцов калибраторов K1 и K2 при отсутствии Ct хотя бы по одному из каналов детекции.

Обозначения контрольных образцов

Тип контрольного образца	Возможные обозначения (регистр любой)
Калибраторы (K1, K2)	РУС: K1, K2 ЛАТ: K1, C1, K2, C2
Отрицательный контроль ПЦР	РУС: K- ЛАТ: K-, NCA
Отрицательный контроль экстракции	РУС: ОК, ОКО ЛАТ: ОК, ОКО, NCE
Положительный контроль экстракции	РУС: ПК ЛАТ: PC

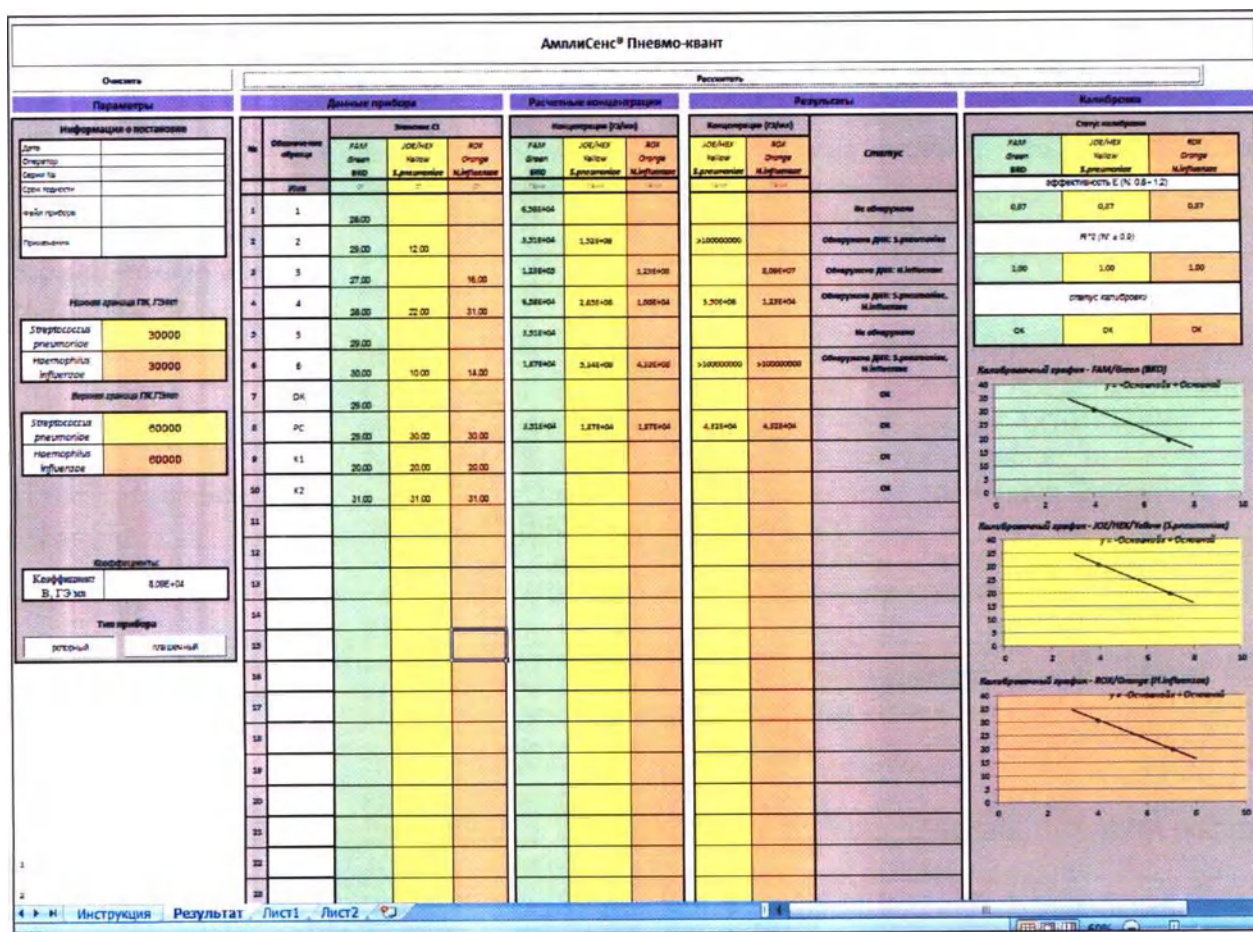
[illegible]

ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Проверить, что система безопасности Microsoft® Excel позволяет использовать макросы.
 - Для Microsoft® Excel 2003: во вкладке **Меню** выбрать **Сервис>Макрос>Безопасность** и установить **Средний уровень защиты**.
 - Для Microsoft® Excel 2007: нажать кнопку **Office** в верхнем левом углу и выбрать пункт **Параметры>Центр управления безопасностью>Параметры центра управления безопасностью>Параметры макросов>**. Поставить галочки напротив **Включить все макросы** и **Доверять доступ к объектной модели проектов VBA**.
 - Для Microsoft® Excel 2010 и Microsoft® Excel 2013: в меню **Файл** выбрать пункт **Параметры>Центр управления безопасностью>Параметры центра управления безопасностью>Параметры макросов>**. Поставить галочки напротив **Включить все макросы** и **Доверять доступ к объектной модели проектов VBA**.
2. Открыть файл с программой, принять включение макросов.

3. Во вкладке **Результат** проверить, что активна кнопка **Рассчитать**.
4. Если таблица заполнена данными из предыдущей постановки, ее можно очистить путем нажатия кнопки **Очистить**.
5. Сохранить файл под другим именем.
6. В разделе **Параметры** ввести информацию о постановке, верхнюю и нижнюю границу ПК и значение коэффициента В, указанные во вкладке, прилагаемом к набору реагентов.
7. Выбрать тип используемого амплификатора, активировав функцию **Роторный** или **Плашечный** в поле **Тип прибора**.
8. В разделе **Данные прибора** заполнить столбец **Обозначение образца** в соответствии с расположением образцов в реакционном блоке.
9. Обозначить контрольные образцы в соответствии с таблицей **Обозначения контрольных образцов** (вкладка **Инструкция**). Регистр букв значения не имеет.
10. Заполнить столбец **Значения Ct** путем копирования значений пороговых циклов по каждому каналу детекции непосредственно из ПО прибора, либо из файла экспорта данных в Microsoft® Excel.
11. Нажать кнопку **Рассчитать**. Будут отображены расчетные концентрации, результаты, статус образцов и полученные калибровочные графики, значения эффективности и коэффициента корреляции.

Результаты исследования выдаются в следующем виде:



Раздел **Расчетные концентрации** служит для визуализации промежуточных вычислений. В ячейках выводятся количественные результаты (ГЭ/мл) для каждого возбудителя, рассчитанные по калибровочным графикам по соответствующему каналу детекции. В случае отсутствия возбудителя в образце, соответствующее поле остается пустым.

Раздел **Результаты** предназначен для выдачи результатов.

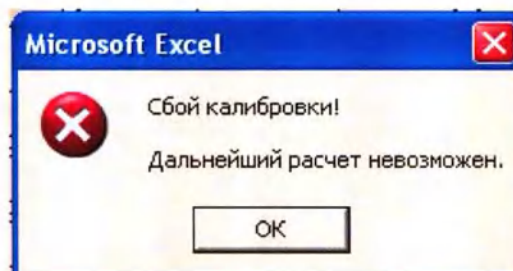
В столбце **Концентрации ГЭ/мл** выводятся количественные результаты (ГЭ/мл) для каждого возбудителя, рассчитанные с учетом потери ДНК в процессе экстракции. В случае отсутствия возбудителя в образце, соответствующее поле остается пустым. Если концентрация выходит за границы линейного диапазона выводится символ > или < и значение верхней или нижней границы, соответственно.

В столбце **Статус** выводятся следующие сообщения:

Статус	Описание
Невалидный.Сбой ВКО.Требуется повторить анализ.	В исследуемом образце или в образце ПК значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК
Обнаружена ДНК: <i>S.pneumoniae</i> и/или <i>H.influenzae</i>	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов (менее 1×10^4 ГЭ/мл)
	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов (от 1×10^4 до 1×10^8 ГЭ/мл)
	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и/или <i>Haemophilus influenzae</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов (более 1×10^8 ГЭ/мл)
Не обнаружено	Значения <i>Ct</i> для ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> отсутствуют или превышает граничное значение, а по каналу для ВКО определено значение <i>Ct</i>
ОК	Получены правильные результаты для контролей этапов экстракции (ПК, ОК) и амплификации (калибраторы K1 и K2, K-) ДНК
Ошибка.Выходит за границу допустимых значений.	Для образца ПК значение концентрации выше и/или ниже диапазона, указанного во вкладыше к данному набору реагентов
Контаминация?	Для образца K- присутствует <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX
	Для образца ОК присутствует <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX
Сбой ВКО!	Для образца ОК отсутствует <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM
Сбой!	Для образцов калибраторов K1 и K2 при отсутствии <i>Ct</i> хотя бы по одному из каналов детекции

Раздел **Калибровка** предназначен для вывода калибровочных графиков, значений коэффициента корреляции (R^2) и эффективности амплификации (E), статуса калибровки.

Если для калибраторов K1 и K2 значения *Ct* неправильно внесены, отсутствуют или показатель эффективности при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %, то программа выдает сообщение:



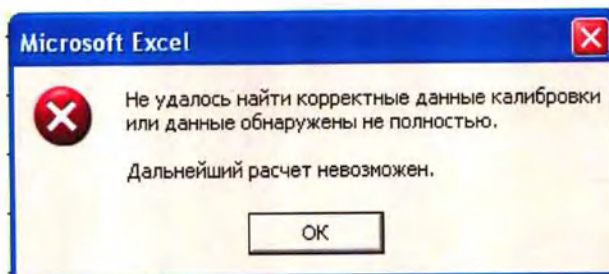
при этом в поле **Калибровка** в таблице **Статус калибровки** в ячейке соответствующего канала выводится сообщение **Сбой!(Эфф.)**, **Сбой!(R^2)**, **Сбой!(Эфф.+ R^2)**.

ВНИМАНИЕ! Информация о принципе интерпретации результатов количественного исследования, результатах для контролей различных этапов количественного ПЦР-

исследования и возможные ошибки приведены в инструкции по применению набора реагентов АмплиСенс® Пневмо-квант-FL.

СООБЩЕНИЯ ОБ ОШИБКАХ ОПЕРАТОРА ПО

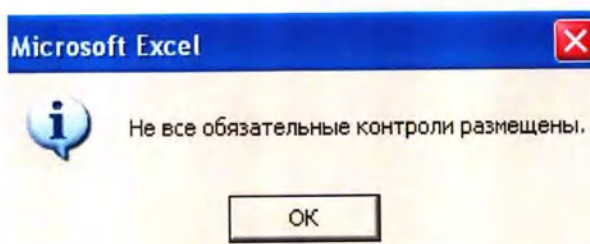
1. Если отсутствует какой-либо калибратор, ПО выдает сообщение:



при этом в столбце **Статус** выводится сообщение **Сбой!**

Необходимо проверить наличие значений C_t для калибраторов, а также правильность их названия.

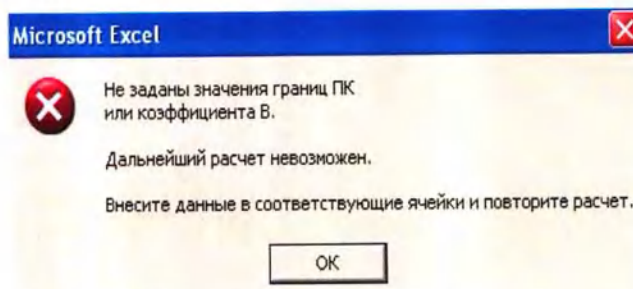
2. Если отсутствуют образцы ПК и/или ОК, ПО выдает сообщение:



Необходимо проверить наличие этих контролей в столбце **Обозначение образца**, а также правильность их названия. При отсутствии этих образцов программа производит расчет, но:

Внимание! Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии инструкцией и вкладышем, прилагаемыми к набору реагентов.

3. Если не заданы значения границ для образца ПК и/или значение коэффициента В, ПО выдает сообщение:



Необходимо внести значения границ для образца ПК и/или значение коэффициента В.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 10
9503 лист 06

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



«09»

20 20 г.

 Е.А. Козлова

М.П.





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



Краткое руководство
набор реагентов для
количественного определения ДНК
Streptococcus pneumoniae и
Haemophilus influenzae
методом ПЦР
АмплиСенс® Пневмо-квант-FL

Форма 1: **REF** Н-2811-1-1

Форма 2: **REF** Н-2812-1-14



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

IVD

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».

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-STI-87) – в каждом образце.

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

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО STI-87	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
ОКО + ПКО <i>S.pneumoniae</i> / <i>H.influenzae</i>	90 мкл + 10 мкл	в пробирку для ПК
Элюция		
Все образцы	100 мкл	в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

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

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 2 ДНК-калибратора (K1, K2), 1 отрицательный контроль ПЦР (K-), 1 отрицательный (OK) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.

- Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *S.pneumoniae* / *H.influenzae*.

- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>S.pneumoniae</i> / <i>H.influenzae</i>	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-B	5*(N+K+1)	
Полимераза (TaqF)	0,5*(N+K+1)	

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

- 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 пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ПКО	в пробирку для ПК
K1 SH	в пробирку для ДНК-калибратора K1
K2 SH	в пробирку для ДНК-калибратора K2
K-	в пробирку для K-

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 2 ДНК-калибратора (K1, K2), 1 отрицательный контроль ПЦР (K-), 1 отрицательный (OK) и 1 положительный (ПК) контроли экстракции.

- Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *S.pneumonia* / *H.influenzae*-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 25 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирку для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК
Пробы ДНК, экстрагированной из ПКО	в пробирку для ПК
K1 SH	в пробирку для ДНК-калибратора K1
K2 SH	в пробирку для ДНК-калибратора K2
K-	в пробирку для K-

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	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	

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

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание 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 данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

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.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трём каналам:

Флуорофор	FAM	JOE	ROX
Лишь для амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i>	ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны значения концентраций калибраторов, коэффициента В, диапазона концентраций ПКО *S.pneumoniae* / *H.influenzae* и граничные значения порогового цикла (C_t), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3
лист а

Руководитель подразделения развития и качества
продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора (Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)
Е.А. Козлова

